

Rekombinante Produktion der *fibrinogen gamma chain* (FGG)

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Sabrina Grünert, geb. Baganz, M. Sc.

2020

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper
Korreferentin: apl. Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rinas
Tag der Promotion: 10.10.2019

„The difference in winning and losing is most often not quitting.”

Walt Disney (1901 – 1966)

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Arbeitskreis durchführen zu können, die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas und die freundliche Unterstützung während der Promotion.

Frau Prof. Dr. Ursula Rinas danke ich sehr für die Übernahme des Korreferats und die inhaltliche Hilfestellung. Herrn Prof. Dr. Alves danke ich für die Teilnahme an der Prüfungskommission.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Iliyana Pepelanova für ihre tolle Betreuung, ihre unermüdliche Geduld, stets konstruktive Kritik, ihr offenes Ohr und das Korrekturlesen dieser Arbeit! благодаря!

Frau Dr. Antonina Lavrentieva danke ich sehr für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Entwicklung und der Durchführung des Zelladhäsionsassays. Ein großer Dank geht auch an Herrn Martin Pähler und Frau Martina Weiß, welche immer mit Rat und Tat bei Problemen mit Laborgeräten oder –arbeiten zur Seite standen.

Vielen Dank auch an Katharina Schmidt, Lukas Raddatz und Tobias Steinwedel für die Mitarbeit an meinem Promotionsthema im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten.

Den Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere danke ich an dieser Stelle Gesa, Alina, Jan, Thore, Martin und Christian. Liebe Semra, liebe Lena und liebe Jana vielen Dank für eure Freundschaft, dass ihr bei kleinen oder großen Problemen da seid und man mit euch Pferde stehlen kann.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Ohne sie wären das Studium und die Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt und mir immer wieder Mut zugesprochen habt und bei allen Entscheidungen hinter mir standet.

Vielen Dank Philipp für deine Hilfe in Wort und Tat, dein geduldiges Zuhören, jede Aufmunterung sowie für jede einzelne Umarmung vor allem während der stressigen und schwierigen Zeiten der Dissertation!

Kurzfassung

Die Fibrinogen- γ -Kette (FGG) ist eine von drei Proteinketten, welche am Aufbau des Blutgerinnungsproteins Fibrinogen beteiligt sind. FGG zeichnet sich durch wichtige biologische Funktionen, wie die Bindung von verschiedenen Zelltypen, Wachstums- und Koagulationsfaktoren aus. Ziel der Arbeit ist es FGG als neues innovatives Fibrin-basiertes Biomaterial rekombinant herzustellen, um es als Grundgerüst für Blutgefäßprothesen oder auch als Beschichtungsmaterial in der Zellkultur einzusetzen.

Für die Herstellung eines Produktionsstammes wurde die Gensequenz der humanen Fibrinogen- γ A-Kette codonoptimiert, synthetisiert und in den Stamm SMD1168 der methylotrophen Hefe *Komagataella phaffii* eingebracht. Nach Screening von über 200 Klonen konnte jedoch weder im Kulturüberstand noch im Zellysate FGG nachgewiesen werden.

Durch das Einbringen der für *Escherichia coli* optimierten Gensequenz konnte hingegen ein Produktionsstamm generiert werden, welcher FGG als unlösliches Protein in *inclusion bodies* bildete. Durch Koproduktion von Chaperonen, konnte in geringen Mengen lösliches Protein produziert werden. Da die Zellen aber zu gestresst waren und im Vergleich immer deutlich mehr unlösliches Protein gebildet wurde, erfolgte die Aufarbeitung des FGGs aus *inclusion bodies*. Durch einen milden Solubilisierungsprozess mit 3 M Urea konnte FGG in Lösung und durch ein *On-column Refolding* in einen stabilen löslichen Zustand ohne Urea gebracht werden. Mittels Zelladhäsionsassays konnte gezeigt werden, dass das Protein bioaktiv war.

In einem *Design of experiments* mit Box-Behnken-Design wurden optimale Produktionsbedingungen ermittelt. Durch Übertragung der Bedingungen in den 2L-Rührkesselreaktor konnten 251,48 mg/L rekombinantes FGG produziert werden.

Schlagerwörter: Fibrinogen, Fibrinogen Gamma Kette (FGG), rekombinante Proteinproduktion, *Escherichia coli*, *Komagataella phaffii*, Proteinaufreinigung

Abstract

The fibrinogen- γ chain (FGG) is one of three protein chains which constitute the blood clotting protein fibrinogen. FGG is characterized by important biological functions, such as the binding of different cell types, growth and coagulation factors. The aim of this work is to produce recombinant FGG as an innovative fibrin-based biomaterial for use as a basic scaffold for blood vessel prostheses or as a coating material in cell culture.

For the preparation of a production strain, the gene sequence of the human fibrinogen γ A chain was codon-optimized, synthesized and introduced into the strain SMD1168 of the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii*. However, after screening of more than 200 clones, FGG could not be detected either in the culture supernatant or in the cell lysate.

The gene sequence was then optimized and introduced in *Escherichia coli*. A production strain could be generated, which formed FGG as an insoluble protein in inclusion bodies. By co-production of chaperones, soluble protein could be produced in small amounts. But the cells were too stressed and in comparison significantly more insoluble protein was formed. As a result, FGG was processed from inclusion bodies. By using a mild solubilization process with 3 M urea, FGG could be brought into solution. A stable soluble state without urea was achieved by an on-column refolding. Cell adhesion assays showed that the protein was bioactive.

Optimal production conditions were determined in a design of experiments with Box-Behnken design. By transferring the conditions into a 2L stirred tank reactor, 251.48 mg/L recombinant FGG could be produced

Keywords: fibrinogen, fibrinogen gamma chain (fgg), recombinant protein production, *Escherichia coli*, *Komagataella phaffii*, protein purification

Inhaltsverzeichnis

Zitat Walt Disney	I
Danksagung	II
Kurzfassung	III
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
2. Theoretische Grundlagen.....	4
2.1 Fibrinogen	4
2.1.1 Übersicht über Struktur und Funktion	4
2.1.2 Biosynthese des Fibrinogens.....	5
2.1.3 Fibrinogen in der Blutgerinnung	7
2.2 Fibrin als Biomaterial.....	9
2.3 Verfahren zur Gewinnung von Fibrin.....	11
2.4 Die Fibrinogen- γ -Kette.....	14
3. Arbeiten mit <i>Komagataella phaffii</i>	17
3.1 Der pPIC9K-FGG Expressionsvektor.....	17
3.1.1 Konstruktion des Expressionsvektors.....	17
3.1.2 Transformation und Überprüfung des <i>methanol utilization</i> Phänotyps ...	19
3.2 Screening von <i>K. phaffii</i> Klonen hinsichtlich der Proteinproduktion	22
3.2.1 Überprüfung der Transkription.....	24

4. Produktion von FGG mit <i>Escherichia coli</i>	27
4.1 Der pET-16b-FGG Expressionsvektor	28
4.1.1 Konstruktion des Expressionsvektors.....	28
4.1.2 Produktionsstamm und Transformation.....	29
4.1.3 Produktion und Überprüfung der Proteinidentität	30
4.2 Produktion von löslichem FGG.....	34
4.2.1 Einfluss von Temperatur und Induktorkonzentration.....	34
4.2.2 Einfluss von Chaperonen auf die Löslichkeit	35
4.3 Solubilisierung und Aufreinigung der <i>Inclusion bodies</i>	43
4.3.1 Solubilisierung der <i>Inclusion bodies</i>	43
4.3.2 Aufreinigung der <i>IBs</i> in IMAC Spin Columns.....	46
4.3.3 Aufreinigung des rekombinanten FGGs mittels <i>Fast-Protein-Liquid-Chromatography</i>	49
4.3.4 Aufreinigung und <i>On-column Refolding</i> mittels IMAC	50
4.3.5 Optimierung der Reinheit der eluierten FGG-Fraktionen	52
4.4 Überprüfung der biologischen Aktivität des rekombinanten FGGs	56
4.5 Optimierung der FGG-Produktion mittels <i>Design of Experiments</i>	63
4.6 <i>Scale-Up</i> und Kultivierung im Rührkessel-Bioreaktor	68
5. Zusammenfassung und Ausblick	73
6 Anhang A – Chemikalien und Materialien	78
6.1 Chemikalien und Reagenzien.....	78
6.2 Verbrauchsmaterialien.....	82
6.3 Geräte und Software	83
6.4 Kulturmedien, Puffer und Reagenzlösungen	85
6.4.1 Kulturmedien und Zusätze für die Kultivierung und den Zellaufschluss von <i>K. phaffii</i>	86
6.4.2 Kulturmedien und Zusätze für die Kultivierung und den Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	88

6.4.3 Kulturmedien HUVEC.....	91
6.4.4 Solubilisierung und FPLC	92
6.4.5 SDS-PAGE	94
6.4.6 Western Blot.....	96
6.4.7 Bradford Assay.....	97
6.4.8 Agarose-Gelelektrophorese	97
6.5 Zelllinien, Bakterien und Hefestämme.....	97
6.6 Plasmidkarten.....	98
7 Anhang B – Methoden	100
7.1 Molekularbiologische Methoden	100
7.1.1 Enzymatische Spaltung von DNA	100
7.1.2 Agarose-Gelelektrophorese	100
7.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	100
7.1.4 Ligation von DNA-Enden.....	101
7.1.5 DNA-Sequenzierung	101
7.1.6 Transformation kompetenter Bakterien	101
7.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> mittels Miniprep	102
7.1.8 Isolierung von RNA aus <i>K. phaffii</i>	102
7.1.9 Reverse Transkription.....	103
7.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	103
7.1.11 Polymerasekettenreaktion	103
7.2 Arbeiten mit <i>Komatagaella phaffii</i>	105
7.2.1 Transformation mittels Elektroporation	105
7.2.2 Anlegen von Kryokulturen.....	105
7.2.3 Kultivierung und Induktion im Schüttelkolben und Multiwellplatten...	106
7.2.4 <i>Posttransformational vector amplification</i>	106

7.2.5 Zellaufschluss	106
7.2.6 Yeastern Blot	107
7.2.7 Messung der optischen Dichte	107
7.3 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	107
7.3.1 Transformation kompetenter Bakterien	107
7.3.2 Anlegen von Kryokulturen.....	108
7.3.3 Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab.....	108
7.3.4 Kultivierung im Bioreaktor	109
7.3.5 Zellaufschluss	110
7.3.6 Messung der optischen Dichte	110
7.4 Arbeiten mit <i>HUVECs</i>	111
7.4.1 Passagieren und Kultivierung von <i>HUVECs</i>	111
7.4.2 Kryokonservierung.....	111
7.4.3 Revitalisierung.....	111
7.4.4 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität	111
7.4.5 Fixieren und Färben von Zellen.....	112
7.4.6 CellTiterBlue®-Assay	112
7.5 Proteinchemische Methoden	113
7.5.1 FXIII-Crosslinking	113
7.5.2 Beschichtung von Multiwellplatten mit Proteinen	113
7.5.3 Solubilisierung von <i>Inclusion Bodies</i>	113
7.6 Analytik	114
7.6.1 TCA-Fällung.....	114
7.6.2 SDS-PAGE	114
7.6.3 Färbung mit kolloidalem Coomassie	114
7.6.4 SemiDry Western Blot und Immunodetektion	115
7.6.5 Bradford-Assay	115

7.6.6	Besimmung der Proteinkonzentration mittels Densitometrie	116
7.7	Chromatographische Methoden.....	116
7.7.1	Aufreinigung mit NTA- <i>Spin-Columns</i>	116
7.7.2	IMAC.....	116
7.7.3	<i>On-column</i> Refolding	117
8.	Anhang C – Zusätzliche Experimentelle Daten	119
8.1	Gensequenzen	119
8.2	Screening verschiedener <i>K. phaffii</i> -Klone unter unterschiedlichen Bedingungen.....	121
8.3	Screening zur löslichen Produktion von FGg in <i>E. coli</i>	124
8.4	Western-Blot-Analysen	125
8.5	<i>Design of Experiments</i>	125
9.	Literaturverzeichnis	126
10.	Abbildungsverzeichnis.....	138
11.	Tabellenverzeichnis.....	141
12.	Lebenslauf.....	144
13.	Publikationsliste	145

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	HMW	<i>High molecular weight</i>
AOX	Alkoholoxidase	HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ATP	Adenosintriphosphat	IBs	<i>Inclusion bodies</i>
bp	Basenpaare	IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
BTM	Biotrockenmasse	<i>K. phaffii</i>	<i>Komagataella phaffii</i>
CAI	<i>Codon adaption index</i>	kb	Kilobasen
cDNA	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure	kDa	Kilodalton
CTB	CellTiterBlue®	Lac	Lactose
D	Durchfluss (bei SDS-PAGE)	LB	<i>lysogeny broth</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LMW	<i>Low molecular weight</i>
DO	<i>dissolved oxygen</i>	M	Marker (bei SDS-PAGE)
DoE	<i>Design of Experiments</i>	MALDI	<i>matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
E	Eluat (bei SDS-PAGE)	mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Mut	<i>methanol utilization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	NTA	Nitritotriessigsäure
FGG	<i>fibrinogen gamma chain</i> (Fibrinogen- γ -Kette)	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
<i>fgg</i>	Fibrinogen- γ -Kette-Gen	<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia Pastoris</i>
FPA/FPB	Fibrinopeptid A/B	PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
GRAS	<i>Generelally regarded as safe</i>		
His	Histidin		

PEG	Polyethylenglykol	Tab.	Tabelle
PLGA	Polylactid-co-glycolid	TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
PLLA	Polylactid	TRIS	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
RNA	Ribonukleinsäure	u.a.	unter anderem
S	Solubilisiertes Protein (bei SDS-PAGE)	UV	ultraviolett
s.	siehe	W	Waschfraktion (bei SDS- PAGE)
SDS	Natriumlaurylsulfat	ZYP	definiertes Medium auf Phosphatpufferbasis

1 Einleitung und Zielsetzung

Über 17 Millionen Menschen weltweit sterben jährlich in Folge von kardiovaskulären Erkrankungen. Alleine in Europa machen sie über 50 % der Todesursachen aus. Ursachen für diese Erkrankungen können Lebensgewohnheiten wie schlechte Ernährung, Bewegungsmangel und Übergewicht sowie Tabak- und Alkoholkonsum sein [1].

Vor allem koronare Herzerkrankungen, bei denen die Blutgefäße nicht mehr in der Lage sind den Herzmuskel richtig zu versorgen, stellen ein großes Problem dar [1]. Die erkrankten Gefäße müssen entweder mit synthetischen Prothesen oder autologen Gefäßen ersetzt oder überbrückt werden. Synthetische Prothesen können immunologische Reaktionen hervorrufen und besitzen andere biomechanische Eigenschaften als die natürlichen Blutgefäße. Autologe Gefäße hingegen sind nur begrenzt verfügbar und nicht bei jedem Patienten in guter Qualität zu finden [2]. Spendergefäße tragen jedoch zusätzlich das Risiko von Abstoßungsreaktionen und der Übertragung von Pathogenen. Ein Material, welches als Grundgerüst für Gefäßprothesen dienen kann, muss daher hohen Anforderungen gerecht werden.

Hoffnungsträger für die Anwendung als Gefäßprothese sind Fibrin-basierte Biomaterialien. Fibrin ist ein natürlich vorkommendes dreidimensionales Netzwerk welches für die Bildung von neuem Gewebe in der Wundheilung von Bedeutung ist. Als temporäre Matrix sorgt dieses Netzwerk für die Rekrutierung von verschiedenen Zelltypen und Wachstumsfaktoren. Gleichzeitig bietet es genug Stabilität und Elastizität um die Formierung von neuem Gewebe zu gewährleisten. Zudem kann auch auf den Abbau des Fibrin-Netzwerkes Einfluss genommen werden, sodass eingebrachte Implantate vollständig durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden und im besten Falle Jahre nach der Implantation keine Spuren hinterlassen. Durch diesen regenerativen Ansatz könnten neue innovative Fibrin-basierte Biomaterialien den steigenden Implantatbedarf sichern und gleichzeitig die Implantatsicherheit erhöhen.

Die Herstellung eines solchen Fibrin-Netzwerkes stellt sich momentan jedoch noch als Herausforderung dar, da das Fibrinvorläufermolekül Fibrinogen aus menschlichem Blut isoliert werden muss um *in vitro* als Biomaterial aufgearbeitet zu werden. Limitierungen sind momentan die gewonnenen Mengen an autolog gewonnenem Fibrinogen sowie die Qualität des Proteins. Einen Ausweg stellt die rekombinante Proteinproduktion dar, da sie eine gleichbleibende Qualität des Zielproteins gewährleistet, Protein in hohen Mengen produziert werden kann und zudem unabhängig von Blutspenden und den damit verbundenen Risiken wie Viren- und Prionenkontamination ist.

Ziel der Arbeit ist es ein neues innovatives Fibrin-basiertes Biomaterial rekombinant herzustellen, welches als Grundgerüst für Blutgefäßprothesen oder auch als Beschichtungsmaterial in der Zellkultur eingesetzt werden soll.

Die Basis für das Fibrin-basierte Biomaterial stellt die γ A-Kette des Fibrinogens (FGG) dar. FGG wurde als Grundgerüst ausgewählt, da sie zahlreiche Bindestellen für verschiedene Zelltypen, wie Endothelzellen oder Fibroblasten, enthält. Zudem können aber auch Wachstumsfaktoren, wie FGF-2 an die Kette binden. Außerdem besteht die Möglichkeit γ A-Ketten mittels Faktor XIII zu verbinden.

Die Verwendung von Säugetierzellen als Expressionssystem für FGG ist mit einer hohen Komplexität, hohen Prozesskosten und einer möglichen viralen Kontamination des Endproduktes verbunden. Aus diesen Gründen sollten einfachere und günstigere Expressionssysteme wie *Komagataella phaffii* oder *Escherichia coli* eingesetzt werden.

Ziel ist es einen FGG-Expressionsvektor zu klonieren und anschließend einen produzierenden rekombinanten Klon zu isolieren. Durch Veränderung von Prozessparametern, wie Temperatur, Kultivierungsmedium oder Induktorkonzentration, soll der Produktionsprozess optimiert werden. Die optimierte Prozessstrategie soll dann vom Schüttelkolbenmaßstab auf einen Bioreaktor im Labormaßstab übertragen werden. Anschließend soll eine Strategie zur Aufreinigung des Zielproteins etabliert werden. Um die biologische

Funktionsweise von FGG als Biomaterial zu testen soll ein Bioaktivitätstest in der Zellkultur entwickelt werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Fibrinogen

2.1.1 Übersicht über Struktur und Funktion

Fibrinogen ist ein 340 kDa schweres, lösliches Plasmaglykoprotein. Als Vorläuferprotein des Fibrins nimmt es eine zentrale Rolle in der Blutgerinnung ein. Bei Gewebeverletzungen kann Fibrinogen zu einem unlöslichen dreidimensionalen Fibrin-Netzwerk polymerisieren, welches die Wunde verschließt und weiteren Blutverlust verhindert. Neben dem Wundverschluss dient es auch als temporäre Matrix für verschiedene Zelltypen und Proteine im Wundheilungsprozess [3], [4]. Des Weiteren stimuliert Fibrinogen die Angiogenese [5] und reguliert Entzündungsprozesse [6].

Der Aufbau des Fibrinogens ist durch seine bilaterale Symmetrie gekennzeichnet (Abbildung 1). Es ist aus zwei identischen Untereinheiten aufgebaut, welche je aus den drei Polypeptidketten $A\alpha$ (610 Aminosäuren), $B\beta$ (461 Aminosäuren) und γ (411 Aminosäuren) bestehen. Das Protein wird insgesamt durch 29 Disulfidbrücken stabilisiert, wobei 12 Brücken innerhalb und 17 Brücken zwischen den einzelnen Ketten auftreten. Die zwei Untereinheiten sind durch fünf Disulfidbrücken miteinander verbunden. [3], [7]

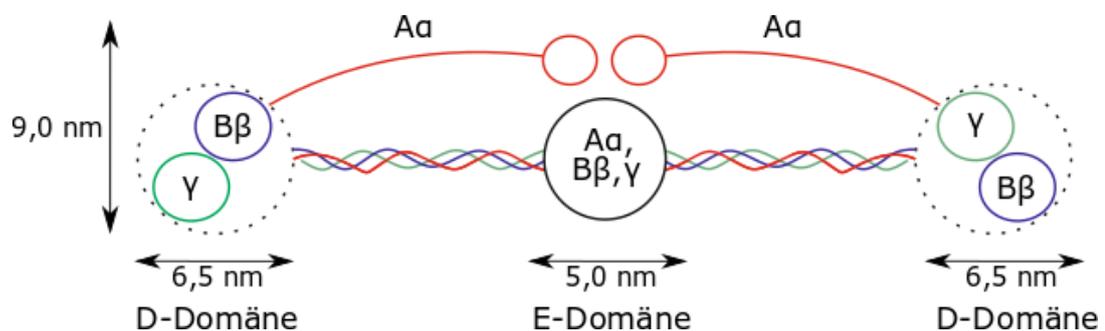


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Fibrinogens (modifiziert nach [8])

Ein weiteres wichtiges Merkmal der Struktur des Fibrinogens ist seine Domänenstruktur. Fibrinogen kann in drei Domänen unterteilt werden: zwei periphere D-Domänen und eine zentrale E-Domäne. Die zwei D-Domänen

enthalten jeweils die C-Termini der β - und der γ -Kette und werden über α -helikale *coiled-coils* mit der zentralen E-Domäne verknüpft. In der E-Domäne befinden sich die N-Termini aller Polypeptidketten. Es ergibt sich eine hantelförmige Struktur von 47,5 nm. [8], [9]

Fibrinogen ist zudem über viele posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierung, Hydroxylierung und Sulfatierung modifiziert [10].

Im Blutplasma eines gesunden Menschen können, bedingt durch proteolytischen Abbau, posttranslationale Modifikationen und alternative Splicingvarianten, über eine Million verschiedene Fibrinogenformen vorkommen [10]. Generell kann aber zwischen drei Hauptformen unterschieden werden: *high molecular weight* (HMW), *low molecular weight* (LMW) und LMW' Fibrinogen (Tabelle 1) [11], [12].

Tabelle 1: Überblick über die Hauptformen des Fibrinogens [11], [12]

Form	Molekulares Gewicht	Vorkommen im Blutplasma
HMW	340 kDa	67,2 %
LMW	305 kDa	29,0 %
LMW'	270 kDa	3,8 %

Die HMW Form ist mit ca. 70 % die im humanen Blut am häufigsten vorkommende Splicing-Variante. Durch einen proteolytischen Abbau der $A\alpha$ -Ketten am C-Terminus entstehen die beiden LMW-Formen [12]. Unterschiedliche Fibrinogenformen bilden Fibrinnetzwerke aus, welche sich in der Faserdicke, der Angiogenesefähigkeit sowie in der Adhäsion von verschiedenen Zelltypen unterscheiden [13].

2.1.2 Biosynthese des Fibrinogens

Die Biosynthese von Fibrinogen wird durch Glucocorticoide und Interleukin-6 stimuliert [14] und ist hauptsächlich in den parenchymalen Leberzellen lokalisiert [15]. In Akute-Phase-Reaktionen kann die Blutplasmakonzentration des Fibrinogens von 2,5 g/L auf das 2- bis 10-fache gesteigert werden [3].

Lokalisiert sind die drei Polypeptidketten (α , β und γ) clusterartig als drei *single-copy*-Gene auf dem Chromosom 4 [16]. Die mRNA-Level der drei Polypeptidketten sind identisch und werden im gleichen Maße hoch- und runterreguliert [17].

Im endoplasmatischen Retikulum erfolgt der schrittweise Zusammenbau der drei Polypeptidketten zum hexameren Fibrinogen [3]. Nach der Synthese der einzelnen Ketten, lagern sich diese zu einem Zwei-Ketten-Komplex zusammen (Abbildung 2). Dabei werden $A\alpha$ - γ - und $B\beta$ - γ -Komplexe gebildet [15]. Im nächsten Schritt wird die fehlende dritte Kette an diese Komplexe angelagert, sodass sich das Halbmolekül $(A\alpha-B\beta-\gamma)_1$ bildet. Ob die Bildung von $(A\alpha-B\beta-\gamma)_1$ über das Intermediat $A\alpha$ - γ oder $B\beta$ - γ verläuft, ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

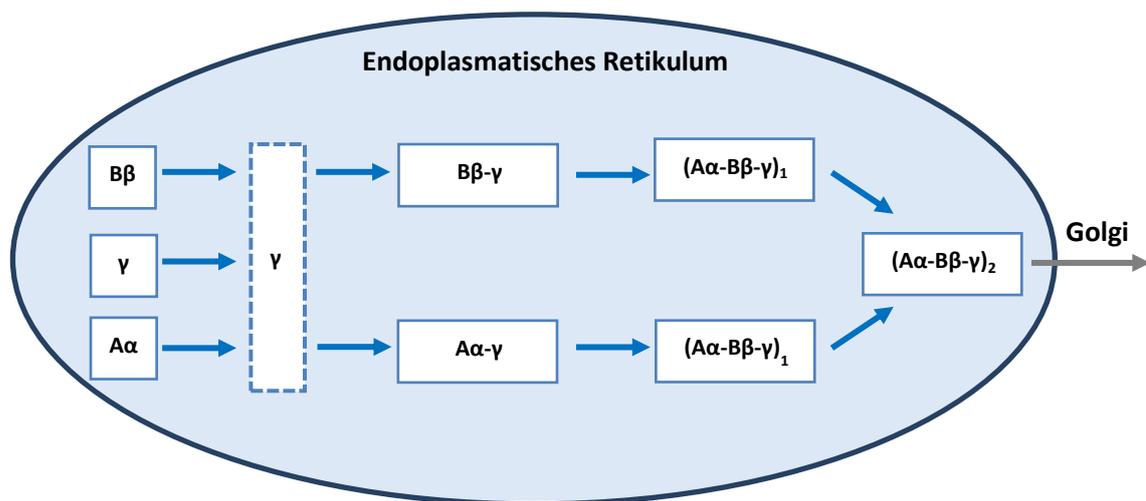


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Fibrinogen-Biosynthese (modifiziert nach [15])

Im letzten Schritt werden die $(A\alpha-B\beta-\gamma)_1$ -Komplexe N-terminal verbunden, sodass das hexamere Fibrinogen $((A\alpha-B\beta-\gamma)_2)$ entsteht. Fibrinogen wird anschließend aus dem endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat sekretiert [15].

Für die Biosynthese werden nicht nur die einzelnen Polypeptidketten benötigt. An der Zusammenlagerung der Ketten sind auch mikrosomale Membranen und Chaperone beteiligt [18].

2.1.3 Fibrinogen in der Blutgerinnung

Fibrinogen spielt im letzten Schritt der Hämostase eine wichtige Rolle. Die Hämostase kann in zwei Phasen eingeteilt werden: Blutstillung und Blutgerinnung. Nach Gewebeerletzung verengen sich zuerst die Blutgefäße und es bildet sich durch Thrombozytenaggregation ein sogenannter weißer Thrombus, welcher die Wunde abdichtet. Da der weiße Thrombus nicht stabil ist, wird dieser in der sekundären Hämostase, der Blutgerinnung, weiter stabilisiert [19]. Die sekundäre Hämostase wird zum einen durch den Kontakt des Gefäßendothels mit Fremdoberflächen (intrinsischer Weg) und zum anderen durch Freisetzung des Membranproteins *tissue factor* eingeleitet (Abbildung 3) [20]. Durch die dadurch aktivierte Blutgerinnungskaskade wird die Bildung von Thrombin aus Prothrombin angeregt. Thrombin leitet im letzten Schritt der Blutgerinnung die Polymerisation vom löslichen Fibrinogen zum unlöslichen Fibrin ein, wodurch sich ein sogenannter roter Thrombus bildet, welcher die Verletzung stabil verschließt [19]–[21]. Dieser dient als Grundgerüst für die Bildung von neuem Gewebe.

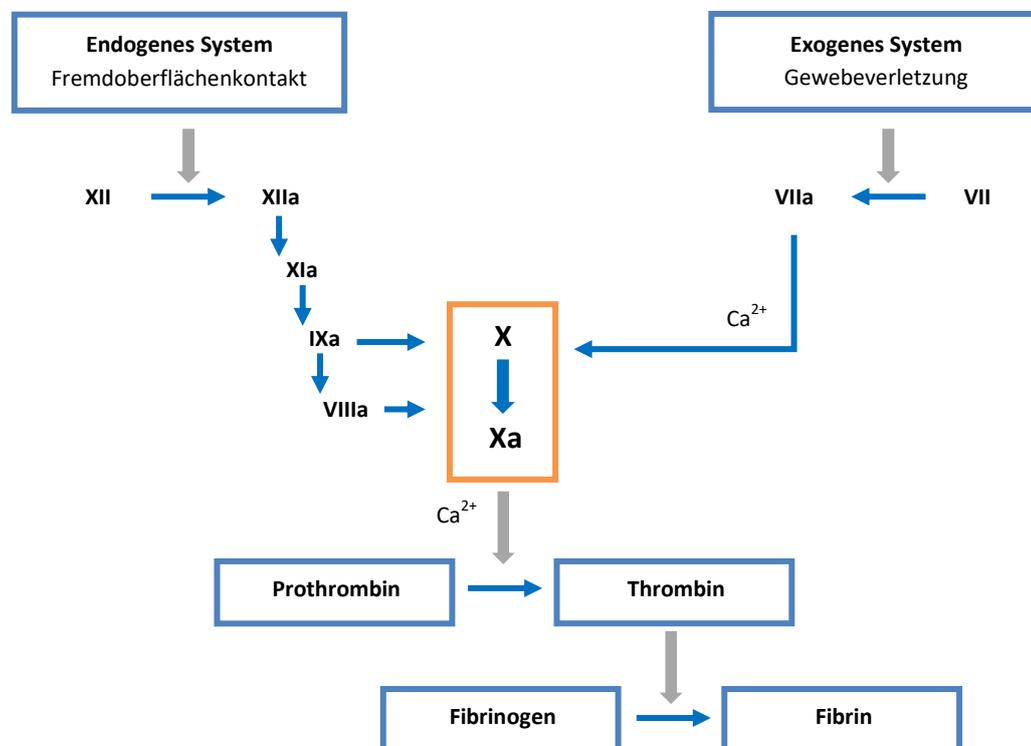


Abbildung 3: Schematische Darstellung der sekundären Hämostase(modifiziert nach [22])

Die Polymerisierung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin erfolgt durch Abspaltung von vier N-terminalen Peptiden in den beiden $\text{A}\alpha$ und $\text{B}\beta$ -Ketten (Abbildung 4) und führt zur Bildung von Fibrin-Monomeren. Die abgespaltenen Peptide werden als Fibrinopeptide A und B (FPA und FPB) bezeichnet und sind 18 und 20 Aminosäurereste lang. Durch die Abspaltung von FPA und FPB kommt es zu einer Konformationsänderung und damit zur Freilegung der Polymerisationsstellen *knob* A und *knob* B. Diese Polymerisationsstellen sind kompatibel zu den Bindungslöchern *hole* a (auf den γ -Ketten) und *hole* b (auf den β -Ketten) anderer Fibrin-Monomere. Im weiteren Verlauf kommt es durch *knob-hole* Interaktionen zur Bildung von Fibrin-Protofibrillen. Durch laterale Aggregation mehrerer Protofibrillen entstehen letztendlich Fibrinfasern. Die weitere Stabilisierung dieses Netzwerkes erfolgt über die Transglutaminase Faktor XIII durch kovalente Amidbindungen zwischen Glutamin- und Lysinresten (Abbildung 4). Diese Bindungen schützen das Netzwerk gegenüber proteolytischer Degradation [20], [21].

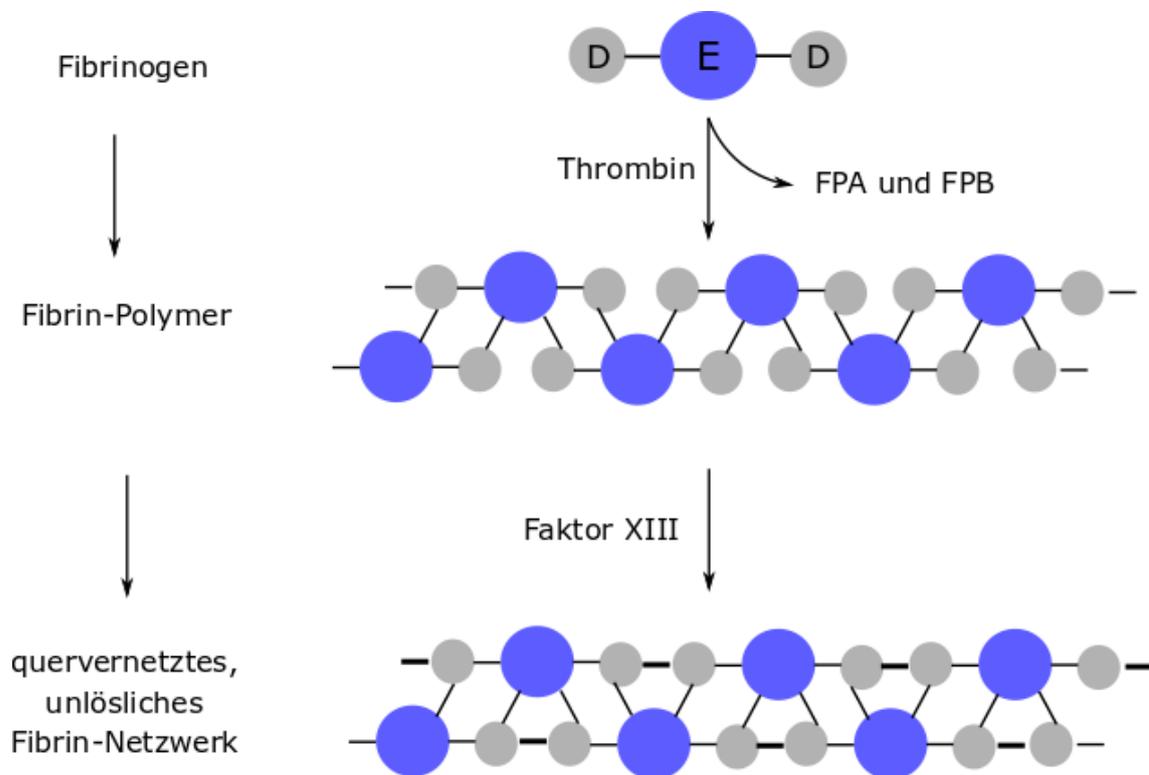


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Polymerisation von Fibrinogen zu Fibrin (modifiziert nach [3])

Um die Hämostase zu regulieren, wird parallel zum Aufbau des Fibrin-Netzwerkes der Abbau des Fibrins, die Fibrinolyse, durch das Enzym Plasmin eingeleitet. Der Aufbau und Abbau von Fibrin stehen miteinander im Gleichgewicht. [19]

Der Abbau des Fibrins verhindert das Verstopfen des verletzten Blutgefäßes durch Thromben als Folge einer Überproduktion von Fibrin. Zudem ist die Fibrinolyse auch wichtig, um die Gewebeheilung durch zelluläre Elemente einzuleiten. [19]

2.2 Fibrin als Biomaterial

Fibrinogen bzw. Fibrin eignet sich besonders gut als Biomaterial für klinische Anwendungen, da es sich als eine natürliche Matrix durch seine Biokompatibilität, die Fähigkeit zur Angiogenese und seine natürliche Fähigkeit Zellen zu binden, auszeichnet. Des Weiteren regt es die Zellen an Elastin, Kollagen und weitere Matrixproteine zu produzieren [2]. Ein großer Vorteil ist zudem, dass die Polymerisierungszeit aber auch die Eigenschaften des Fibrin-Netzwerkes gezielt beeinflusst werden können. Je nach Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, Thrombin- und Fibrinogenkonzentration entstehen Fibrin-Netzwerke mit unterschiedlichen Eigenschaften [23]–[25]. Veränderungen von Temperatur und Thrombinkonzentration besitzen beispielsweise einen hohen Einfluss auf die Polymerisationszeit [23].

In der Klinik findet Fibrin vor allem in Form von Fibrinkleber Anwendung. Dieser Kleber funktioniert wie ein Zweikomponentenkleber und ahmt den letzten Schritt der Blutgerinnung nach. Fibrinogen und Thrombin werden dazu in zwei verschiedenen Behältern aufbewahrt. Durch Vereinigung der beiden Komponenten entsteht schließlich in Anwesenheit von Calcium und Faktor XIII das Fibrin-Netzwerk. Fibrinkleber kann einerseits als Hämostatikum eingesetzt werden um Blutungen zu stoppen. Des Weiteren wird es aber auch sowohl als Gewebekleber als auch als Abdichtungsmittel für Wunden verwendet [26]. 1998 wurde der erste Fibrinkleber als Hilfsmittel für die Hämostase zur Kontrolle von Blutungen und zur Unterstützung von Nähten oder Ligaturen von der FDA zugelassen [26], [27].

Seitdem wurden weitere Fibrinkleber für unterschiedliche klinische Anwendungen zugelassen. Alle oben genannten Fibrinkleber stammen aus Spenderblut welches immer ein Restrisiko von Pathogenübertragung trägt.

Fibrinogen kann auch autolog, also aus patienteneigenem Blut isoliert werden. Ein großer Nachteil von autologen Klebern ist jedoch die erhaltene Fibrinogenkonzentration, da diese oft unter denen von kommerziell erhältlichen Klebern liegt. Verfahren zur Gewinnung von Fibrinogen sind in Abschnitt 2.3 beschrieben.

Neben der Verwendung als Kleber findet Fibrin auch als Gefäßprothese in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen eine wichtige Anwendung. Die koronare Herzerkrankung ist die Haupttodesursache weltweit. Bei dieser Erkrankung sind die Blutgefäße nicht mehr in der Lage den Herzmuskel richtig zu versorgen [1]. Die erkrankten Gefäße müssen dann entweder mit synthetischen Prothesen, aus Polyethylenterephthalat oder „*expanded*“-Polytetrafluorethylen, oder autologen Gefäßen ersetzt oder überbrückt werden. Problematisch ist jedoch, dass synthetische Materialien zum einen immunologische Reaktionen hervorrufen und zum anderen andere biomechanische Eigenschaften als die autologen Blutgefäße besitzen. Diese Effekte führen vor allem bei kleinkalibrigen Prothesen (Durchmesser ≤ 5 mm) zu einer hohen Verschlussrate. Autologe Prothesen besitzen hingegen viele Vorteile. Sie sind jedoch nur begrenzt verfügbar und nicht bei jedem Patienten in guter Qualität zu finden. Fibrin stellt als natürlich vorkommendes dreidimensionales Netzwerk für die Anwendung als Gefäßprothese eine gute Alternative dar [2].

Weitere Anwendungen von Fibrin finden sich im *Drug* und *Cell Delivery* und im *Tissue engineering* wie in der Knorpelregeneration [28]. Fibrin kann in diesem Fall zum Beispiel als Reservoir für Zellen, Wirkstoffe oder Wachstumsfaktoren dienen. Solche dekorierten Implantaten weisen, im Falle des *Cell Delivery*, eine erhöhte Zellviabilität auf wodurch Defekte schneller heilen. Mithilfe von Fibringelen

können so beispielsweise Keratinocyten [29] oder mesenchymale Stammzellen [30] eingebracht werden.

Ein großer Nachteil in der Verwendung von reinem Fibrin ist jedoch oftmals seine mangelnde Stabilität. Fibrin wird vom humanen Körper schnell abgebaut, sodass Wirkstoffe oder Zellen nur über eine begrenzte Zeit freigesetzt werden können [31]. Aus diesem Grund wird intensiv an Fibrin-basierten Biomaterialien geforscht, welche dem Gel eine erhöhte mechanische Festigkeit und verlangsamte Biodegradierbarkeit verleihen [32]. Einen Überblick über verschiedene *in vivo* Anwendungen in der Biomedizin gibt die Tabelle 2.

Tabelle 2: Überblick von verschiedenen Fibrin-Biomaterialien für biomedizinische Anwendungen (Abkürzungen: PEG: Polyethylenglycol, PVDF: Polyvinylidenfluorid, PLA/PLLA: Polylactid, PLGA: Polylactid-co-Glycolid)

Form	Material	Anwendung	Quelle
Gel	Fibrin	Autologe Blutgefäßprothesen	[33]
	Fibrin-PEG	Bildung von vaskularisiertem Gewebe	[34]
	Fibrin-Hyaluronsäure	Knorpelreparatur (<i>Cell Delivery</i>)	[35]
	Fibrin-PVDF	Gefäßprothese	[36]
	Fibrin-PLA	Gefäßprothese	[37]
	Fibrin-Polyurethan		[38]
Schwamm	Fibrin-PLLA-PLGA	Bildung von vaskularisiertem Gewebe	[39]

2.3 Verfahren zur Gewinnung von Fibrinogen

Fibrinogen wurde das erste Mal 1876 aus Pferdeblut durch Präzipitation mit Salz aufgereinigt [40]. Erst 1946 erfolgte die erste Isolierung aus humanem Blut durch Plasmafraktionierung. Bei der sogenannten Cohn-Präzipitation wird das Blutplasma durch verschiedene Ethanolkonzentrationen, pH-Werte und Temperaturen in

mehreren Fraktionen gefällt. Fibrinogen wird dabei in der sogenannten Cohn-Fraktion I isoliert [41].

Eine weitere Standardmethode zur Isolation von Fibrinogen ist die Kryopräzipitation. Bei dieser Methode wird Blutplasma bei -20 °C bis -80 °C eingefroren und anschließend wieder langsam aufgetaut [42]. Fibrinogen bleibt unter diesen Bedingungen unlöslich und kann durch Zentrifugation isoliert werden [41]. Durch Variation der Gefriertemperatur und der Anzahl an Einfrier-Auftau-Zyklen kann die Konzentration des isolierten Fibrinogens beeinflusst werden [42]. Ein großer Nachteil dieser Methode ist, dass sie sehr zeit- und kostenintensiv ist. Das CryoSeal™-System ermöglicht eine automatisierte Kryopräzipitation von Fibrinogen in unter einer Stunde [43].

Fibrinogen kann des Weiteren auch mit Ammoniumsulfat oder Ethanol gefällt werden. Durch Vergleich der drei verschiedenen Präzipitationsmethoden konnte herausgefunden werden, dass durch die Ammoniumsulfatfällung Fibrinogen mit der höchsten Gerinnungsfähigkeit isoliert werden kann. Jedoch zeigte Fibrinogen, welches durch die Kryopräzipitation isoliert wurde, die höchste mechanische Stabilität [44].

Eine weitere Möglichkeit zur Fibrinogen-Isolierung bietet das Vivostat®-System. Bei dieser Methode wird eine nicht physiologische Spaltung des FPA durch das Schlangengift Batroxobin erreicht. Das resultierende Fibrin-I-Monomer bildet ein nicht kovalent verknüpftes Netzwerk, welches über Zentrifugation abgetrennt werden kann. Durch einen pH-Shift wird das in dem Isolat verbleibende endogene Prothrombin aktiviert und FPB wird abgespalten. Das Fibrin-I-Netzwerk polymerisiert anschließend in ein Fibrin-Gerinnsel aus. [45], [46]

Eine sicherere Variante reines Fibrinogen von gleichbleibender Qualität zu erhalten, ist die rekombinante Proteinproduktion. Die meisten heterologen Expressionssysteme für die Produktion von Fibrinogen basieren aufgrund der komplexen Struktur und der vielen posttranslationalen Modifikationen, auf Säugetierzellen. Fibrinogen konnte aber auch mit Hefen [47] dargestellt und in der

Milch von transgenen Tieren isoliert werden [48], [49]. Die Tabelle 3 bietet einen Überblick über die verschiedenen Expressionssysteme und die damit erzielten Fibrinogenkonzentrationen.

Tabelle 3: Überblick rekombinante Produktion von Fibrinogen

Expressionssystem	Ausbeute	Quelle
Säugetierzellen		
<i>chinese hamster ovary</i> Zellen	1,3 g/L	[50]
PER.C6 Zellen	>0,5 g/L	[51]
Hefen		
<i>Komagataella phaffii</i>	8 mg/L	[47]
Transgene Tiere		
Mäuse	10-200 µg/mL	[49]
Milchkühe	2-4 g/L	[48]

Rekombinant produziertes Fibrinogen kann jedoch Unterschiede zum nativen Protein aufweisen. Bei Produktion mit transgenen Kühen zeigt sich beispielsweise im Vergleich ein höherer Anteil an alternativen Splicingvarianten der γ -Kette. Zudem bildet sich ein dichteres Fibrinnetzwerk mit dickeren Fasern. [48].

Eine weitere Möglichkeit der rekombinanten Herstellung von Fibrinogen wäre die Assemblierung aller drei Fibrinogenketten *in vitro*. Da an der Zusammenlagerung der Ketten viele einzelne Komponenten wie mikrosomale Membranen oder Chaperone beteiligt sind, ist die Entwicklung eines solchen *in-vitro*-Assays sehr kompliziert und nur im kleinen Maßstab möglich. Experimentell konnte jedoch richtig gefaltetes und funktionsfähiges Fibrinogen erzeugt werden [18].

Die Produktion einzelner vollständiger Fibrinogenketten wurde bisher nur für Funktionsanalysen eingesetzt (siehe Tabelle .4).

Tabelle 4: Überblick rekombinanter Produktion einzelner Fibrinogenketten

Kette	Expressionssystem	Ausbeute	Quelle
Aα-Kette	<i>E. coli</i>	13 $\mu\text{g/mL}$	[52]
Bβ-Kette	<i>E. coli</i>	0,1 $\mu\text{g/mL}$	[53]
γ-Kette	<i>E. coli</i>	15-20 $\mu\text{g/mL}$	[54]

2.4 Die Fibrinogen- γ -Kette

Die Fibrinogen- γ -Kette (FGG) spielt in der biologischen Aktivität des Fibrinogens eine wichtige Rolle. So findet die Bindung von Zellen, Wachstums- und Koagulationsfaktoren über die γ -Kette statt [55]. FGG ist mit 411 Aminosäuren und 46,5 kDa die leichteste aller Fibrinogen-Ketten [56]. Sie besitzt eine Glykosylierung am Asparagin 52 [57]. Neben dieser Hauptform, auch γA -Kette genannt, gibt es noch eine aus 427 Aminosäuren bestehende alternative Splicingvariante. Bei der sogenannte γ' -Form sind die letzten vier Aminosäuren (AGDV) durch 20 andere Aminosäuren (VRPEHPAETEDSLYPEDDL) ersetzt.

Die γ' -Kette nimmt ca. 8 % der γ -Kettenpopulation ein [58]. $\gamma\text{A}/\gamma'$ -Heterodimere machen ca. 8 %-15 % der γ - γ -Dimere aus [59]. Der Anteil an γ'/γ' -Homodimeren beträgt weniger als 0,5 %. Polymerisiert Fibrinogen aus den verschiedenen Splicingvarianten aus, besitzen die entstehenden Fibrinnetzwerke unterschiedliche mechanische und biologische Eigenschaften. Fibrin welches $\gamma\text{A}/\gamma'$ -Heterodimeren besitzt, weist, im Vergleich zu Fibrin mit $\gamma\text{A}/\gamma\text{A}$ -Dimeren, dünne Fibrinfasern und eine geringe Porengröße auf (Abbildung 5). Des Weiteren läuft die Polymerisation von Fibrin mit $\gamma\text{A}/\gamma'$ -Heterodimeren langsamer ab [59].

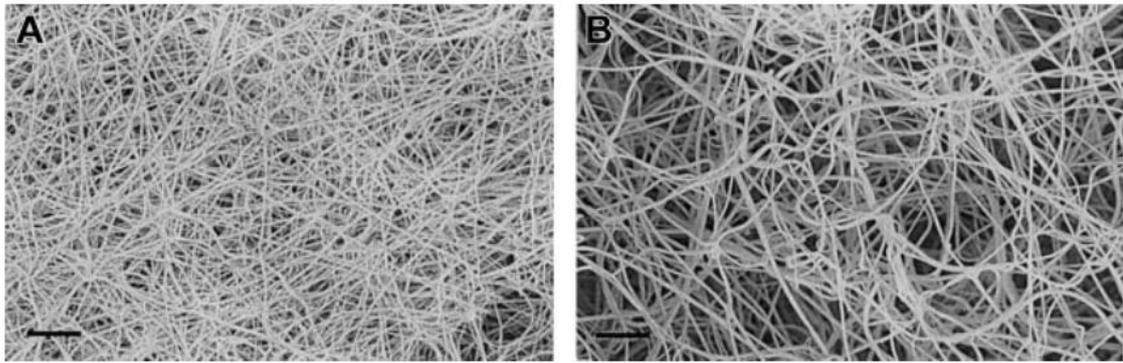


Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopaufnahme von Fibrin-Gerinnenseln mit unterschiedlichen γ -Varianten (A: $\gamma A/\gamma'$, B: $\gamma A/\gamma A$ -Dimere) [59]

Ein weiterer Unterschied ist, dass $\gamma A/\gamma'$ -Fibrin *in vitro* resistenter gegenüber Fibrinolyse ist [60]. Diese Fibrinform steht demnach vermutlich im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Thrombose oder koronaren Herzkrankheiten [60], [61].

FGG besitzt viele zentrale biologische Eigenschaften für Fibrinogen bzw. Fibrin. Die Stabilisierung des Fibrinnetzwerkes durch Faktor XIII erfolgt beispielsweise hauptsächlich zwischen den γ -Ketten [62], [63]. Darüber hinaus besitzt FGG einige Bindestellen für Integrine, welche die Bindung von verschiedenen Zelltypen vermitteln. FGG kann über die $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrinbindestellen an Thrombozyten binden und nimmt so an der Thrombozytenaggregation in der Hämostase teil [55]. Über die $\alpha_v\beta_3$ -Integrinbindestelle werden Bindungen von Fibroblasten, Leukocyten, Tumor- und Endothelzellen vermittelt [64]. Leucocyten können auch mittels des Integrins $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1) an FGG binden. Diese Bindung ist wichtig für die Rekrutierung von Phagozyten während Entzündungsreaktionen [55]. Einen Überblick über die Lokalisation und Eigenschaften der Bindestellen gibt Abbildung 6.

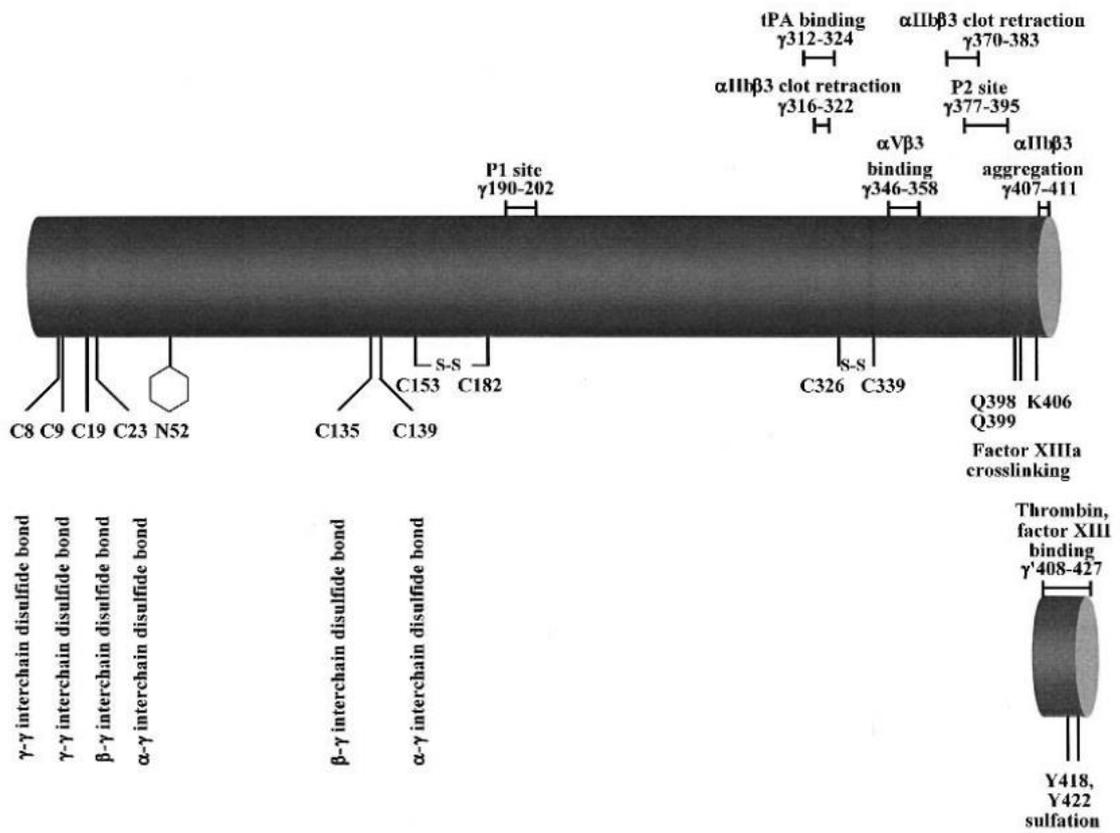


Abbildung 6: Schematischer Überblick über Bindestellen auf der FGG [55]

3 Arbeiten mit *Komagataella phaffii*

3.1 Der pPIC9K-FGG Expressionsvektor

3.1.1 Konstruktion des Expressionsvektors

Für die rekombinante Produktion der FGG wurde die methylo-trophe Hefe *Komagataella phaffii* (*K. phaffii*) (syn. *Pichia pastoris*) gewählt. Diese Hefe ist in der Lage Proteine zu falten und posttranslational zu modifizieren. Des Weiteren ist eine Sekretion des rekombinant produzierten Proteins in das Kultivierungsmedium möglich, was das Downstream-Processing des Proteins erleichtert. Im Jahre 2008 erhielt die Hefe zudem von der US *Food and Drug Administration* den *generally regarded as safe* (GRAS) Status [65].

Zur Expression der humanen γ A-Kette in *K. phaffii* wurde die Gensequenz basierend auf der Veröffentlichung von Rixon *et al.* [66] verwendet. Die Sequenz entspricht dabei dem reifen Protein (Aminosäure 27-437). Da die Sequenz jedoch für ein humanes Protein codiert, kann es, durch Unterschiede in der *Codon Usage* zum Produktionsorganismus *K. phaffii*, zu niedrigen Expressionsraten oder sogar zu einem Abbruch der Translation kommen. Um eine optimale Translation des Zielproteins zu gewährleisten, wurde in einem ersten Schritt die humane *fgg*-Gensequenz mithilfe der Webdatenbank des Kazusa DNA Research Institutes mit dem *Codon Usage* von *K. phaffii* harmonisiert. Im Gegensatz zur Codon Optimierung werden bei der Codon Harmonisierung in der angepassten Sequenz seltenere Codons weiterhin durch seltene Codons ersetzt. Diese gewollte, schon in der Ursprungssequenz vorgesehene, Verlangsamung der Translation kann eine wichtige Bedeutung für die korrekte Faltung des Proteins haben [67].

Mit dem *Codon Adaption Index Calculator* von BiologicsCorp. wurde ein *Codon Adaption Index* (CAI) von 0,82 bestimmt. Der CAI ist ein Maß dafür, wie gut das *Codon Usage* der eingebrachten Gensequenz an das Expressionssystem angepasst ist. Der CAI kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei hohe Werte eine gute Anpassung widerspiegeln [68].

Die Sequenz wurde nach der Anpassung weiterhin auf unerwünschte Motive, wie Haarnadelstrukturen, oder unerwünschte Restriktionsstellen untersucht. Anschließend wurden, unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters, am 5'-Terminus der Gensequenz eine *EcoRI* und am 3'-Terminus eine *NotI* Restriktionsschnittstelle eingefügt. Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind für die Umklonierung der Sequenz in den Zielvektor wichtig. Die Gensequenz wurde anschließend von der Firma Life Technologies Inc. synthetisiert. Die Sequenz des synthetisierten Gens ist im Anhang dargestellt.

Als Zielvektor wurde der *K. phaffii*-Expressionsvektor pPIC9K (Firma Life Technologies Inc.) gewählt. Der Vektor ermöglicht die Integration des Zielgens unter der Kontrolle des starken, Methanol-abhängigen *aox1*-Promoters. Durch die Verwendung des induzierbaren *aox1*-Promoters können Wachstums- und Produktionsphasen streng voneinander getrennt werden. Dieses ermöglicht hohe Biomassen, was für die Produktion von rekombinanten Proteinen vorteilhaft ist [69].

Der Expressionsvektor pPIC9K trägt das Gen der Histidinol-Dehydrogenase (*his4*-Gen) welches die Histidinauxotrophie bestimmter *K. phaffii* Stämme (HIS-Stämme) komplementiert. Die Komplementation des Gens dient hierbei als Selektionsmarker nach der Transformation, da nur komplementierte Klone das Zielgen tragen können. Zudem enthält das Plasmid eine *S. cerevisiae*- α -Faktor-Preprosignalsequenz, welches die Sekretion des rekombinanten Proteins ins Kultivierungsmedium ermöglicht. Außerdem trägt der Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen, welches in *K. phaffii* eine Resistenz gegen das Antibiotikum Genetecin (G-418) vermittelt. Klone mit einer erhöhten Resistenz gegen Geneticin weisen oft eine Mehrfachintegration der Expressionskassette auf. Die Integration mehrerer Expressionskassetten korreliert wiederum oft mit einer erhöhten Proteinproduktion. Die Klonierung des Gens in die *multiple cloning site* des Plasmids pPIC9K erfolgte an den Schnittstellen *EcoRI* und *NotI*. Der Restriktionsverdau und die Ligation erfolgten nach den im Anhang beschriebenen Methoden. Die Transformation des ligierten Vektors erfolgte in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen (Firma IBA,

Göttingen). Nach Amplifikation des Vektors in *E. coli* wurde die DNA einzelner Klone isoliert und von der Firma MWG Operon sequenziert.

Die schematische Plasmidkarte des pPIC9K-FGG-Konstruktes ist in Abbildung 7 dargestellt.

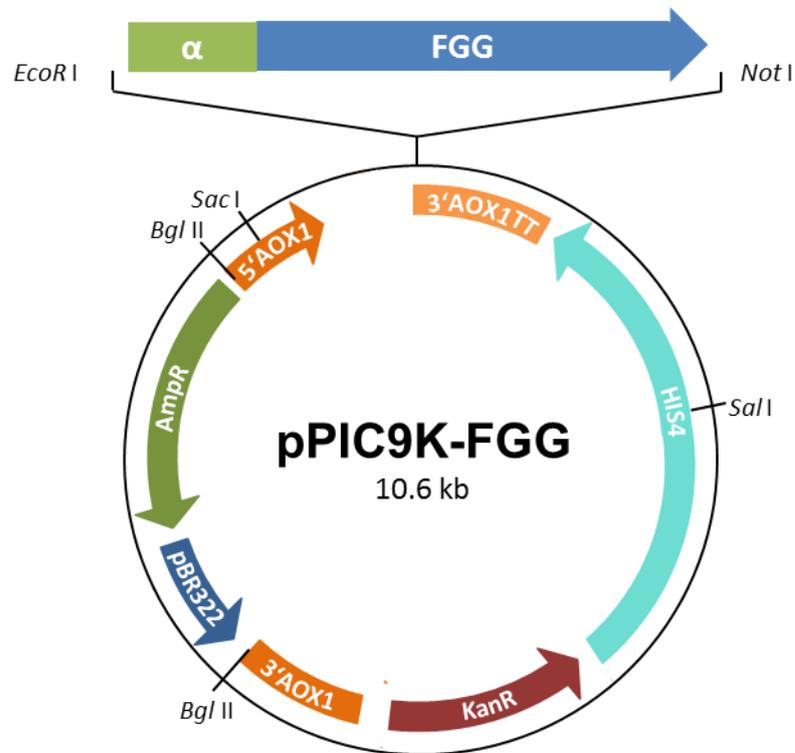


Abbildung 7: Schematische Darstellung des pPIC9K-FGG Konstruktes (nach [70])

3.1.2 Transformation und Überprüfung des *methanol utilization* Phänotyps

Die Degradation von rekombinant produzierten Proteinen in Hefen stellt oft ein Problem dar [47]. Aus diesem Grund wurde als Produktionsstamm der histidinauxotrophe und Protease-A-defiziente *Komagataella phaffii* Stamm SMD1168 ausgewählt.

Anders als bei Expressionssystemen wie *E. coli*, wird das eingebrachte Gen in *K. phaffii* über homologe Rekombination fest in das Wirtsgenom integriert. Für das Einbringen der Gensequenz wird der Vektor mithilfe von Restriktionsenzymen linearisiert. Durch die Wahl der Schnittstelle wird auch der Ort der Integration bestimmt. Der Vektor pPIC9K kann sowohl in den *aox1*- als auch in den *his*-Lokus eingebracht werden. Über die Restriktionsschnittstelle *SalI* erfolgt eine Insertion in

den *his*-Lokus. Eine Integration in den *aox1*-Lokus wird durch Linearisierung des Vektors mit den Restriktionsenzymen *Sac* I und *Bgl* II erreicht (Abbildung 7).

Durch Integration des Vektors in den *aox1*-Lokus kann sich jedoch der *methanol utilization* (Mut)-Phänotyp ändern. Die Verwertung von Methanol wird bei *K. phaffii* durch die Alkoholoxidasen 1 und 2 (AOX1 und AOX2) ermöglicht, wobei AOX1 die höhere Methanol-oxidierende Aktivität besitzt [71]. Durch den Mut-Phänotyp wird beschrieben, ob *aox1* intakt (Mut⁺-Phänotyp) oder beschädigt (Mut^s-Phänotyp) ist.

Klone mit dem Mut⁺-Phänotyp können schnell auf Methanol wachsen. Dieser Phänotyp ist jedoch sensitiv gegenüber hohen Methanolkonzentrationen, sodass die Methanolkonzentration während einer Kultivierung streng überwacht werden muss. Beim Phänotyp Mut^s (*methanol utilization slow*) kann Methanol nur noch mithilfe des AOX2 Enzyms verwertet werden. AOX2 metabolisiert Methanol jedoch nur langsam, was sich in längeren Generationszeiten widerspiegelt. Der Mut^s-Phänotyp ist im Gegensatz zum Mut⁺-Phänotyp nicht sensitiv gegenüber hohen Methanolkonzentrationen, was einen *Scale-Up* von Kultivierungsprozessen vereinfacht. Welcher Phänotyp höhere Mengen an rekombinantem Protein produziert, muss für jedes zu produzierende Protein einzeln empirisch überprüft werden.

Der Protease-A-defiziente SMD1168 Stamm besitzt den Phänotyp Mut⁺. Durch Integration von pPIC9K, welcher mit *Sac* I oder *Sal* I linearisiert wurde, kommt es zu keiner Veränderung des ursprünglichen Phänotyps. Die Integration der Gensequenz erfolgt dabei über ein einfaches *crossover*. Wird der Vektor mit dem Restriktionsenzym *Bgl* II linearisiert, kann es in 10-20 % zu einem doppelten *crossover* kommen. Dabei wird die für das *aox1*-Gen codierende Region durch die Expressionskassette ersetzt und der resultierende Klon zeigt den Mut^s-Phänotyp.

Der pPIC9K-FGG-Vektor wurde in drei einzelnen Ansätzen mit je *Bgl* II, *Sac* I oder *Sal* I linearisiert und in die Zellen eingebracht. Die Transformation erfolgte über Elektroporation nach dem Protokoll von Lin-Cereghino [72].

Die Klone wurden anschließend auf Minimalmedium-Agarplatten ohne Histidin ausplattiert. Um Reinkulturen zu isolieren, wurden die Klone zwei bis drei Tage nach der Transformation mittels eines Vereinzelungsausstriches noch einmal ausplattiert.

Einen Überblick über die möglichen entstehenden Phänotypen gibt die Tabelle 5.

Tabelle 5 : Mögliche Phänotypen des Stammes SMD1168 durch Integration von pPIC9K

Restriktionsenzym	Integrationsort	Mut-Phänotyp
<i>Sal</i> I	<i>his</i>	Mut ⁺
<i>Sac</i> I	<i>aox1</i>	Mut ⁺
<i>Bgl</i> II	<i>aox1</i>	Mut ⁺ und Mut ^S

Mittels Kolonie-PCR sollten sowohl der erfolgreiche Einbau der Expressionskassette als auch der Mut-Phänotyp überprüft werden. Bei der Kolonie-PCR wird im Gegensatz zur klassischen PCR keine isolierte oder aufgereinigte DNA verwendet. Die genomische DNA wird direkt durch Aufkochen der Zellen im PCR-Ansatz freigesetzt und amplifiziert (Abschnitt 7.1.11). Die amplifizierte DNA wird mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und durch Anfärben mittels DNA-interkalierender Farbstoffe dargestellt (Abschnitt 7.1.2). In Abbildung 8 ist beispielhaft das Ergebnis einer Kolonie-PCR für eine Transformation dargestellt, bei der ein *Bgl* II-linearisiertes Plasmid verwendet wurde.

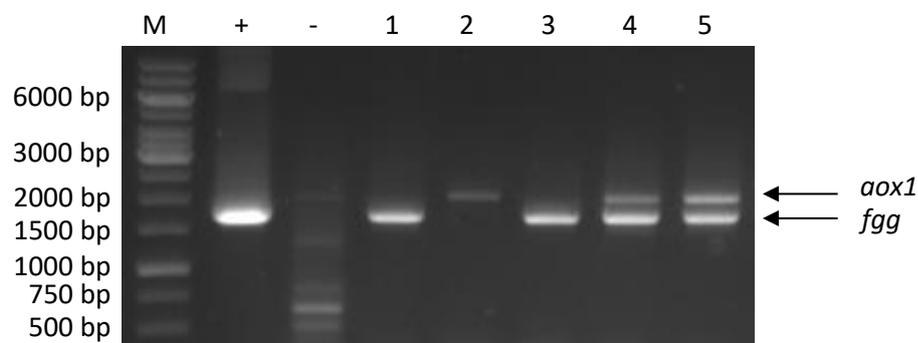


Abbildung 8: Ergebnisse der Kolonie-PCR zur Überprüfung des Mut-Phänotyps verschiedener Klone (1-5), + pPIC9K mit Insert, - pPIC9K ohne Insert

Die Banden bei 2,2 kb entsprechen dabei dem Wildtyp-*aox1*-Gen. Die Banden bei 1,7 kb entsprechen dem *fgg-Insert* und den flankierenden *aox*-Sequenzen. Abbildung 4.3 zeigt, dass die Klone 4 und 5 sowohl das *aox1*-Gen als auch das *FGG-Insert* aufweisen. Diese Klone besitzen den Mut⁺-Phänotyp. Die Klone 1 und 3 tragen nur das *fgg*. Das *aox1*-Gen wurde demnach durch die Expressionskassette ersetzt und die Klone weisen daher den Mut^s-Phänotyp auf.

3.2 Screening von *K. phaffii* Klonen hinsichtlich der Proteinproduktion

Da die Produktion von rekombinanten Proteinen mit *K. phaffii* von Klon zu Klon schwankt, ist es wichtig besonders viele Klone zu screenen. Während der praktischen Arbeiten wurden über 200 Klone mit verschiedenen Mut-Phänotypen, und FGG-Integrationsorten gescreent. Im weiteren Verlauf werden jedoch alle weiteren Versuche exemplarisch nur anhand von Mut⁺- und Mut^s-Klonen mit Bgl II linearisiertem Plasmid dargestellt.

Das Screening erfolgte einerseits in einem Orbitalschüttelinkubator bei 200 rpm und in schikanierten Schüttelkolben mit 10 % Arbeitsvolumen um einen möglichst hohen Sauerstoffeintrag zu garantieren. Um möglichst viele Klone parallel screenen zu können, wurde ebenfalls ein Kultivierungsprotokoll für Mikrotiterplatten und Agarplatten („Yeastern Blot“, [73]) getestet. Kultivierungen wurden sowohl in definierten als auch in komplexen Medien durchgeführt (Abschnitt 7/Abschnitt 8.2). Erste Screenings erfolgten bei 30 °C in gepuffertem definiertem Medium (pH 6) mit Glycerol als Kohlenstoffquelle. Bei einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 2-6 rel. AU wurden die Zellen zentrifugiert und in methanolhaltigem Komplexmedium (Methanol-Endkonzentration von 0,5 % (v/v)) resuspendiert. Dabei wurde bei Mut⁺-Klonen eine Inokulationsdichte von 1 rel. AU und bei Mut^s-Klonen von 5 rel. AU eingestellt. Um die Methanolkonzentration konstant zu halten, wurde alle 12 Stunden Methanol zugegeben (0,5 % (v/v)). Die Kultivierung wurde über 96 Stunden geführt und alle 12 Stunden Proben gezogen.

Das *fgg*-Gen wurde so in den Vektor kloniert, dass das Protein ins Medium sekretiert werden sollte. Für die Screenings wurden neben den Kulturüberständen

auch die Zellysate für eine Bilanzierung der Proteinproduktion berücksichtigt, um die Effektivität der Sekretion beurteilen zu können.

Die Lyse der Zellen erfolgte mit Glaskügelchen mittels mechanischem Zellaufschluss (Abschnitt 7.2.5). Das zellfreie Kultivierungsmedium wurde mittels TCA-Fällung aufkonzentriert. Die Lysate und die aufkonzentrierten Kulturüberstände wurden mittels SDS-PAGE (Abschnitt 7.6.2) und Coomassie-Brillant-Blau-Färbung analysiert (Abschnitt 7.6.3). Abbildung 9 zeigt exemplarisch ein Polyacrylamid-Gel von einem Mut^S-(A) und Mut⁺-Klon (B). Um die Proteinproduktion pro Biomasse besser vergleichen zu können, wurden die Zellysate auf eine OD_{600nm} von 10 rel. AU normalisiert.

Mit dem ProtParam *Tool* von ExPASy wurden für das FGK ein theoretisches Molekulargewicht von 49,25 kDa berechnet.

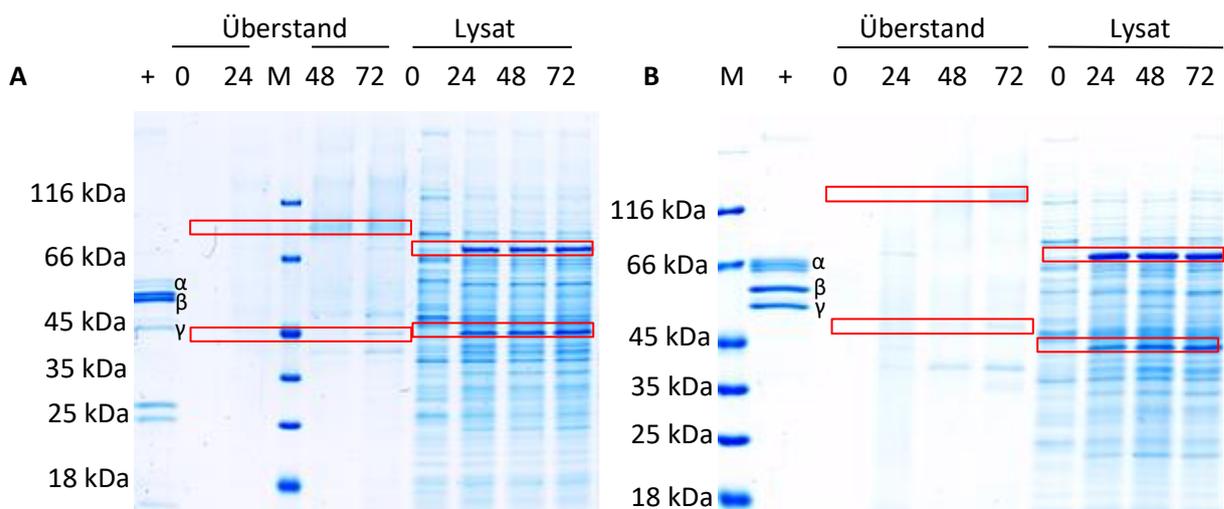


Abbildung 9: Screening eines Mut^S-(A) und eines Mut⁺-Klones (B) hinsichtlich FGK-Proteinproduktion 0, 24, 48 und 72 Stunden nach der Induktion. Aufgetragen sind sowohl die gefällten zellfreien Kulturüberstände und die Zellysate. Als Positivkontrolle ist humanes Fibrinogen (+) aufgetragen.

Im Zellysate ist zu erkennen, dass bei ca. 70 kDa ein Protein überproduziert wurde. Bei diesem handelt es sich um AOX (durch MALDI-Analyse bestätigt). Des Weiteren wurde bei ca. 45 kDa ein weiteres Protein nach der Induktion überproduziert. Im gefällten Zellkulturüberstand ist eine schwache Proteinproduktion bei ca. 100 kDa und 40 kDa nach der Induktion zu erkennen. FGK sollte laut theoretischer Berechnungen ca. 50 kDa schwer sein. Glykosylierungen durch *K. phaffii* oder unvollständige Translation könnte das Molekulargewicht aber von

dem theoretisch berechneten Wert abweichen. Um zu überprüfen ob es sich bei einem der produzierten Proteine tatsächlich um FGG handelte, wurde ein Western Blot durchgeführt. Die immunologische Detektion erfolgte mit einem Antikörper spezifisch für humanes FGG (Santa Cruz Biotechnology Inc., USA). Die immunologische Färbung erfolgte mit einem Sekundärantikörper, welcher mit HRP-konjugiert war, und TMB-Reagenz (Abschnitt 7.6.4). Die Western-Blot-Analysen zeigten, dass keiner der gescreenten Klone FGG produzierte, während die Positivkontrolle nachgewiesen wurde (Abschnitt 8.2). MALDI-Analysen zeigten, dass es sich bei dem überproduzierten Protein um die Alkoholoxidase (AOX) handelte.

Auch durch ein Screening auf Klone mit mehreren Expressionkassetten oder Veränderungen von Kultivierungsparametern (Temperatur und Induktorkonzentration) und Kultivierungsmedien (Zusammensetzung und pH-Wert), konnte die Produktion von FGG nicht nachgewiesen werden (Abschnitt 8.2).

3.2.1 Überprüfung der Transkription

Da mittels Kolonie-PCR bestätigt wurde, dass das *fgg*-Gen in das Genom eingebaut wurde, jedoch trotzdem keine FGG-Produktion zu beobachten war, wurde überprüft, ob die Transkription der *fgg*-Gensequenz fehlerhaft verläuft. Für die Überprüfung wurde ein Mut^s-Klon verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Schüttelkolben bei 30 °C in gepuffertem Komplexmedium. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{600nm} von 5 rel. AU mit einer Methanol-Endkonzentration von 0,5 % (v/v). Bei der Induktion und 3, 24 sowie 29 Stunden nach der Induktion wurden Zellproben entnommen, aufgeschlossen und die RNA isoliert. Die mRNA wurde anschließend unter Verwendung von polyA-Primern in cDNA revers transkribiert (Abschnitte 7.1.8 und 7.1.9). Mittels PCR mit *fgg*-spezifischen Primern wurde die Anwesenheit von *fgg*-mRNA untersucht. Abbildung 10 zeigt die erhaltenen Amplifikate nach Auftrennung per Gelelektrophorese. Als Positivkontrolle wurde das aufgereinigte pPIC9K-FGG-Plasmid verwendet.

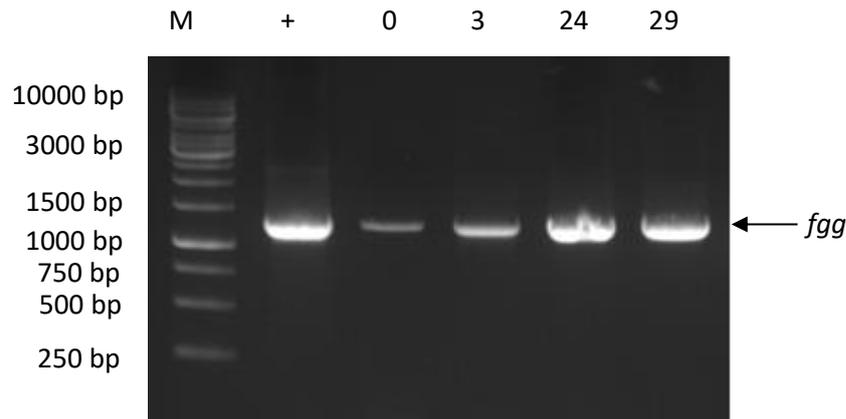


Abbildung 10: Ergebnisse der Überprüfung der Transkription 0, 3, 24 und 29 Stunden nach der Induktion. + pPIC9K-FGG-Plasmid

Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, konnte in allen Proben *fgg*-mRNA isoliert werden. Dieses bedeutet, dass das pPIC9K-FGG-Plasmid korrekt in das Wirtsgenom integriert wurde und in mRNA transkribiert werden kann. Es wurden jedoch *fgg*-spezifische Primer eingesetzt, welche nur die vollständige *fgg*-mRNA amplifizieren. Da es sich bei diesem Experiment um ein rein qualitatives handelt, müssten noch weitere quantitative Analysen, wie Northern Blots, erfolgen. Mithilfe dieser Analysen könnte eine Aussage getroffen werden, ob das hier detektierte vollständige Transkript oder ob unvollständige Transkripte den Großteil der gesamten mRNA-Population darstellen.

Ein weiterer Punkt ist, dass die Anwesenheit von mRNA nicht mit der Menge an produziertem Protein korrelieren muss, da zu viele Faktoren, wie Ribosomenbelegung während der Translation oder die Balance zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau, diesen Zusammenhang erschweren [74]. Die Anwesenheit von mRNA könnte jedoch ein erster Hinweis sein, dass die fehlende Produktion von FGG vermutlich mit der Translation oder Stabilität des produzierten Proteins und nicht mit der Transkription zusammenhängt.

Fazit

Die γ A-Kette des Fibrinogens konnte mit *K. phaffii* nicht produziert werden. Optimierungsversuche wie das Screening von Klonen mit mehreren Expressionskassetten, Variation des Mediums, des pH-Wertes, der Temperatur sowie der Konzentration des Induktors Methanol führten zu keiner erfolgreichen Produktion. Der Einbau der *fgg*-Sequenz in das Genom und die Bildung von *fgg*-mRNA konnte zwar nachgewiesen werden, was jedoch keinen Beweis darstellt, dass auch eine erfolgreiche Translation stattfinden muss. In weiteren Versuchen müsste überprüft werden, ob die Mehrzahl der gebildeten mRNAs unvollständige Transkripte sind.

Da FGG mit dem bisherigen Expressionssystem nicht produziert werden konnte, musste die Prozessstrategie verändert werden. Es wurde dabei beschlossen, nicht weiter mit als *K. phaffii* Expressionssystem zu arbeiten, sondern *E. coli* als neues Expressionssystem zu verwenden.

4 Produktion von FGG mit *Escherichia coli*

E. coli ist einer der best erforschten Organismen zur Herstellung rekombinanter Proteine, welcher mit einer Vielzahl von Methoden manipuliert werden kann, um Proteine in hoher Ausbeute und kostengünstig herstellen zu können. Nachteilig ist jedoch, dass manche rekombinante Proteine als unlösliche *inclusion bodies* (IB) produziert werden. Dieses macht ein *Refolding*, also eine Rückfaltung des Proteins in seine natürliche Form, notwendig. Im Vorfeld der praktischen Arbeiten wurde daher eine Konzeptstrategie entwickelt (Abbildung 11).

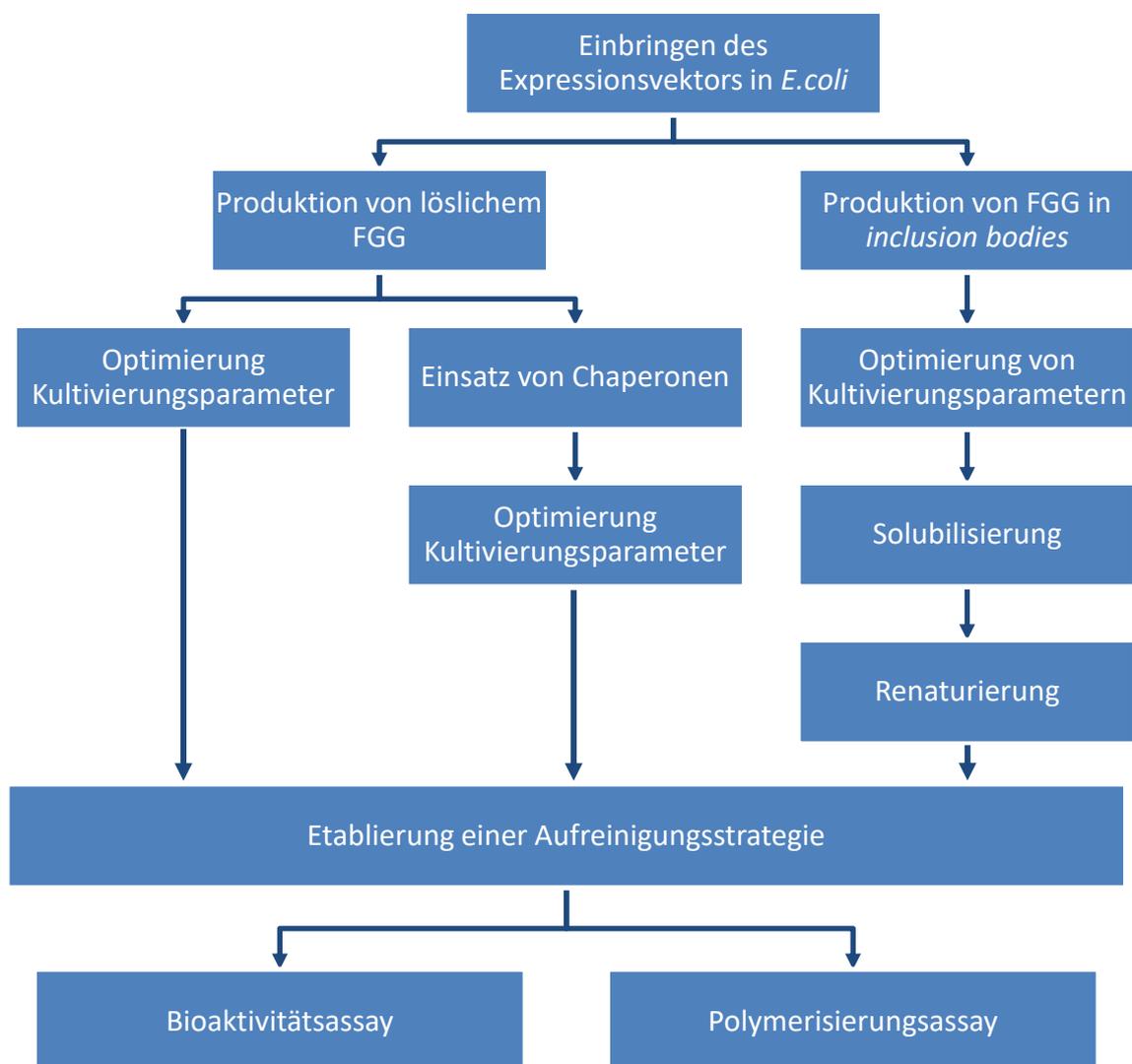


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Prozessstrategie

Die Produktionsstrategie wurde von vorne herein zweigeteilt. Zum einen sollte versucht werden lösliches FGG durch Optimierung von Kultivierungsparametern

oder Hilfsproteinen (Chaperonen) zu produzieren. Zum anderen sollte FGG aus den *IB* zurückgewonnen und -gefaltet werden. Zur Aufreinigung des Proteins sollte eine Säulenchromatographie angewandt werden. Das gereinigte Protein sollte dann in einem Bioaktivitätsassay in der Zellkultur getestet werden. Zudem sollte überprüft werden ob rekombinantes FGG zu einem Netzwerk polymerisiert werden kann.

FGG konnte bereits in anderen Arbeiten rekombinant in *E. coli* produziert werden. Die vollständige γ -Kette konnte in Ausbeuten von 15-20 $\mu\text{g/mL}$ Kulturbrühe in *IBs* produziert werden [54]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die in *E. coli* produzierte γ -Kette Domänen enthält, welche sich unabhängig falten können [75], [76]

4.1 Der pET-16b-FGG Expressionsvektor

4.1.1 Konstruktion des Expressionsvektors

Zur Expression der humanen γA -Kette in *E. coli* wurde analog zu dem *K. phaffii* -Konstrukt die Sequenz basierend auf der Veröffentlichung von Rixon *et al.* [66] verwendet. Die Sequenz entspricht dabei der des reifen FGG-Proteins (Aminosäure 27-437).

Um eine schnelle und effiziente Translation und somit eine hohe Expressionsrate zu erreichen, wurde das *Codon Usage* an das Expressionssystem *E. coli* angepasst. Die Codon Optimierung und die Überprüfung auf Motive, welche sich negativ auf die Translation auswirken könnten, wurden von der Firma Life Technologies durchgeführt. Der CAI konnte somit von 0,62 auf 0,92 gesteigert werden. Um eine Umklonierung in den Zielvektor zu ermöglichen, wurden am 5'-Terminus der optimierten Gensequenz eine *XhoI* und am 3'-Terminus eine *BamHI* Restriktionsschnittstelle eingefügt. Die Sequenz des von der Firma Life Technologies synthetisierten Gens ist im Anhang (Abschnitt 8.1) dargestellt.

Um FGG mit dem Expressionssystem *E. coli* zu produzieren, wurde der Expressionsvektor pET-16b (Firma Merck Millipore) gewählt. Der Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen als Selektionsmarker. Wird der Vektor in ein

Expressionssystem eingebracht, welches die T7-RNA-Polymerase produzieren kann, so wird die Proteinproduktion unter dem starken T7-Promoter ermöglicht.

Um die Aufreinigung und Detektion des Zielproteins zu vereinfachen, wurde die Gensequenz des FGГ im Leserahmen mit der Sequenz für einen N-terminalen Polyhistidin-Affinitäts-Tag (His-Tag) kloniert.

Die Klonierung des Gens erfolgte in die *multiple cloning site* an den Schnittstellen *EcoRI* und *NotI*. Der Restriktionsverdau und die Ligation erfolgten nach den im Anhang beschriebenen Methoden. Die Transformation des ligierten Vektors erfolgte mit *E. coli one shot chemically competent* Top10 Zellen. Nach Amplifikation des Vektors in *E. coli* wurde die DNA einzelner Klone isoliert. Die korrekte Basenabfolge der isolierten DNA wurde im Anschluss per Sequenzierung von der Firma MWG Operon bestätigt. Die schematische Plasmidkarte des pET-16b-FGG-Konstruktes ist in Abbildung 12 dargestellt.

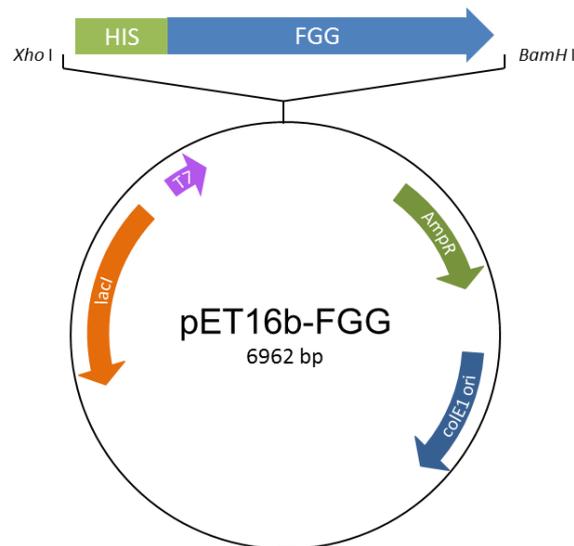


Abbildung 12: Schematische Darstellung des pET16b-FGG-Expressionvektors

4.1.2 Produktionsstamm und Transformation

Als Produktionsstamm wurde der *Escherichia coli* Stamm TunerTM (DE3) ausgewählt. Der TunerTM (DE3) ist eine Mutante des BL21(DE3) Stamms [77]. Die BL21 (DE3)-Stämme sind Lon- und OmpT-proteasedefiziente Stämme. Durch die

Inaktivierung der beiden Proteasen ist die Degradierung abnormaler oder extrazellulärer Proteine (z.B. während der Aufreinigung) reduziert [78]. Des Weiteren tragen diese Stämme eine Kopie des T7-RNA-Polymerase Gens, welches unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promoters steht und durch Lactose oder Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden kann [77]. Das T7-Expressionssystem bietet den Vorteil, dass es sehr stark ist, sodass das rekombinante Protein 40-50 % der gesamten Zellproteinkonzentration ausmachen kann [79]. Nachteilig ist jedoch, dass IPTG oder Lactose sowohl durch Diffusion als auch über die Lactosepermease aufgenommen werden können. Eine gleichmäßige Induktion aller Zellen ist somit durch die unterschiedlichen Aufnahmemöglichkeiten nicht möglich [80]. Im Tuner™ (DE3) Stamm ist das Lactosepermeasegen *lacZY* deletiert. Dieses ermöglicht den Zellen in der Kultur eine gleichmäßige Aufnahme des Induktors per Diffusion, wodurch eine gezielte konzentrationsabhängige Steuerung der Induktion möglich ist [81]. Mit der Induktorkonzentration kann die Proteinexpression gezielt eingestellt werden. Dieses kann von Vorteil sein, da niedrige Expressionslevel die Löslichkeit des rekombinanten Proteins erhöhen können [82].

Die Transformation des Vektors erfolgte mittels Hitzeschock (Abschnitt 7.1.6) mit chemisch kompetenten *E. coli* Tuner™ (DE3) Zellen welche nach der Transformation auf LB-Ampicillin-Agar-Platten kultiviert wurden. Nach der Transformation wurden die Klone mittels eines Vereinzelausstriches noch einmal ausplattiert um Reinkulturen zu isolieren.

4.1.3 Proteinproduktion und Überprüfung der Proteinidentität

Um zu überprüfen ob FGG generell von *E. coli* produziert werden kann, wurde der rekombinante Stamm im Schüttelkolben in komplexem LB-Miller-Medium und definiertem ZYP-Medium bei 37 °C in einem Orbitalschüttelschrank bei 180 rpm kultiviert (Abschnitt 7.3.3). Es wurde ein Arbeitsvolumen von 10 % gewählt. Laut

Herstellerangaben (Merck Millipore) erfolgte die Induktion mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG bei einer OD_{600nm} von 0,6 rel. AU.

Zum Nachweis der FGG-Produktion wurden während der Kultivierung Zellen geerntet, in Lysepuffer resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen (Anhang). Die Zellysate wurden auf eine OD_{600nm} von 10 rel. AU normalisiert, um die Proteinproduktion pro Biomasse besser vergleichen zu können. Nach dem Aufschluss wurde die lösliche Fraktion per Zentrifugation von den unlöslichen *IB* separiert, um zu überprüfen in welcher Form das FGG gebildet wurde. Die *IB* wurden nach der Zentrifugation in Lysepuffer resuspendiert. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Färbung mittels Coomassie-Brillant-Blau analysiert (Abschnitt 7.6.2 und 7.6.3) (Abbildung 13).

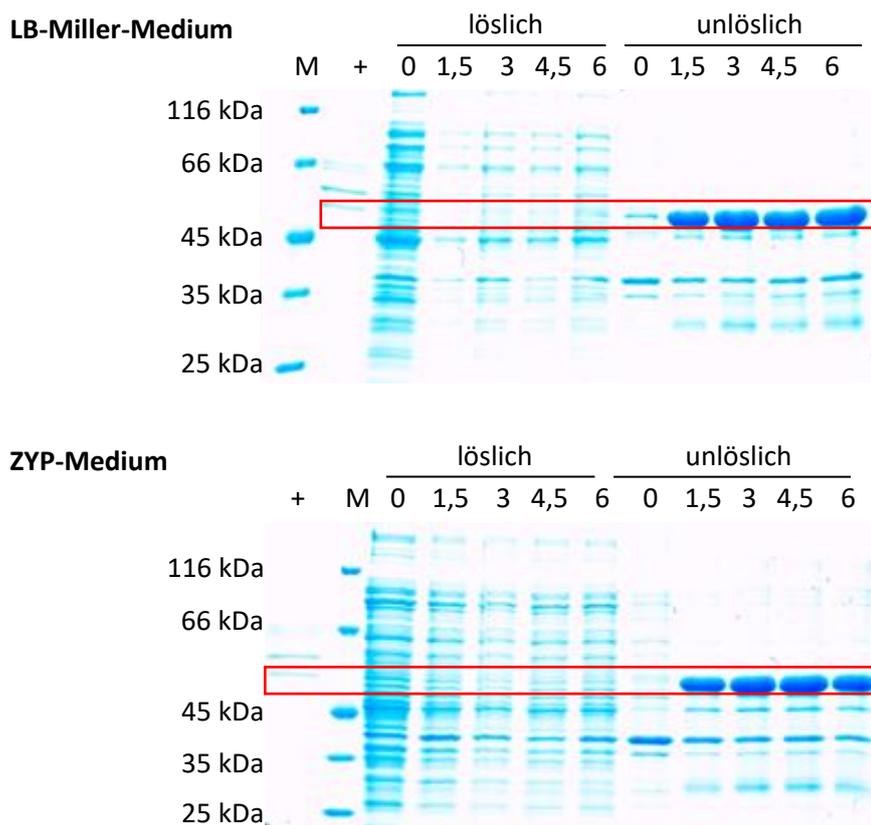


Abbildung 13: Screening eines *E. Coli*-Klons hinsichtlich FGG-Proteinproduktion 0, 1,5, 3, 4,5 und 6 Stunden nach der Induktion. Aufgetragen sind die löslichen und unlöslichen Fraktionen. Als Positivkontrolle ist humanes Fibrinogen (+) aufgetragen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass in der löslichen Fraktion nach der Induktion mit IPTG kein Protein überproduziert wird. Jedoch wird in der unlöslichen Fraktion 1,5 h nach der Induktion ein Protein mit einer Größe von 50 kDa überproduziert.

Das theoretisch berechnete Molekulargewicht des his-getaggtem FGG beträgt 49,72 kDa. Es kann daher angenommen werden, dass es sich bei dem überproduzierten Protein um FGG handelt.

Des Weiteren ist in der OD-Normalisierten SDS-Page-Analyse zu erkennen, dass die Verwendung von komplexem oder definiertem Medium während der Kultivierung keinen Unterschied bezüglich der Proteinproduktion zu erkennen ist.

Ein Vorteil des definierten Mediums ist, dass die Induktion noch gezielter gesteuert werden kann. Da komplexe Medien Spuren von Lactose enthalten, wirkt dieses schon vor der eigentlichen Induktion induzierend auf die Zellen (Basalexpression) (vgl. Abb. 5.3 0 h Probe LB-Medium). Bei Komplexbestandteilen, wie Hefeextrakt, können Chargenschwankungen auftreten und Kultivierungen können so nicht reproduzierbar durchgeführt werden. Alle weiteren Kultivierungen wurden aus diesen Gründen nur noch im definierten ZYP-Medium durchgeführt.

Um zu überprüfen ob es sich bei dem überproduziertem Protein tatsächlich um FGG handelt, wurden die Proben mittels Western Blot analysiert. Die immunologische Detektion erfolgte mit einem Antikörper spezifisch für die humane FGG (von Santa Cruz). Der Western Blot und das dazugehörige mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbte Polyacrylamid-Gel sind in Abbildung 14 dargestellt.

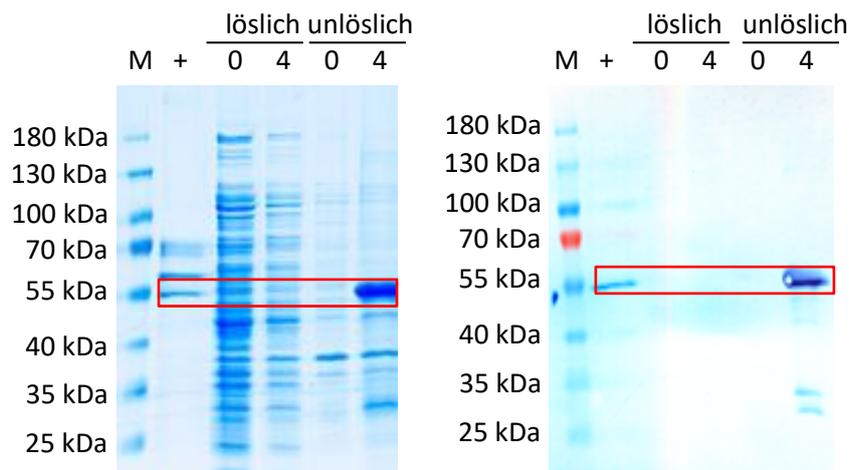


Abbildung 14: Überprüfung der Proteinidentität nach 0 und 4 Stunden nach der Induktion. Aufgetragen sind die unlöslichen und löslichen Fraktionen. Als Positivkontrolle ist humanes Fibrinogen (+) aufgetragen.

Wie zu erkennen ist, wurde das überproduzierte Protein bei 50 kDa immunologisch mit dem spezifischen FGG-Antikörper als FGG detektiert. Die Identität des Proteins konnte ebenfalls mittels massenspektroskopischer Proteinanalyse bestätigt werden. Durch den Antikörper konnten noch zwei weitere Proteine bei 35 und 25 kDa detektiert werden. Bei diesen könnte es sich um proteolytisch abgebaute Fragmente des FGGs handeln. Zur Klärung müsste man jedoch weitere Analysen vornehmen. Prinzipiell kann festgehalten werden, dass FGG mit *E. coli* im Gegensatz zu *K. phaffii* exprimiert werden kann.

4.2 Produktion von löslichem FGG

Da FGG als natives Protein eingesetzt werden soll, wäre die Expression eines löslichen Proteins von Vorteil. IBs haben zwar den Vorteil, dass sie leicht von der löslichen Fraktion getrennt und aufgereinigt werden können, jedoch müssen aufwändige Solubilisierungs- und Renaturierungsschritte angeschlossen werden, um das Protein in seine native Form zurückzubringen. Bei diesen Schritten kann die Zurückgewinnung der biologischen Aktivität und der korrekten Faltung nicht vollständig garantiert werden. Unter Umständen kann es ebenfalls sehr lange dauern, bis eine funktionierende Solubilisierungs- bzw. Renaturierungsstrategie gefunden wird. [83]

Aus diesen Gründen sollte die Produktion von löslichem Protein versucht werden. Die Produktion von löslichem Protein kann durch verschiedene Parameter wie die Kultivierung der Zellen bei niedriger Temperatur, die Induktorkonzentration, das Verändern der Proteinsequenz durch das Einfügen von Löslichkeitstags oder die Koproduktion von Chaperonen beeinflusst werden. [83]

In dieser Arbeit wurde auf das Anhängen eines Löslichkeitstags an das FGG verzichtet, da das Protein als reines natives Protein eingesetzt werden sollte.

4.2.1 Einfluss von Temperatur und Induktorkonzentration

Zuerst sollte der Einfluss der Kultivierungstemperatur und der Induktorkonzentration evaluiert werden. Es wurden Kultivierungen bei 20 °C und 30 °C durchgeführt und IPTG-Konzentrationen von 0,1 bis 1 mM IPTG verwendet. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte von 0,6 rel. AU. Die Temperatur wurde direkt nach der Induktion gesenkt. In der folgenden Abbildung 15 sind exemplarisch zwei Polyacrylamidgele nach anschließender Färbung mittels Coomassie-Brillant-Blau mit den löslichen und unlöslichen Fraktionen für eine Kultivierung bei 20 °C aufgeführt.

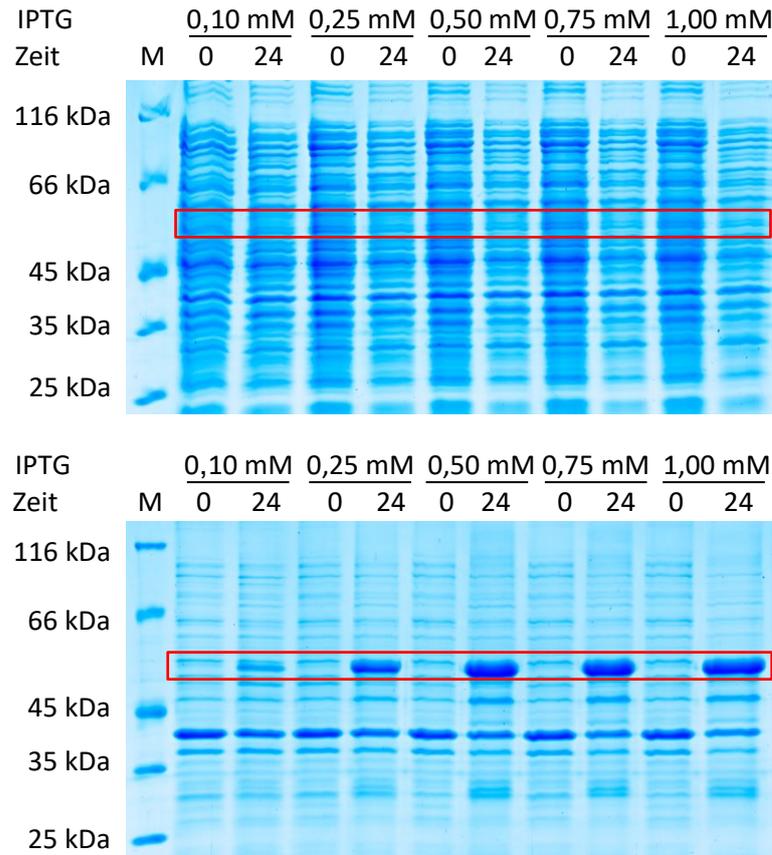


Abbildung 15: Screening eines *E. Coli*- Klons hinsichtlich der FG₂G-Proteinproduktion 0 und 24 Stunden nach der Induktion. Aufgetragen sind die unlöslichen (unten) und löslichen (oben) Fraktionen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass das rekombinante Protein wieder nur in IB gebildet wurde. Auch bei allen weiteren getesteten Temperaturen und Induktorkonzentrationen konnte kein lösliches FG₂G produziert werden (Abschnitt 8.3).

4.2.2 Einfluss von Chaperonen auf die Löslichkeit

Da weder durch niedrige Induktorkonzentrationen noch durch niedrige Temperaturen FG₂G in löslicher Form produziert werden konnte, wurden Chaperone als Faltungshelfer eingesetzt. Chaperone sind Proteine, welche bei der Faltung von neu synthetisierten Proteinen assistieren. Sie wirken als Reparatursystem indem sie falsch gefaltete und aggregierte Proteine erkennen können [84], [85].

Da nicht klar ist, an welcher Stelle die Zellen „Schwierigkeiten“ haben FGG in löslicher Form zu produzieren, wurden verschiedene Chaperon-Kombinationen evaluiert. Verwendet wurde dabei das Chaperon Plasmid Kit der Firma Takara Bio (Abschnitt 6.6).

Dieses Kit enthält fünf Plasmide mit unterschiedlichen Chaperon-Kombinationen. Die Kombinationen sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 6: Chaperonkombinationen

Kombination	Plasmid	Chaperone	Induktor
1	pG-KJe8	dnaK-dnaJ-grpE- groES-groEL	L-Arabinose Tetracyclin
2	pGro7	groES-groEL	L-Arabinose
3	pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	L-Arabinose
4	pG-Tf2	groES-groEL-tig	Tetracyclin
5	pTf16	tig	L-Arabinose

Gemeinsam ist allen Chaperonen in diesem Kit, dass sie eine Affinität für exponierte hydrophobe Bereiche in unvollständig gefalteten Proteinen aufweisen.

Der Triggerfaktor (Tf) befindet sich am Ausgang des Ribosoms und schützt exponierte hydrophobe Bereiche neu synthetisierter Proteine vor falschen Interaktionen und Faltungsprozessen [85], [86]. Nach dem Freisetzen der Polypeptidkette ins Cytosol wird die Faltung des Proteins in seine native Struktur begonnen bzw. fortgesetzt [85]. Hier spielen die Hitzeschockproteine eine wichtige Rolle. Durch Hydrolyse von ATP können diese Hitzeschockproteine synthetisierte Proteine binden und wieder von sich lösen um sie bei der Faltung zu unterstützen [87].

Zu den bekanntesten Vertretern in *E. coli* gehören die DnaK- und GroEL-Familie. Beide Hitzeschockproteine unterstützen Proteine bei der Faltung in dem sie mit Co-Chaperonen wirken. Die Tabelle 7 gibt einen Überblick.

Tabelle 7: Überblick der Co-Chaperone von DnaK und GroEL [85]

Hitzeschockprotein-Familie	Co-Chaperone
DnaK	GrpE, DnaJ
GroEL	GroES

GroEL kann durch seine fassförmige Struktur missgefaltete vollständig synthetisierte Proteine einschließen um günstige Faltungsbedingungen zu schaffen. Im Gegensatz dazu bindet die DnaK-Familie nur kurze Peptidsegmente und kann sowohl mit vollständig synthetisierten als auch mit Polypeptidketten interagieren, welche sich noch am Ribosom befinden. [85], [87]

Die Plasmide wurden parallel zum pET-16b-FGG-Konstrukt per Hitzeschock in den Tuner™ (DE3) eingebracht.

Die Induktion der Chaperone erfolgt dabei nicht mit IPTG (wie bei pET-16b-FGG) sondern mit L-Arabinose und/oder Tetracyclin (siehe Anhang). Die getrennten Induktionsmöglichkeiten der Plasmide ermöglichen, dass die Induktion der Chaperone getrennt gestartet werden kann. So können Chaperone vorproduziert werden bevor mit der Produktion von FGG begonnen wird. Dieses könnte die Faltung von FGG besser unterstützen als wenn Chaperone und FGG gleichzeitig produziert werden müssten.

Die Induktion der Chaperone erfolgte bei einer OD_{600nm} von 0,1 rel. AU bei 30 °C in ZYP-Medium. Bei einer OD_{600nm} von 0,6 rel. AU und bei 20 °C wurde anschließend die Expression von FGG mit 0,25 mM IPTG induziert (siehe Anhang). Durch das Verringern der Temperatur von 30 °C auf 20 °C wurde eine Maßnahme zur potentiellen Verbesserung der Löslichkeit angewandt (siehe Abschnitt 4.2.1). Die Kultivierung erfolgte für 24 Stunden.

In dem folgenden, mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbten, Polyacrylamidgel sind die löslichen Fraktionen der Zellysate für die Zeitpunkte 0 und 6,5 Stunden nach Induktion des FGGs aufgetragen.

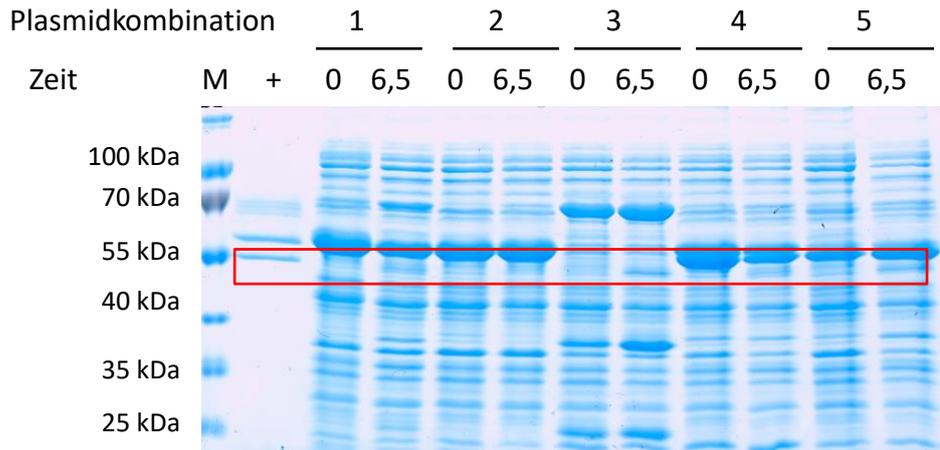


Abbildung 16: Screening der Chaperonkombinationen im Hinblick auf die Proteinproduktion von löslichem FGG. Aufgetragen sind die Fraktionen 0 und 6,5 Stunden nach Induktion des FGGs. Als Positivkontrolle ist humanes Fibrinogen (+) aufgetragen.

Für die Kombinationen 3 und 5 kann eine verstärkte Proteinproduktion nach Induktion im Größenbereich des FGGs erkannt werden. Mittels Western Blot und immunologischer Färbung konnte das Protein als FGG identifiziert werden (siehe Abschnitt 8.4).

Aufgrund der Tatsache, dass das Chaperonsystem 3 (DnaK, GrpE, DnaJ) im Vergleich zum Chaperonsystem 5 (Tg) vielfältigere Eingriffsmöglichkeiten in den Faltungsprozess hat, wurde ab diesem Zeitpunkt mit dem Chaperonsystem 3 weitergearbeitet. Ziel war es die Produktion des FGGs durch Veränderung von verschiedenen Prozessparametern wie Kultivierungstemperatur, Induktorkonzentration sowie die Induktionsstrategie der Chaperone und des Zielproteins zu optimieren.

Veränderung der Induktionsstrategie

Zuerst wurde überprüft, ob die Induktionsstrategie der Plasmide einen Einfluss auf die Proteinproduktion hat. In den ersten Versuchen wurden die beiden Plasmide zeitlich versetzt induziert. In folgenden Versuchen wurden nun eine gleichzeitige Induktion beider Plasmide und verschiedene zeitlich versetzte Induktionen evaluiert. Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über die verschiedenen durchgeführten

Experimente. Die Induktorkonzentration betragen wie in den vorhergehenden Versuchen $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ L-Arabinose und $0,25 \text{ mM}$ IPTG.

Tabelle 8: Überblick Induktionsstrategie

Experiment	Induktionsstrategie	OD _{600nm} bei Induktion	OD _{600nm} bei
		mit L-Arabinose	Induktion mit IPTG
A	gleichzeitig	0,1	0,1
B	zeitlich versetzt	0,1	0,3
C	zeitlich versetzt	0,1	0,7

Die folgende Abbildung zeigt die löslichen Fraktionen der Zellysate für verschiedene Kultivierungszeitpunkte. Der Zeitpunkt der Induktion mit IPTG ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Bei allen Proben mit der Bezeichnung „0“ wurde die Chaperonproduktion mit L-Arabinose induziert.

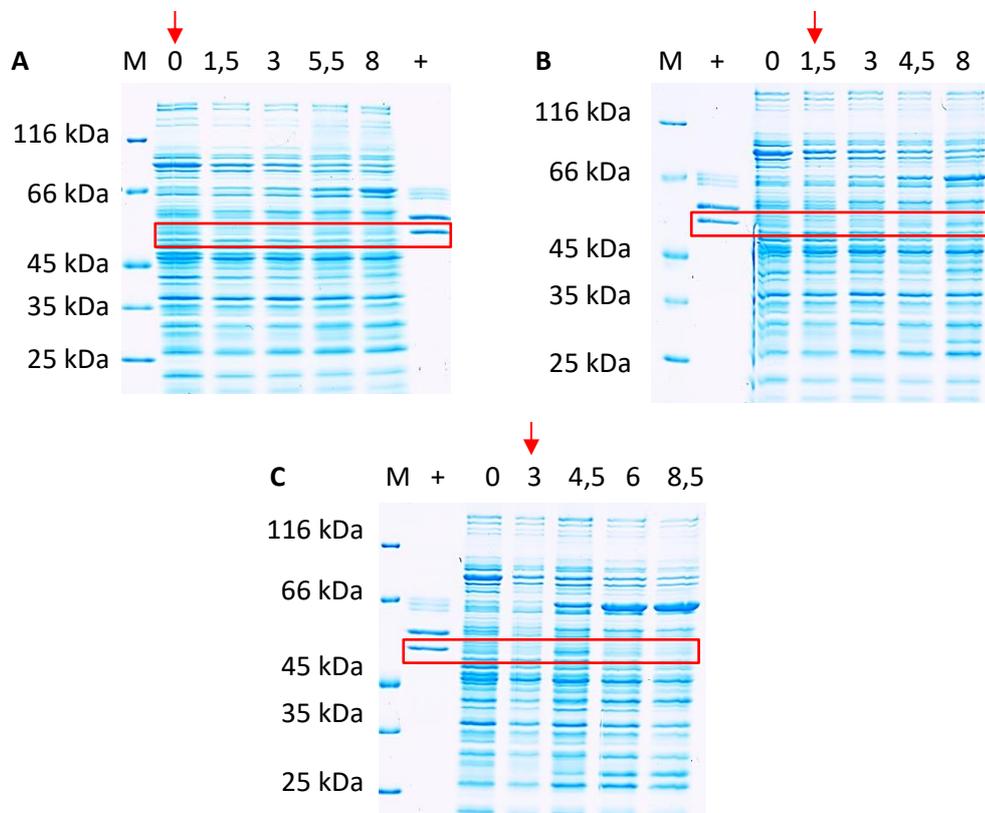


Abbildung 17: Variation der Induktionsstrategie. A: gleichzeitige Induktion von Chaperon und FGG, B und C: zeitlich versetzte Induktion von Chaperon und FGG.

Aufgetragen sind die löslichen Fraktionen bei verschiedenen Kultivierungszeitpunkten (in Stunden). Als Positivkontrolle ist humanes Fibrinogen (+) aufgetragen. Der Induktionszeitpunkt mit IPTG ist durch den roten Pfeil gekennzeichnet.

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei gleichzeitiger Induktion der beiden Plasmide kaum FGG produziert wird (Abbildung 17 A). Erst ab 5,5 Stunden nach Induktion lässt sich eine Proteinbande in der Größenordnung des FGGs erahnen. Ein möglicher Grund für die schlechte Zielproteinausbeute könnte sein, dass die Zellen durch das gleichzeitige Signal zur Überproduktion von vier Proteinen stark gestresst werden. Des Weiteren könnte es ebenfalls sein, dass die Konzentration der Chaperone nicht ausreicht um die Faltung des FGGs zu unterstützen.

Bei den zeitlich versetzten Induktionsstrategien (Abbildung 17 B und C) lässt sich festhalten, dass zwar FGG produziert wird, aber auch hier die Konzentration des FGGs gering zu sein scheint. Vergleicht man beide Kultivierungen miteinander, so erkennt man, dass es für die Produktion des Zielproteins förderlicher ist einen größeren Abstand der beiden Induktionszeitpunkte einzuhalten. Aus diesem Grunde wurde für weitere Optimierungsschritte die Induktionsstrategie C gewählt. Zu beachten ist aber auch, dass während aller Versuche das Zellwachstum nach der Induktion stark sank. 6 Stunden nach der Kultivierung konnte nur eine OD_{600nm} von 1,2 rel. AU erreicht werden. Dieses deutet auf einen erhöhten Zellstress hin.

Veränderung der Kultivierungstemperatur und der IPTG-Konzentration

Wie in Abschnitt 5.2.1 sollten der Einfluss der Kultivierungstemperatur und der Induktorkonzentration evaluiert werden. Getestet wurden IPTG-Konzentrationen von 0,1 bis 1 mM IPTG sowie Kultivierungstemperaturen (nach Induktion mit IPTG) von 20 °C und 30 °C. Die Induktorkonzentration für die Chaperone wurde für die Evaluation mit 0,5 mg mL⁻¹ L-Arabinose nicht verändert.

Die Abbildung 5.8 zeigt exemplarisch drei Polyacrylamidgele nach anschließender Färbung mittels Coomassie-Brillant-Blau mit den löslichen Fraktionen für eine Kultivierung bei 20 °C mit 0,25, 0,5 und 0,75 mM IPTG als Induktorkonzentration.

Per Densitometrie konnte herausgefunden werden, dass eine Kultivierungstemperatur von 20 °C nach IPTG-Induktion und

Induktorkonzentration von 0,5 mM IPTG am geeignetsten für die Produktion von löslichem FGG ist.

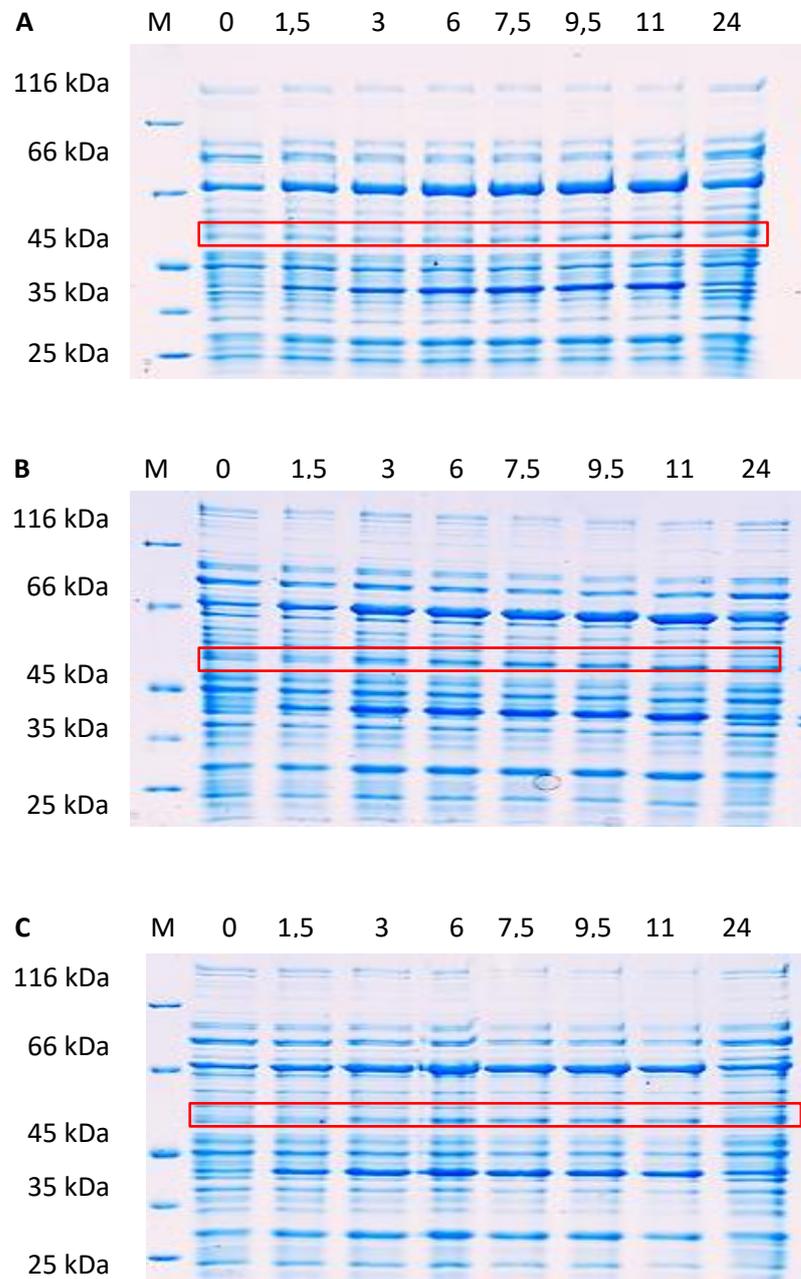


Abbildung 18: Screening der Proteinkonzentration bei Veränderung der IPTG-Konzentration bei einer Kultivierungstemperatur von 20 °C A: 0,25 mM IPTG, B: 0,5 mM IPTG und C: 1 mM IPTG. Aufgetragen sind die löslichen Fraktionen bei verschiedenen Kultivierungszeitpunkten (in Stunden).

Fazit

Festhalten lässt sich, dass mithilfe von co-produzierten Chaperonen FGG in löslicher Form von den Zellen produziert werden kann. Hilfreich für die Produktion sind der

Triggerfaktor als auch die Hitzeschockproteine der DnaK-Familie. Auffällig ist jedoch, dass die Konzentration von löslichem FGG in Relation zur unlöslichen Fraktion signifikant niedriger ist. Zudem zeigten die Zellen ein schlechtes Wachstum, was auf erhöhten Zellstress hindeutet.

Schaut man sich den Produktionsverlauf des FGGs ganz genau an, ist erkennbar, dass sich die Konzentration des löslichen Proteins nach ca. 6 Stunden abnimmt.

Auf dem exemplarisch folgenden, mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbten, Polyacrylamidgel sind die löslichen und unlöslichen Fraktionen der Zellysate aufgetragen.

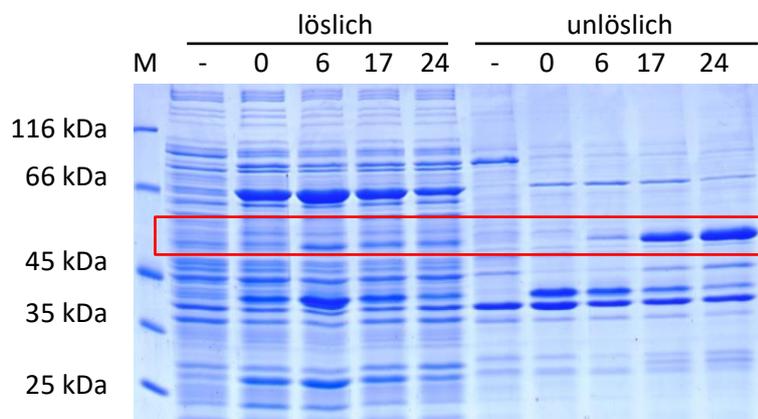


Abbildung 19: Screening der FGG Proteinkonzentration Aufgetragen sind die löslichen und unlöslichen Fraktionen nach 0, 6, 17 und 24 nach Induktion mit IPTG. Als Negativkontrolle wurden Proben aus der nicht-induzierten Vorkultur aufgetragen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Konzentration des löslichen FGGs nach 6 Stunden abnimmt. Dafür nimmt die Konzentration von FGG in der unlöslichen Fraktion stark zu. Durch weitere Veränderungen der Prozessparameter und der Kultivierungsstrategie (wie z.B. das Austauschen des Kultivierungsmediums gegen IPTG und L-Arabinose freies Medium, um den Druck auf die Zellen zu vermindern, vgl. [84]), hätte man diesem Problem evtl. entgegen wirken können. Da aber die Proteinkonzentration des löslichen FGGs im Vergleich zum gebildeten unlöslichen FGG deutlich kleiner war und die Zellen stark gestresst zu sein schienen, wurde sich gegen weitere Optimierungsschritte dieses Versuchssettings entschieden. In weiteren Schritten sollte nun der Fokus auf der Solubilisierung und der Rückfaltung des Proteins aus *Inclusion Bodies* liegen.

4.3 Solubilisierung und Aufreinigung der *Inclusion bodies*

4.3.1 Solubilisierung der *Inclusion bodies*

Für eine erfolgreiche Renaturierung des aggregierten, unlöslichen FGGs aus den IBs ist zuerst eine vollständige Solubilisierung wichtig. Zum Lösen werden häufig chaotrope Salze, wie Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff (5 bis 10 M) verwendet. Chaotrope Salze wirken denaturierend indem sie hydrophobe Wechselwirkungen aufheben, wodurch die Löslichkeit aggregierten Proteins aus IBs in Wasser erhöht wird [88]. Diese Denaturierung ist jedoch reversibel.

In klassischen Solubilisierungsansätzen wird häufig Guanidiniumhydrochlorid aufgrund seiner starken denaturierenden Eigenschaft eingesetzt [89]. Allerdings können Proteine in IBs eine partiell korrekt ausgebildete Sekundärstruktur sowie eine hohe biologische Aktivität aufweisen. Bei Verwendung eines stark denaturierenden Agens würden solche Sekundärstrukturen komplett zerstört. Dieses kann unter Umständen zu Proteinaggregation im Refoldingprozess führen. [90]

Aus diesem Grund werden heutzutage immer häufiger milde Solubilisierungsansätze gesucht um vorhandene Sekundärstrukturen zu erhalten und Proteinaggregation im Refoldingprozess zu vermeiden.

In den folgenden ausgeführten Arbeiten wurde eine ausgewählte milde Solubilisierung mit einem stark denaturierenden Ansatz verglichen.

Hierfür wurden zunächst die Zellen mittels Ultraschall (Abschnitt 7.3.5) aufgeschlossen. Für größere Ansätze wurde das Zellysate mittels French Press gewonnen. Die IBs enthaltende unlösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation abgetrennt und weiter verarbeitet. Um Verunreinigungen wie Zelltrümmer oder Membranproteine von den IBs zu trennen, erfolgten mehrere analoge Waschschriffe (siehe Anhang). Die Reinheit der für die Solubilisierungsversuche produzierten IBs nach dem Waschen wurde densitometrisch bestimmt und lag lediglich bei 36 %. Die Verwendung von alternativen Waschpuffern erbrachte keine Verbesserung der Reinheit (Daten nicht gezeigt).

Für die milde Solubilisierung wurde ein Ansatz mit einem TBS-Puffer (pH 8) und 2 M Urea gewählt. Anschließend wurde dieser Ansatz über Nacht bei -21 °C eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut (Protokoll nach [91]). Durch den Gefrier-Auftau-Zyklus können die Proteine partiell denaturiert werden ([92], [93]). Für eine starke Denaturierung wurde ein TRIS-HCl-Puffer (pH 8,5) mit 6 M Guanidinhydrochlorid eingesetzt.

Die folgende Grafik stellt die einzelnen Schritte beider Methoden schematisch dar.

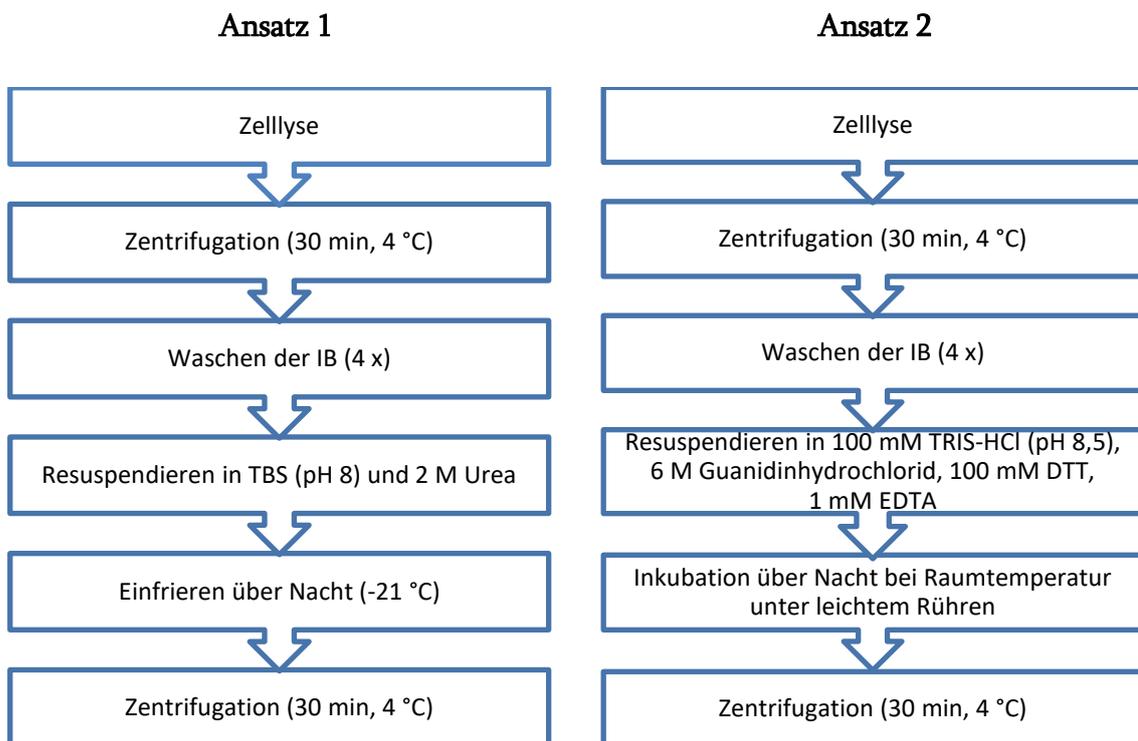


Abbildung 20: Schematischer Überblick der getesteten Solubilisierungsansätze

Während der verschiedenen Aufarbeitungsschritte wurden Proben genommen, welche anschließend mittels SDS-PAGE analysiert wurden (Abbildung 21).

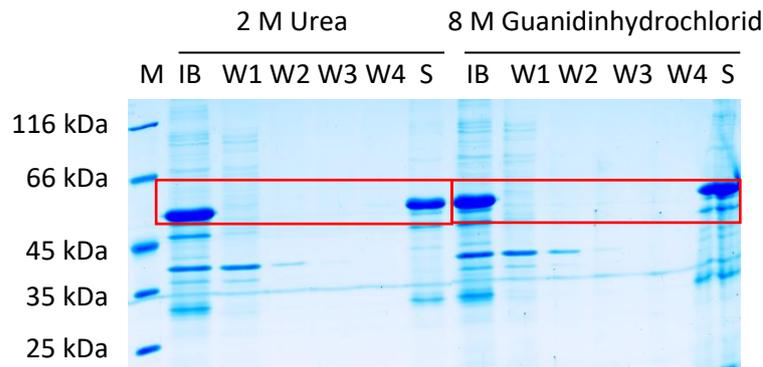


Abbildung 21: Vergleich der beiden Solubilisierungsmethoden. Aufgetragen sind Proben der unlöslichen Fraktion nach Zellaufschluss (IB), nach den Waschsritten (W1-W4) und nach der Solubilisierung (S).

In beiden Ansätzen konnte unlösliches FGG solubilisiert werden. Mittels densitometrischer Bestimmung wurde ermittelt, dass in dem Urea-Ansatz 54 % und mit Guanidiniumhydrochlorid 100 % des unlöslichen Proteins in Lösung gebracht werden konnten.

Die Gefriertemperatur kann jedoch einen großen Einfluss auf die Solubilisierung haben. Um diesen Einfluss zu evaluieren, wurden Aliquots des milden Ansatzes bei verschiedenen Temperaturen eingefroren. Es wurde festgestellt, dass bei einer Inkubation bei $-31\text{ }^{\circ}\text{C}$ kein Protein gelöst werden konnte. Wurde der Solubilisierungsansatz hingegen bei $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, konnte das unlösliche FGG zu 100 % solubilisiert werden.

Um noch mildere Bedingungen für die Solubilisierung zu schaffen, wurde die Harnstoffkonzentration reduziert. Hierfür wurden Konzentrationen von 0–1 M Urea getestet. Ab einer Konzentration von 1 M Urea können 100 % des FGGs in Lösung gebracht werden.

Auffällig war, dass durch die Solubilisierung ein in der unlöslichen Fraktion enthaltenes Protein (zwischen 35 und 45 kDa) nach dem Auftauen nicht mehr vorhanden war. Die Reinheit des solubilierten Proteins wurde densitometrisch bestimmt und betrug nun 48 %. Es konnte somit eine Steigerung der Reinheit um 12 % erreicht werden.

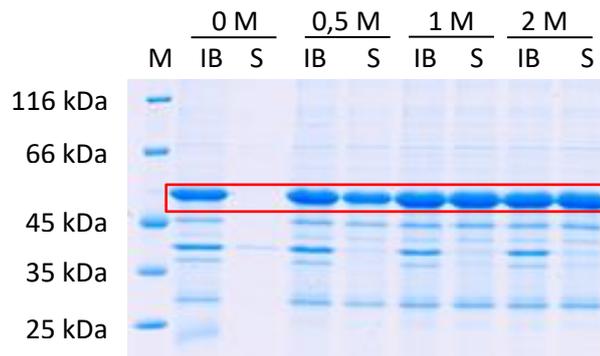


Abbildung 22: Vergleich verschiedener Urea-Konzentrationen hinsichtlich Solubilisierung des unlöslichen FGg. Aufgetragen sind Proben vor der gewaschenen *IB* vor der Solubilisierung (*IB*) und nach der Solubilisierung (*S*).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit beiden Ansätzen eine 100%ige Solubilisierung erreicht werden konnte. Da aber aus oben genannten Gründen eine Solubilisierung unter Einsatz von milden chaotropen Bedingungen vorzuziehen ist, sollten alle weiteren Solubilisierungen nach Ansatz 1 bei einer Gefriertemperatur von -17°C und einer Harnstoffkonzentration von 1 M durchgeführt werden.

4.3.2 Aufreinigung der *IBs* in IMAC Spin Columns

Nach der Solubilisierung des unlöslichen FGg aus den *IBs* lagen noch Verunreinigungen aus endogenen Proteinen des *E. coli*-Produktionsstammes vor. Daher sollte das FGg zunächst weiter aufgereinigt und renaturiert werden, bevor es in Anwendungsversuchen eingesetzt wurde.

Da das rekombinante Protein mit einem His₁₀-Tag exprimiert wurde, kann die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) verwendet werden. Die Aufreinigung mittels IMAC beruht auf der spezifischen reversiblen Adsorption von Molekülen an einen Bindungspartner an der Säulenmatrix. Häufig sind an der Säulenmatrix metallchelierende Gruppen, wie Imidoessigsäure oder Nitrilotriessigsäure, immobilisiert. Für die Bindung des Zielmoleküls an die Matrix, wird die Säule mit multivalenten Übergangsmetall-Ionen beladen. Eine reversible Adsorption zwischen Säulenmatrix und Zielmolekül verläuft dann über Wechselwirkungen von freien Koordinationsplätzen der Metallionen mit dem

Zielmolekül. Bei Proteinen erfolgt die Wechselwirkung der Metallionen mit basischen Aminosäuregruppen wie Histidin. Bei Aufreinigungen von Proteinen mit His-Tag wird die Säule häufig mit Ni²⁺-Ionen beladen, da diese Ionen stabile Chelatkomplexe mit den Histidiningruppen bilden. Die Elution des adsorbierten Proteins erfolgt dann mit Imidazol durch kompetitive Verdrängung.[20], [94]

Um zu evaluieren, ob das solubilisierete FGG mittel IMAC weiter aufgereinigt werden kann, wurden Vorversuche im analytischen Labormaßstab durchgeführt. Verwendet wurden HisPur™ Ni-NTA Spin Columns (Thermo Fisher) mit einem Säulenbettvolumen von 0,2 mL. Das Säulenbett bestand aus Nitrilotriessigsäure (NTA)-Agarose an welche Ni²⁺-Ionen gebunden waren.

Die Aufreinigung wurde auf den Herstellerangaben basierend durchgeführt (siehe Anhang). Um jedoch auszuschließen, dass das Protein während der Aufreinigung ausfällt, wurden allen Puffern 1 M Urea zugesetzt (Abschnitt 7.7.1). Eluiert wurde mit 250 mM Imidazol. Während der Aufreinigung wurden in den verschiedenen Aufarbeitungsschritten Proben genommen, welche mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Brillant-Blau-Färbung analysiert wurden (Anhang) (Abbildung 23).

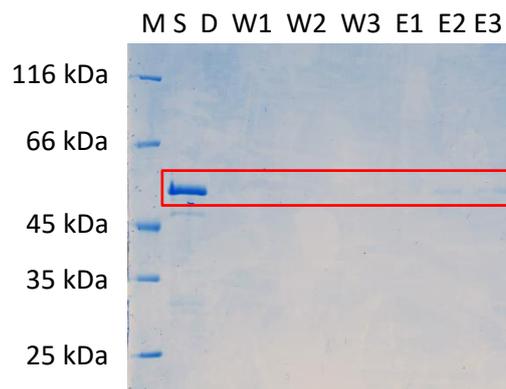


Abbildung 23: Analyse der Aufreinigung des FGGs mittels IMAC bei Verwendung von 1 M Urea. Aufgetragen sind Proben des solubilisierten Proteins (S), des Säulendurchlaufs nach Beladung (D), der Waschfraktionen (W) und der Elutionsschritte (E).

Es konnte FGG nicht quantitativ von der Säule eluiert werden (E2 und E3). Ein möglicher Grund für die ungenügende Elution könnte sein, dass das Protein zu stark an die Säulenmatrix gebunden hatte oder auf der Säule ausgefallen war.

Um zu überprüfen, ob eine Elution bei erhöhter Imidazolkonzentration zu gewährleisten ist, wurde ein weiterer Versuch mit doppelter Imidazolkonzentration (500 mM) durchgeführt. Auch durch diese Änderung konnte keine Elution des FGG erreicht werden (Daten nicht dargestellt).

Hierauf aufbauend sollte mit unveränderter Imidazolkonzentration, in einem weiteren Experiment evaluiert werden, ob das Ausfallen des Proteins auf der Säule ein Grund für das Ausbleiben seiner Elution war. Hierfür wurde FGG verwendet, welches mit höheren Ureakonzentrationen solubilisiert worden war, um Präzipitaten entgegenzuwirken. Es konnte festgestellt werden, dass mit steigender Ureakonzentration mehr Protein von der Säule eluiert wurde (Abbildung 24). Ab einer Konzentration von 3 M Urea wurde eine Elution von 86 % erreicht.

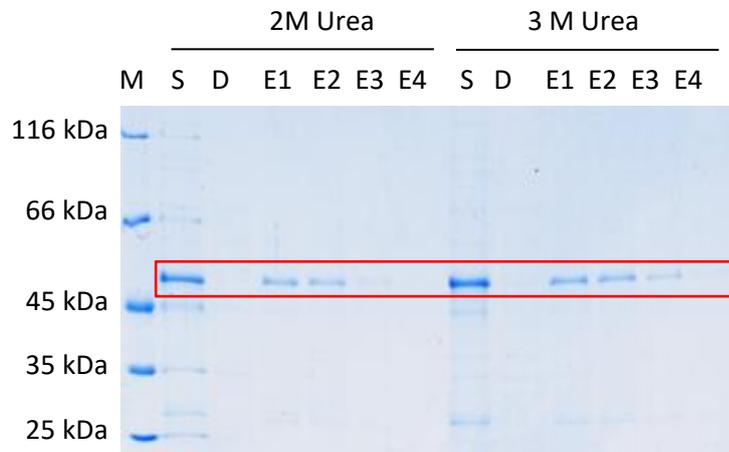


Abbildung 24: Analyse der Aufreinigung des FGGs mittels IMAC bei Verwendung von 2 und 3 M Urea. Aufgetragen sind Proben des solubilierten Proteins (S), des Säulendurchlaufs nach Beladung (D), der Waschfraktionen (W) und der Elutionsschritte (E).

4.3.3 Aufreinigung des rekombinanten FGGs mittels *Fast-Protein-Liquid-Chromatography*

Für die Aufreinigung im größeren Maßstab wurde die *Fast-Protein-Liquid-Chromatography*-Anlage (FPLC) BioLogic Duo-Flow von Bio-Rad Laboratories verwendet. Als Säule wurde eine HiTrap® QHP (GE Healthcare) mit 1 mL Säulenbettvolumen eingesetzt. Diese Säule besteht aus modifizierter Sepharose, welche mit Ni²⁺-Ionen beladen wurde (Abschnitt 7.7.2).

Um unspezifische Wechselwirkung von endogenen *E. coli*-Proteinen mit der Säule zu vermeiden, wurde allen Puffern 50 mM Imidazol zugesetzt. Der Rohextrakt wurde in 15 mL TBS-Bindungspuffer (pH 8) mit 3 M Urea aufgetragen. Die Elution des FGGs erfolgte mit 500 mM Imidazol. Die Flussrate betrug 1 mL min⁻¹.

Die Analyse der isolierten Fraktionen (Abbildung 25) via SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung ergab, dass das FGG an die Säulenmatrix gebunden und wieder eluiert werden konnte. Allerdings war im Durchfluss noch nicht gebundenes FGG vorhanden. Ein möglicher Grund ist, dass die Bindungsplätze der Säule bereits komplett belegt waren. Ebenfalls zeigte sich, dass in den Eluatproben noch Verunreinigungen aus *E. coli* enthalten waren.

Die Reinheit und Ausbeute der FGG-Fractionen wurden densitometrisch bzw. mittels Bradford-Assay bestimmt. Aufgereinigt werden konnten 63 % des rekombinant produzierten FGGs mit einer Reinheit von 55 %. Bei einem Großteil der Verunreinigungen handelt es sich um das bereits identifizierte FGG-Fragment mit einer Größe von 25 – 35 kDa (siehe 4.1.3).

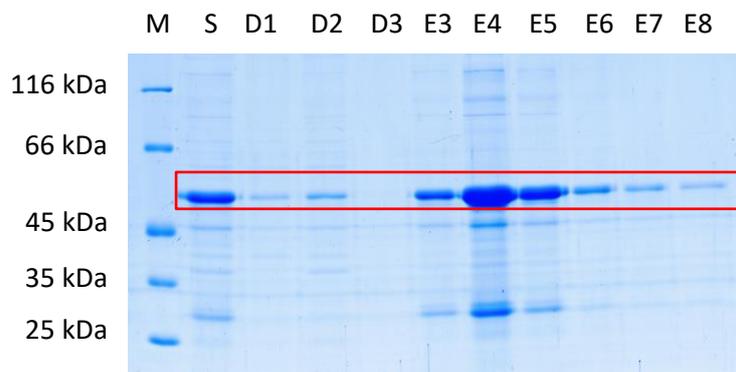
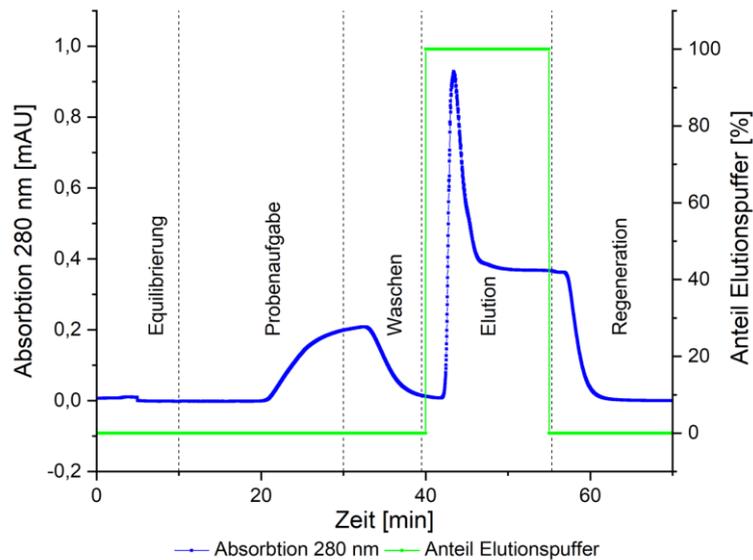


Abbildung 25: Chromatographische Aufreinigung des FGGs mittels Ni^{2+} -IMAC (oben) Chromatogramm der Aufreinigung (unten) Analyse der Isolierung der FGG durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind Proben des solubilisierten Proteins (S), des Säulendurchlaufs nach Beladung (D) und der Elutionsschritte (E).

4.3.4 Aufreinigung und *On-column Refolding* mittels IMAC

Da das Protein nicht nur aufgereinigt, sondern auch in seine native Form zurück gefaltet werden musste, wurde eine Methode gesucht um beide Schritte miteinander zu verbinden. Klassische Renaturierungsmethoden sind die Verdünnung oder der Austausch des Lösungsmittels mittels langsamer Dialyse oder Diafiltration [95]. Aber auch das *On-column Refolding* wird häufig eingesetzt. Bei dieser Methode wird, vor der Elution des gebundenen Proteins, der denaturierend wirkende Bindungspuffer gegen einen nicht denaturierenden Puffer ausgetauscht. Der Gradientenverlauf beim

Austausch des Puffers ist linear. Anschließend kann das gebundene Protein eluiert werden. [96]

Durchgeführt wurde der Versuch basierend auf den Herstellerangaben der verwendeten Chromatographiesäule (Abschnitt 7.7.3). Alle Schritte wurden mit einer Flussrate von 1 mL min^{-1} durchgeführt.

Der Urea-haltige Puffer wurde innerhalb einer halben Stunde gegen Urea-freien TBS-Puffer (pH 8) ausgetauscht. FGG konnte dann mit 500 mM Imidazol wieder eluiert werden (Abbildung 26).

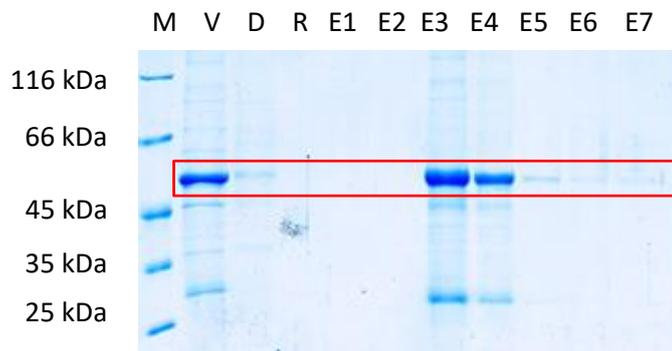
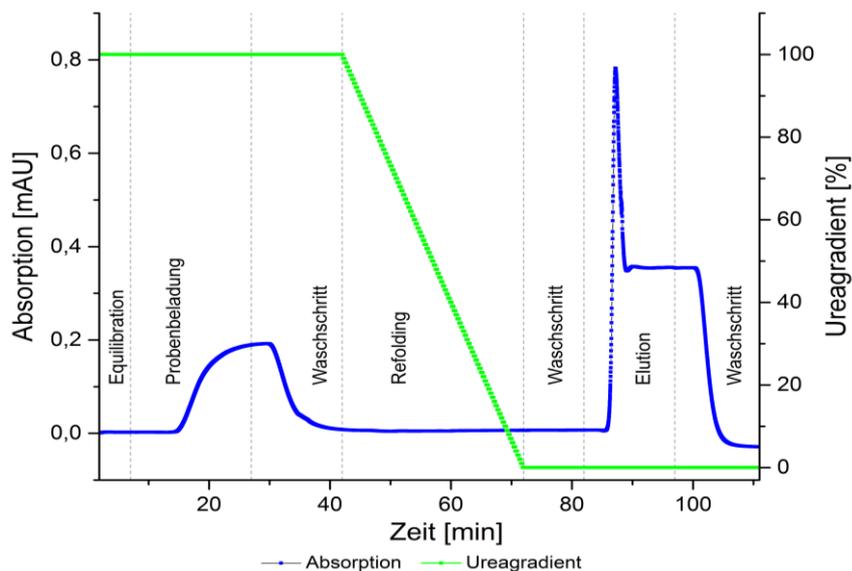


Abbildung 26: Chromatographisches Refolding des FGGs mittels Ni^{2+} -IMAC

(oben) Chromatogramm der Aufreinigung und des Refoldings (unten) Analyse der Isolierung der FGG durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind Proben des solubilisierten Proteins (S), des Säulendurchlaufs nach Beladung (D), des Säulendurchlaufs während des Refoldings- (R) und der Elutionsschritte (E).

Die Reinheit der eluierten FGG-Fraktionen betrug 51 % und es konnten insgesamt 77 % des FGGs aufgereinigt werden. Diese Angaben wurden densitometrisch bestimmt. Da das Protein nun ohne Urea in Lösung blieb, deutet darauf hin, dass es in eine stabilere Form überführt wurde. Dieses kann ein erster Hinweis auf eine Renaturierung sein. Eine finale Prüfung ist jedoch nur mit einer Prüfung auf biologische Aktivität bzw. in Form eines Anwendungstests möglich.

4.3.5 Optimierung der Reinheit der eluierten FGG-Fraktionen

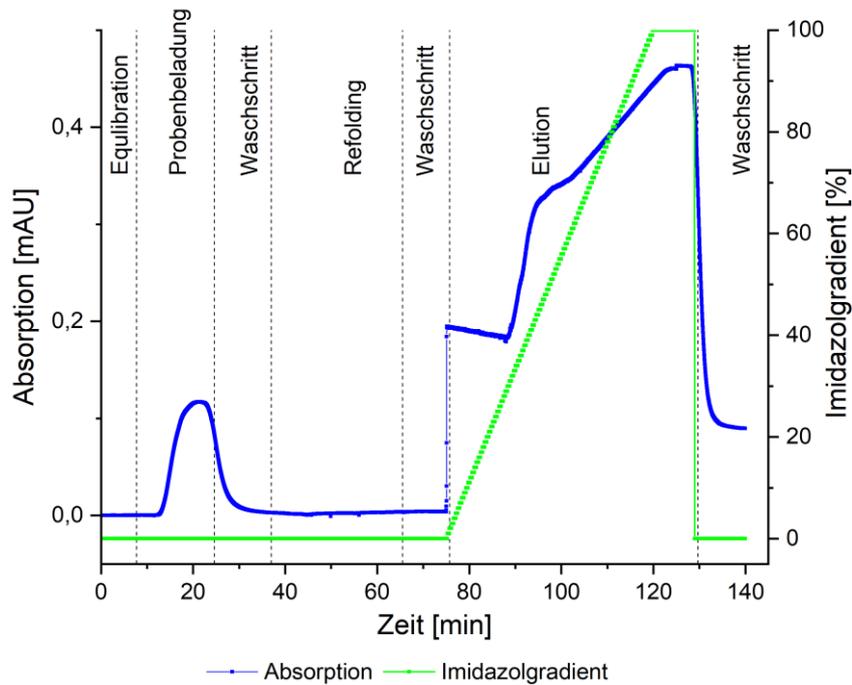
In den vorhergehenden Versuchen konnte die Reinheit des rekombinanten solubilisierten Proteins im Vergleich zum Rohextrakt nur um 4 % gesteigert werden. Um eine höhere Reinheit des Proteins für Anwendungstests zu erreichen, sollten weitere Optionen evaluiert werden.

Aufreinigung durch Stufelution

Da bakterielle Proteine zum Teil histidinreiche Regionen an ihrer Oberfläche aufweisen, besteht die Möglichkeit, dass diese teilweise unspezifisch an die Affinitätsäule binden. Den Bindungs- und Waschpuffern wurden bereits 50 mM Imidazol zugesetzt, um unspezifische Bindungen zu unterdrücken. Durch eine stufenförmige Elution können Verunreinigungen vor dem Zielprotein eluiert werden. Um zu überprüfen mit welcher Imidazolkonzentration Verunreinigungen von der Säule eluiert werden können, wurde eine Elution mit einem linearen Imidazolgradienten (50 bis 500 mM Imidazol) durchgeführt. Die eluierten Proteinfractionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung untersucht (Abbildung 27).

Im Vergleich zu den vorhergehenden Versuchen zeigt sich im Chromatogramm eine Verbreiterung des Elutionspeaks. Auch auf dem Polyacrylamid-Gel ist zu erkennen, dass sich das eluierte Protein auf viele Fraktionen verteilt. Zudem werden

Verunreinigungen und Zielprotein zu gleichem Maße eluiert. Eine Reinigung durch eine Stufenelution wurde deshalb für weitere Arbeiten ausgeschlossen.



S E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12 E13 M E14 E15 E16 E17



Abbildung 27: Stufenelution zur Aufreinigung des FGGs mittels Ni²⁺-IMAC

(oben) Chromatogramm der Aufreinigung (unten) Analyse der Isolierung der FGG durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind Proben des solubilisierten Proteins (S) und der Elutionsschritte (E).

Da die Verunreinigungen – vor allem das FGG-Fragment (25-35 kDa) – ein kleineres Molekulargewicht als das Zielprotein (49 kDa) besitzen, wurde versucht diese mittels Ultrafiltration abzutrennen. Eingesetzt wurden dazu die Ultrafiltrationseinheiten Vivaspin (Sartorius) mit einem Cut-off von 50 kDa und einer Polyethersulfonmembran. Es zeigte sich jedoch, dass die Verunreinigungen mit dieser Methode nicht abgetrennt werden konnten (Abbildung 28).

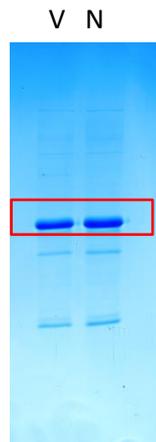


Abbildung 28: Ultrafiltration und Aufkonzentrierung der eluierten Proben. Aufgetragen sind die eluierten Proben vor (V) und nach (N) der Ultrafiltration. Die Probe nach der Ultrafiltration ist vierfach aufkonzentriert. Die Konzentration wurde densitometrisch bestimmt.

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass während der Aufkonzentration zu einem signifikanten Proteinverlust kam. Mögliche Gründe könnten sein, dass das Protein beim Aufkonzentrieren ausfällt, an die Membran gebunden wird oder eine Kombination aus beidem eintritt (Membranfouling). Alternativ könnten Ultrafiltrationseinheiten mit einer hydrophileren Membran eingesetzt werden. Da jedoch für weitere Versuche keine Aufkonzentration nötig war, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das aggregierte, unlösliche FGG aus den *Inclusion Bodies* vollständig solubilisiert wurde. Zudem wurden Ansätze gefunden mit denen 77 % des Proteins aus dem Rohextrakt aufgereinigt werden konnten. Zudem wurde ein Renaturierungsansatz durch *On-column Refolding* gefunden, mit dessen Hilfe das Protein ohne denaturierendes Agens in eine stabile lösliche Form überführt werden konnte. Dieses deutet auf eine Rückfaltung hin, wobei die biologische Aktivität durch weitere Tests bestätigt werden muss.

Für Anwendungstests wäre eine höhere Reinheit des rekombinant produzierten Proteins wünschenswert. Zu evaluieren wäre, ob Zusätze zum Solubilisierungspuffer schon bei der Solubilisierung zu einer Verbesserung der Reinheit führen würden.

Ein weiterer Ansatz könnte die Veränderung der immobilisierten Ionen sein. Da die Selektivität der Bindung des Proteins an das Säulenmaterial von der Identität des Metallions abhängig ist, könnten andere zweiwertige Metallionen an die Säule immobilisiert werden. Möglich wären vor allem Co^{2+} - oder Zn^{2+} -Ionen. Sie besitzen zwar eine geringere Affinität zu Polyhistidin-Gruppen, dafür wird gleichzeitig jedoch die Selektivität erhöht, da endogene *E. coli*-Proteine mit erhöhter Histidinkonzentration schwächer binden. Da das rekombinante FGG mit einem His10-Tag exprimiert wird, ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass es trotzdem an eine Säule mit immobilisierten Co^{2+} - oder Zn^{2+} -Ionen binden würde. [97]

Als weitere alternative Methode zur Aufreinigung bietet sich die Größenausschlusschromatographie an, da hier ebenfalls die Aufreinigung mit dem *Refolding* verbunden werden kann.

4.4 Überprüfung der biologischen Aktivität des rekombinanten FGGs

Neben der klinischen Nutzung in der Blutgefäßprothetik ist die Beschichtung von Oberflächen für die Zellkultur eine weitere potentielle Anwendung für rekombinantes FGG. Durch die Produktion rekombinanten FGGs im Laborreaktor stand nun ausreichend Material für Anwendungstests zur Überprüfung der biologischen Aktivität zur Verfügung. Für die Überprüfung der biologischen Aktivität des rekombinant produzierten FGGs wurden Zelladhäsionsassays durchgeführt, wobei die $\alpha_3\beta_3$ -Integrinbindestelle des FGGs [64] genutzt wurde. Diese Bindestelle vermittelt die Bindung von Fibroblasten. Für das Zelladhäsionsassay wurden diverse Suspensionszell-Multiwellplatten mit dem rekombinant produzierten, solubilisierten und rückgefalteten FGG beschichtet. Als Zelllinie wurden *Human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) verwendet. Hierbei handelt es sich um adhärenente Endothelzellen, welche aus der Nabelschnurvene isoliert wurden.

Um die Aktivität des FGG einzuschätzen, wurde, im Vergleich zu anderen Proteinen, qualitativ via Lichtmikroskopie und quantitativ anhand Zellzahl und Viabilität evaluiert, ob die Adhäsion der Zellen an die Platten verbessert wird. Als Vergleichsproteine dienten denaturiertes BSA (Negativkontrolle) und humanes Fibrinogen (Positivkontrolle). Alle Proteine wurden mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingesetzt. Außerdem wurden unbeschichtete *Wells* zum Vergleich herangezogen. Alle Ansätze wurden in Triplets durchgeführt.

Lichtmikroskopische Aufnahmen

Für die Beschichtung der Platten wurden die *Wells* über Nacht mit den in PBS gelösten Proteinen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden nicht gebundene Proteine durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die *Wells* gleichmäßig mit Zellen beschickt und erneut für unterschiedliche Zeiträume bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um die Adhäsion der Zellen über die Zeit zu beobachten. Nach 15 min, 30 min und 60 min wurde hierfür das

überstehende Zellkulturmedium entfernt und die adhärenierten Zellen mit Kristallviolett fixiert und angefärbt (Abschnitt 7.4.5). Anschließend wurden die *Wells* unter dem Lichtmikroskop untersucht. Die Abbildung 29 zeigt repräsentative Beispiele des Zelladhäsionsassays.

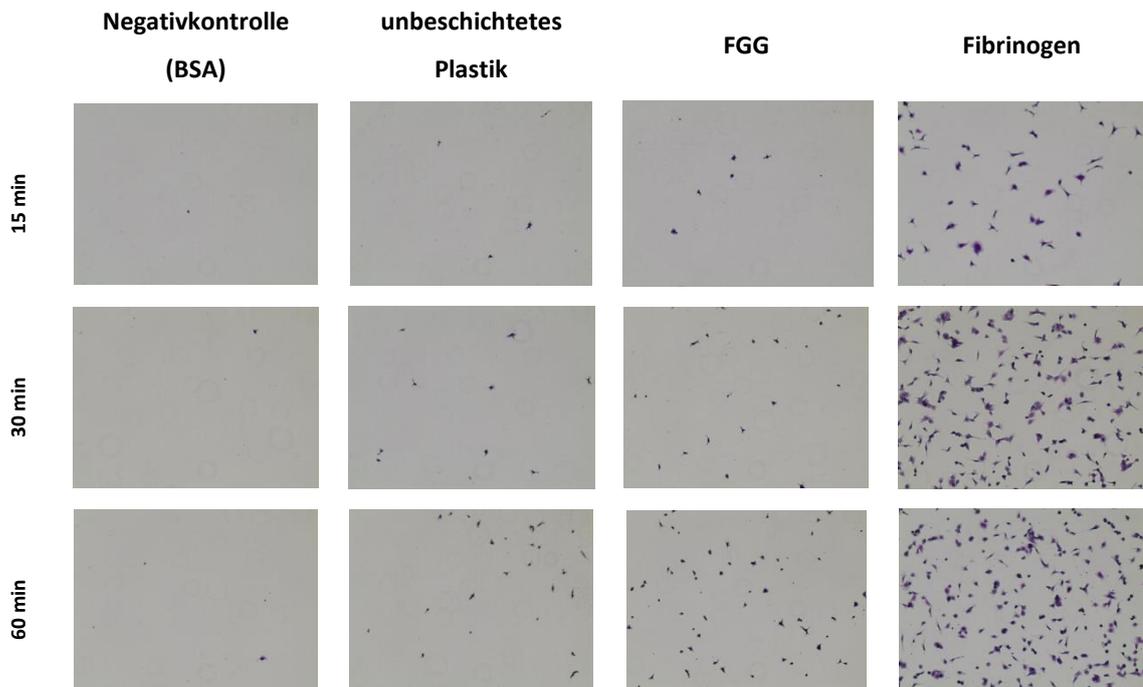


Abbildung 29: Lichtmikroskopische Aufnahmen von adhärenierten HUVEC-Zellen 15, 30 und 60 min nach Beschickung der *Wells*

Es ist zu erkennen, dass bei einer Beschichtung mit BSA (Negativkontrolle) nur vereinzelt Zellen an die Oberfläche der *Wells* adhärenieren konnten.

Bei einer Beschichtung mit Fibrinogen (Positivkontrolle) konnten sich bereits nach 15 min eine signifikante Anzahl von Zellen am Boden des *Wells* festsetzen. Weiterhin ist zu sehen, dass die Zellen bereits abgeflacht waren und Ausläufer bildeten.

Vergleicht man die Positiv- und Negativkontrollen mit den beiden anderen Experimenten, lässt sich erkennen, dass die HUVECs auf dem unbeschichteten Zellkulturplastik adhärenieren können. Jedoch dauert dieser Prozess deutlich länger als bei der Positivkontrolle. Zudem bilden die Zellen auf dem unbeschichteten

Zellkulturplastik auch nach 60 min keine deutlichen Ausläufer aus. Im Vergleich zu diesem Experiment, konnten auf dem Boden der FGK-beschichtetem-*Wells*, deutlich mehr Zellen in kürzerer Zeit adhären. Vergleicht man mit der Positivkontrolle, wirken die Zellen noch nicht so abgeflacht und haben noch keine Ausläufer gebildet.

Messung der Zellviabilität und der Zellzahl

Die qualitativen Aussagen sollten auch quantitativ evaluiert werden. Hierfür wurden die Zellzahl im überstehenden Medium sowie die Viabilität der adhären Zellen gemessen. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellkulturüberstände mit den nicht adhären Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten gepoolt und zentrifugiert. Anschließend erfolgten eine Färbung mit Trypanblau und die Zählung mithilfe einer Neubauerkammer.

Die Viabilität wurde mittels CellTiterBlue®-Assay (CTB) bestimmt (Abschnitt 7.4.6). Diese Methode beruht darauf, dass Resazurin im Stoffwechsel von Zellen zu dem fluoreszierenden Resorufin umgesetzt wird. Dafür wurde nach dem Abtrennen der Überstände CTB-Reagenz zugegeben und eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei 590 nm gemessen. Wie viel Resorufin entsteht, hängt dabei zum einen von der Zellzahl und zum anderen auch von der Viabilität der Zellen ab.

Die Ergebnisse des CTB-Tests für alle eingesetzten Konzentrationen und die gezählten Zellen sind im Folgenden grafisch dargestellt (Abbildung 35). Die Standardabweichungen der Triplets wurden berechnet und sind ebenfalls dargestellt.

Die Beschichtung mit kommerziellem humanem Fibrinogen zeigte unter den getesteten Bedingungen den stärksten Effekt. Nach 60 min waren 95 % der aufgegebenen Zellen bereits adhären (Abbildung 30A). Die adhären Zellen zeigten zudem eine hohe Viabilität (Abbildung 30B). Auf den BSA beschichteten *Wells* konnten sich nach 15 min 30 % der aufgegebenen Zellen festsetzen. Auch nach

längerer Inkubationszeit konnten nicht mehr als 30 % der Zellen adhären. 56 % der Zellen, welche auf unbeschichtetes Zellkulturplastik aufgetragen wurden, waren nach einer Inkubationszeit von 60 min adhären. Bei der Verwendung von FGG als Beschichtungsmaterial konnten sich 84 % der Zellen festsetzen (Abbildung 28).

Vergleicht man unbeschichtete mit FGG beschichteten *Wells*, so zeigt sich, dass nach 60 min 28 % mehr Zellen, in Relation zur Ausgangszellzahl, auf den FGG beschichteten *Wells* adhärten. Die beobachtete Adhäsion der HUVECs an dem heterologen FGG weist darauf hin, dass dessen $\alpha_v\beta_3$ -Integrinbindestelle intakt sein muss. Das rekombinant produzierte FGG scheint demnach bioaktiv zu sein.

Im Vergleich zu Fibrinogen beschichteten Platten adhärten auf FGG beschichteten *Wells* 11 % weniger Zellen, in Relation zur Ausgangszellzahl.

Die vergleichsweise geringere Anzahl an adhärten Zellen, kann damit begründet werden, dass Fibrinogen und FGG zwar in der gleichen Proteinkonzentration aber nicht im gleichen molaren Verhältnis eingesetzt wurden. Fibrinogen besteht aus mehreren Proteinketten und besitzt dementsprechend pro Mol mehr Bindestellen als das rekombinante FGG. Um die Aktivität beider Proteine exakt miteinander vergleichen zu können, müsste eine Normalisierung der Bindestellen vorgenommen werden. Da die Versuche aber nur durchgeführt wurden, um zu testen ob FGG bioaktiv ist, wurde auf tiefergehende weitere vergleichende Analysen der beiden Proteine verzichtet.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass FGG eine Bioaktivität aufweist und sich positiv auf die Zelladhäsion auswirkt. Die qualitativen Analysen konnten mithilfe der quantitativen Analysen bestätigt werden.

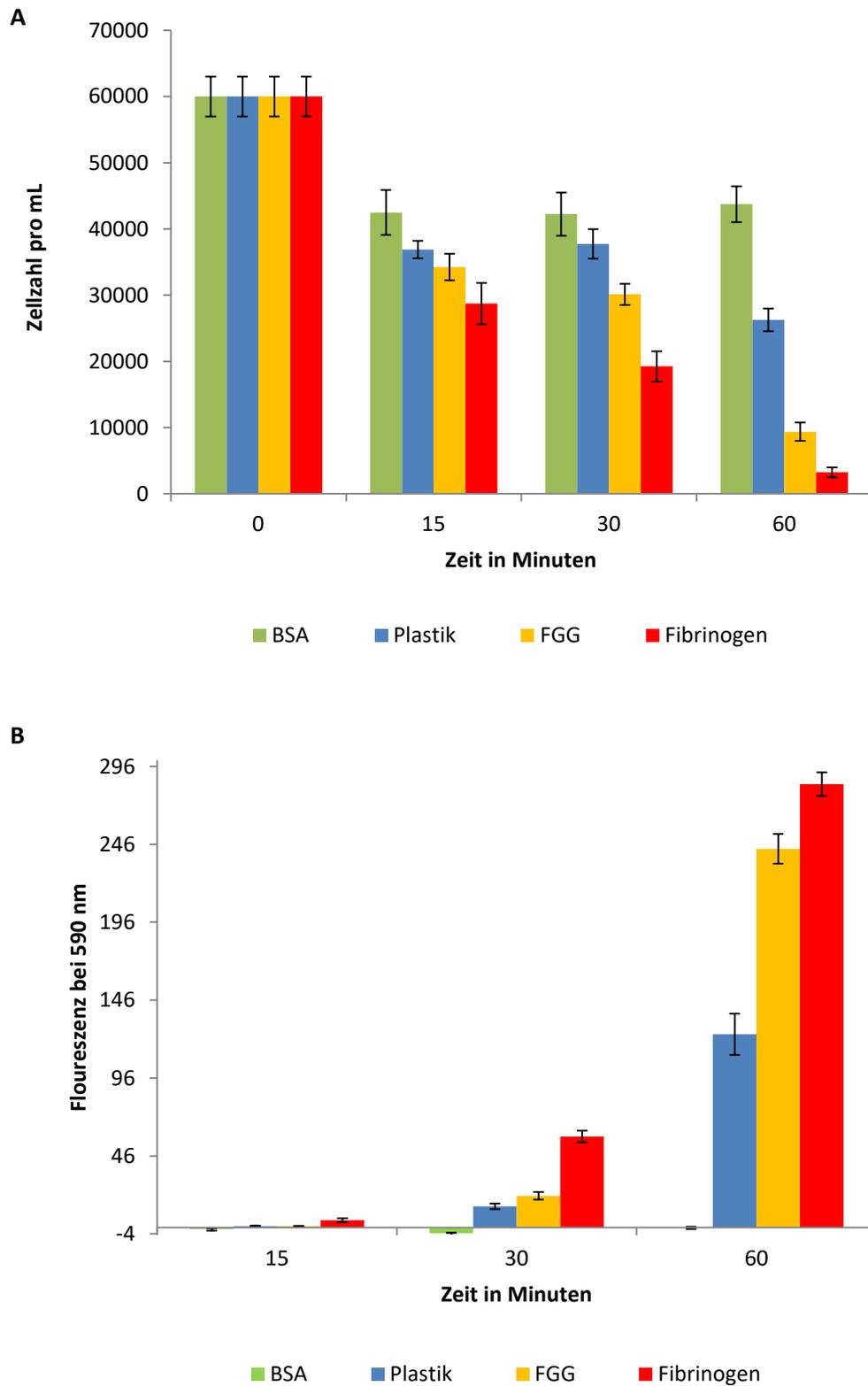


Abbildung 30: **A** Ergebnisse der ermittelten Zellzahl im Zellkulturüberstand und **B** der gemessenen Fluoreszenz resultierend aus den CTB-Tests

Polymerisierungsversuche mit FXIII

Da das rekombinante FGG eine FXIII-Polymerisierungsstelle besitzt, wurde in weiteren Versuchen getestet ob die Zugabe von FXIII zu einer Vernetzung der einzelnen Ketten führt. Dazu wurden FGG mit FXIII und Thrombin vermischt und bei 37 °C inkubiert (Abschnitt 7.5.1). Bei Messungen im Rheometer konnten keine Polymerisierung festgestellt werden. Humanes Fibrinogen als Positivkontrolle bildete hingegen nach wenigen Sekunden bereits ein Gel (Daten nicht gezeigt), da es mehrere Polymerisierungsstellen pro Mol besitzt als FGG und sowohl auf FXIII als auch auf Thrombin reagiert. Das rekombinante FGG besitzt dahingegen eine Polymerisierungsstelle, welche mit FXIII aktiviert wird.

Im Folgenden ist das Ergebnis einer SDS-PAGE-Analyse des Polymerisierungsexperiments abgebildet.

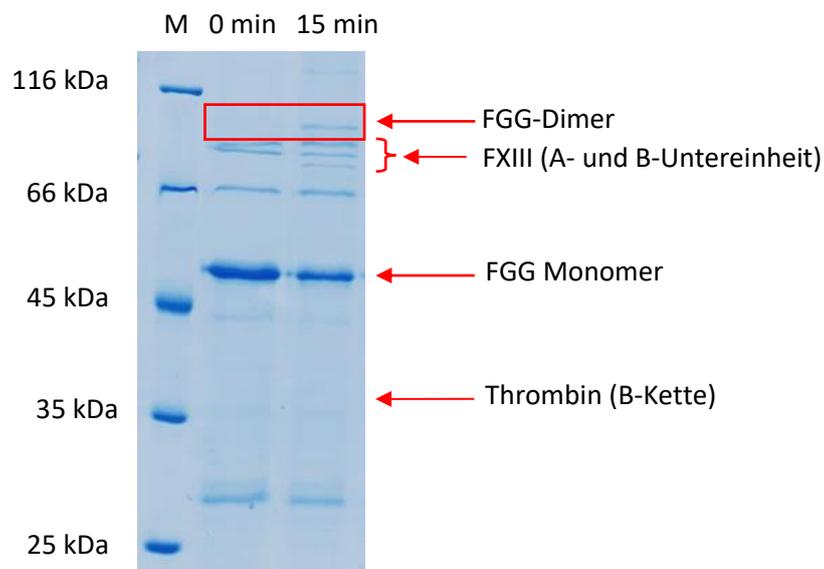


Abbildung 31: Polymerisierungsversuch des rekombinanten FGGs mit FXIII. Aufgetragen sind Proben nach der direkten Zugabe von Thrombin und FXIII (0 min) und nach 15 min Inkubation bei 37 °C.

Zu erkennen ist, dass nach 15 Minuten ein Protein im Bereich von ca. 100 kDa detektierbar ist (Abbildung 31). Es könnte sich dabei um FGG-Dimere handeln, da die Konzentration des FGG-Monomers nach 15 Minuten geringer war als zu Beginn des Versuches. Eine Western-Blot-Analyse konnte im Rahmen der Arbeit nicht

durchgeführt werden. Im Verlauf weiterer Arbeiten müsste die Identität der Aggregate mittels Western Blot und MALDI-Analysen geklärt werden.

4.5 Optimierung der FGG-Produktion mittels *Design of Experiments*

Da das aus den *IB* aufgearbeitete Protein bioaktiv war, sollte nun der Produktionsprozess optimiert werden, um eine möglichst hohe Proteinausbeute zu erlangen. Dazu ist eine Optimierung der Fermentationsbedingungen, wie Temperatur, pH-Wert, Zusammensetzung des Kultivierungsmediums oder der Induktionsbedingungen, notwendig. Viele solcher Faktoren können einen Fermentationsprozess beeinflussen, sodass eine hohe Anzahl an Screeningversuchen erforderlich sein kann. Mithilfe der statistischen Versuchsplanung, oder auch *Design of Experiments* (DoE), können viele Informationen über den Einfluss dieser Faktoren auf die Kultivierung mit vergleichsweise wenigen Versuchen evaluiert werden. Mittels eines Versuchsplans werden verschiedene Einflussgrößen systematisch gestuft verändert und die Auswirkung auf die Zielgröße beobachtet.

Das klassische DoE-Modell stellen vollfaktorielle Versuchspläne dar, bei denen alle denkbaren Kombinationen der Einflussgrößen getestet werden. Bei drei zu variierenden Einflussgrößen müssten in diesem Fall 27 Versuche durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde ein Versuchsplan nach Box-Behnken ausgewählt. Mithilfe der Software Modde (Sartorius, Deutschland) wurde ein experimenteller Plan erstellt und ausgewertet. Das Box-Behnken-Design bietet den Vorteil, dass im Vergleich zur vollfaktoriellen Vorgehensweise bei gleicher Faktorenanzahl nur 15 Versuche erforderlich sind und dennoch sehr effizient Koeffizienten ersten und zweiten Grades ermittelt werden können. Außerdem können Nonlinearitäten abgebildet werden. [98]

Als zu maximierende Zielgröße dieser Versuchsreihe wurde die Proteinausbeute festgelegt. Die IPTG-Konzentration, Kultivierungstemperatur und die Induktion bei verschiedenen optischen Dichten sollten als Einflussgrößen untersucht und optimiert werden. Die drei Stufen der zu variierenden Faktoren wurden folgendermaßen äquidistant festgelegt:

Temperatur:	25 °C, 31 °C und 37 °C
IPTG-Konzentration:	0,10 mM, 0,55 mM und 1,00 mM
Induktionsbedingung:	0,6 rel. AU, 1,3 rel. AU und 2,0 rel. AU

Die Durchführung der geplanten Versuche erfolgte in einem Block. Alle Teilversuche wurden aus einer identischen Vorkultur beimpft. Bei allen Teilkultivierungen erfolgte die Wachstumsphase bei einer Temperatur von 31 °C bis die gewünschte optische Dichte erreicht war. In der anschließenden Produktionsphase wurde entsprechend der Versuchsplanung (siehe Tabelle 9) induziert und temperiert. Die Isolierung des rekombinant produzierten FGGs aus den Zelllysaten erfolgte im Anschluss analog zum im Anhang beschriebenen Protokoll (Abschnitt 7.5.3). Die Analyse der Proteinkonzentration erfolgte mittels Densitometrie und Bradford (Abschnitt 7.6.5).

Tabelle 9: Versuchsplanung und Ergebnisse

Nr.	Temperatur [°C]	IPTG-Konzentration [mM]	Animpfdichte [rel. AU]	erreichte FGG- Konzentration (µg/mL)
1	25	0,10	1,3	68,39
2	25	0,55	0,6	193,97
3	25	0,55	2,0	186,00
4	25	1,00	1,3	229,89
5	31	0,10	0,6	135,95
6	31	0,10	2,0	162,42
7	31	1,00	0,6	474,21
8	31	1,00	2,0	328,25
9	37	0,10	1,3	296,93
10	37	0,55	0,6	326,90
11	37	0,55	2,0	434,39
12	37	1,00	1,3	342,26
ZV I	31	0,55	1,3	250,69
ZV II	31	0,55	1,3	255,88
ZV III	31	0,55	1,3	239,03

Die Ergebnisse wurden mittels multilinearer Regression statistisch ausgewertet. Bei der Auswertung wurde erkannt, dass die optische Dichte zum Zeitpunkt der Induktion keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinproduktion hat (siehe Abbildung 32). Für die Verfeinerung des Modells wurde aus diesem Grund die optische Dichte aus dem Modell entfernt. Weiterhin fielen damit alle darauf aufbauenden Faktoren wie $OD \cdot OD$ sowie die Wechselwirkungen $Temp \cdot OD$ und $IPTG \cdot OD$ weg. Der Ausschluss von $Temp \cdot Temp$ erbrachte eine deutliche Steigerung der Modellvalidität.

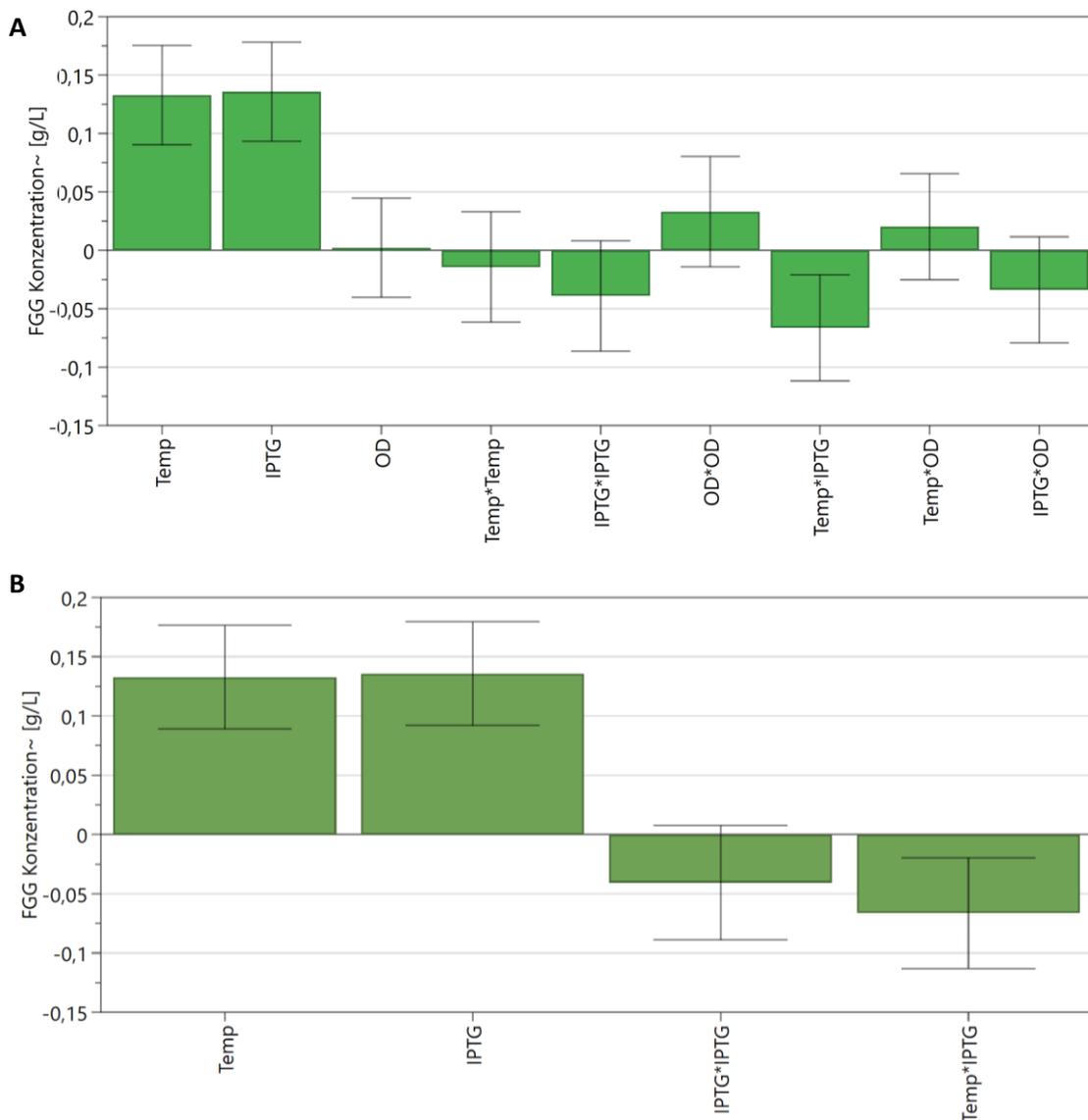


Abbildung 32: Koeffizientenplots (A) vor der Verfeinerung des Modells; B: nach der Verfeinerung des Modells

Der *Observed-vs.Predicted*-Plot (siehe Anhang) zeigte keine Ausreißer. Alle durchgeführten Experimente konnten somit in die Auswertung einbezogen werden. Als Gütekennzahlen des verfeinerten Modells ergaben sich ein R^2 (Bestimmtheitsmaß) von 0,915, ein Q^2 (Vorhersagegüte) von 0,727, eine Modellvalidität von 0,152 und eine Reproduzierbarkeit von 0,995 (Abbildung 33). Das hohe Bestimmtheitsmaß zeigt an, dass das gewählte Modell sehr gut zu den erhaltenen Daten passt. Die hohen Werte der Vorhersagegüte und der Reproduzierbarkeit sowie die geringe Differenz zwischen Q^2 und R^2 deuten auf ein stabiles und signifikantes Modell hin.

Normalerweise würde eine Modellvalidität von unter 0,25 gegen ein stabiles Modell sprechen. Da Ausreißer und eine falsche oder fehlende Transformation als Ursache ausgeschlossen werden können, stellt der erhaltene Wert lediglich die Sensibilität des verwendeten biologischen Systems dar.

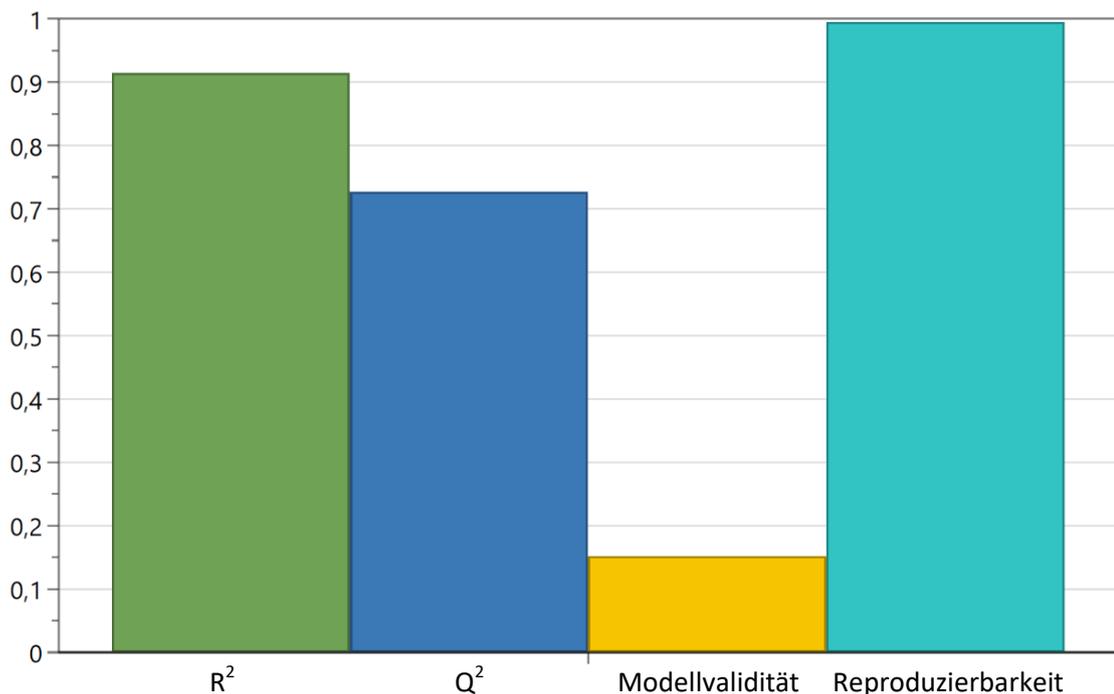


Abbildung 33: Zusammenfassendes Diagramm der Modellgüte-Kennzahlen nach der Optimierung des Modells

Aus dem Konturplot in Abbildung 34 ist ersichtlich, dass bei Erhöhung der Fermentationstemperatur und Induktorkonzentration eine Steigerung der

Proteinproduktion erzielt wurde. Die Abhängigkeit der Proteinproduktion ist hierbei für den verwendeten *E. coli*-Tuner-Stamm typisch.

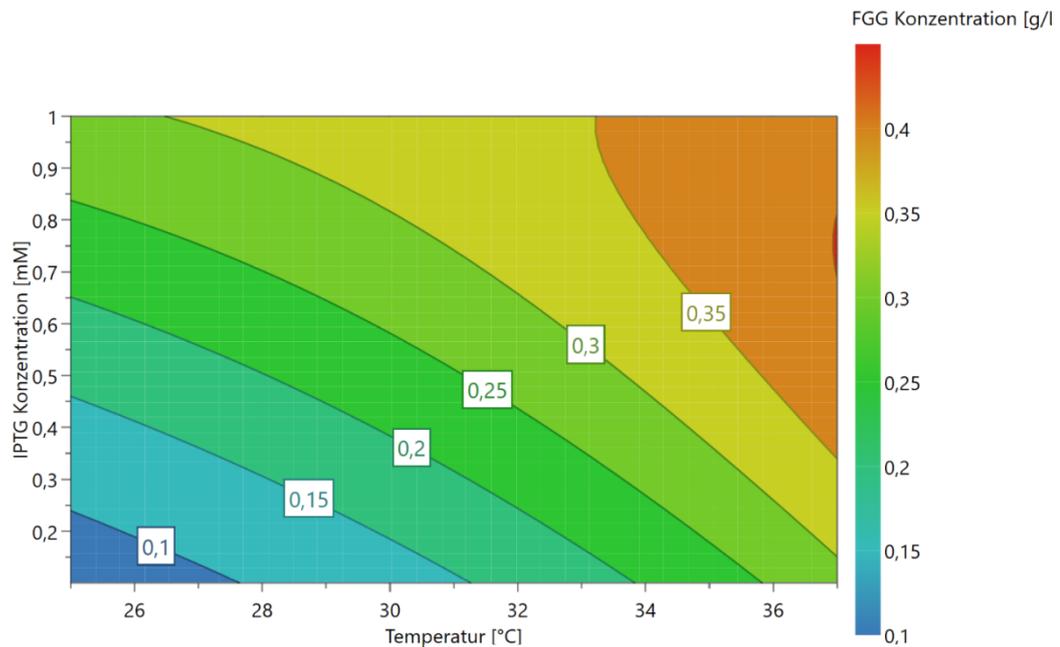


Abbildung 34: Konturplot

Mit der *Optimizer*-Funktion des DoE-Programms Modde wurde die höchste Proteinkonzentration bei einer maximalen Kultivierungstemperatur von 37 °C, einer mittleren Induktorkonzentration von 0,58 mM IPTG und einer optischen Dichte von 2 rel. AU bei der Induktion erhalten.

4.6 *Scale-Up* und Kultivierung im Rührkessel-Bioreaktor

Basierend auf den Ergebnissen des DoEs wurden die optimierten Produktionsbedingungen in den 2L-Rührkessel-Bioreaktor übertragen. Es sollte evaluiert werden, ob eine bessere Proteinproduktion bei geregelten Prozessbedingungen stattfindet um so langfristig einen Prozess für die Bereitstellung größerer Produktmengen zu etablieren.

Die Bedingungen der Schüttelkolbenkultivierung wurden bis auf die Regelung des pH-Wertes und der Gelöstsauerstoffsättigung direkt in den 2L-Laborreaktormaßstab übertragen. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 1 M HCl und 10 Gew.-% NH₃ auf einen Wert von 7 statiert. Die Regelung der Rührgeschwindigkeit erfolgte kaskadierend um eine Gelöstsauerstoffsättigung (DO-Wert, englisch: *dissolved oxygen*) von 30 % zu gewährleisten. Die Regelung des DO- sowie des pH-Wertes sollten im Vergleich zum Schüttelkolben geeignetere Bedingungen in der Produktionsphase herstellen.

Analog zu den Vorversuchen im Schüttelkolben, wurde bei einer OD₆₀₀ von 2 rel. AU mit 0,58 mM IPTG induziert.

Als Kultivierungsmedium wurde analog zu den Vorversuchen im Schüttelkolben ZYP-Medium mit Glucose als primärer Kohlenstoffquelle eingesetzt. Es wurden zwei verschiedene Versuche durchgeführt. In einem Versuch wurde identisch zu den Vorversuchen Glucose mit einer Konzentration von 10 g/L verwendet. In einem zweiten Versuch wurden 30 g/L Glucose eingesetzt um die Proteinproduktionsphase zu verlängern und somit eine potentiell höhere Proteinausbeute zu erzielen. Zur Charakterisierung der Prozessausbeute wurden diverse Ausbeutekoeffizienten ermittelt und diese im Folgenden für Vergleiche herangezogen.

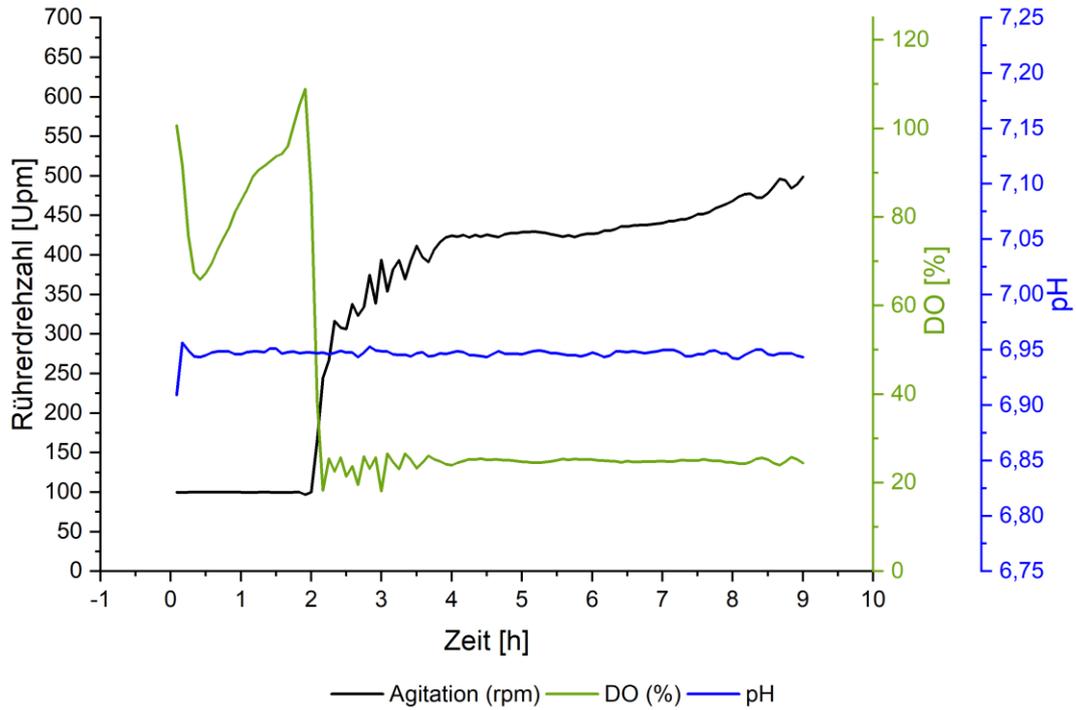
Kultivierung mit einer Glucosekonzentration von 10 g/L

Im Schüttelkolben wurden eine maximale OD₆₀₀ von 5 rel. AU und eine maximale Proteinkonzentration von 207,63 mg/L erreicht. Die maximale nach der Induktion erreichte Wachstumsrate betrug 0,060 h⁻¹. Mittels Densitometrie konnte gezeigt werden, dass nach einer Induktionszeit von vier Stunden ein proteolytischer Abbau des produzierten FGGs einsetzte. Die FGG wurde innerhalb von zwei Stunden um ein Drittel reduziert.

Wie in Abbildung 35 dargestellt, wurden im Bioreaktor eine maximale OD₆₀₀ von 8,34 rel. AU, eine maximale Biomassekonzentration von 2,85 g/L und eine maximale Proteinkonzentration von 108,02 mg/L erreicht. Die maximale Wachstumsrate nach der Induktion betrug 0,480 h⁻¹. Werden die optischen Dichten und die Proteinkonzentrationen von Schüttelkolbenkultivierung mit der Reaktorkultivierung verglichen, so lässt sich feststellen, dass bei der Kultivierung im Reaktor zwar höhere optische Dichte erreicht werden, die Proteinkonzentration jedoch geringer ist. Dieses gibt Hinweise darauf, dass die Fermentationsbedingungen im Laborfermenter eher für die Proliferation als für die Proteinproduktion optimal waren. Auch die höhere maximale Wachstumsrate bestätigt diese Deutung. Wahrscheinlich ist dieses auf die Regelung von DO- und pH-Wert im Fermenter zurückzuführen. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die Bakterienkultur über den gesamten Kultivierungsverlauf ausreichend mit Sauerstoff versorgt war, da keine Sauerstofflimitierung auftrat (Abbildung 35A).

Als Ausbeutekoeffizienten ergaben sich für diesen Versuch ein $Y_{X/S}$ von 0,285 g/g, ein $Y_{P/S}$ von 0,011 g/g und $Y_{P/X}$ von 0,038 g/g. Die Produktionsphase war im Vergleich Schüttelkolbenkultivierung mit fünf Stunden um eine Stunde länger. Bis zum Ende der Proliferation wurde FGG produziert. Es wurde kein proteolytischer Abbau des rekombinanten FGGs nachgewiesen (Abbildung 35 B).

A



B

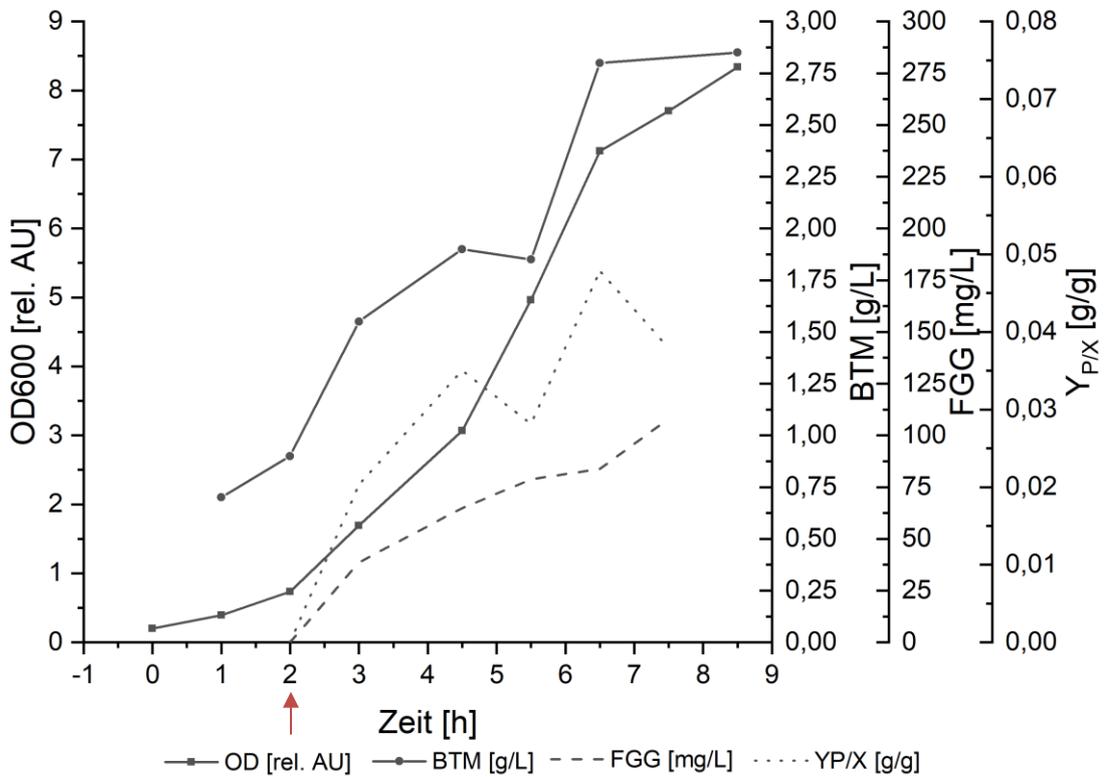


Abbildung 35 A und B: Produktion rekombinanter FGG in einer *Batch*-Kultivierung mit 10 g/L Glucose. Der rote Pfeil markiert den Induktionszeitpunkt.

Kultivierung mit einer Glucosekonzentration von 30 g/L

Im Bioreaktor wurden eine maximale OD₆₀₀ von 45,5 rel. AU und eine maximale Biomassekonzentration von 12,65 g/L sowie eine maximale Proteinkonzentration von 251,48 mg/L erreicht (Abbildung 36). Die maximale Wachstumsrate nach der Induktion betrug 0,560 h⁻¹. Im Vergleich zum Schüttelkolben konnte durch eine höhere Glucosekonzentration eine 10-fach höhere Wachstumsrate und eine 9-fach höhere optische Dichte erreicht werden. Die Produktionsphase war viereinhalb Stunden länger und die erreichte FGG-Konzentration war um 21 % höher.

Als Ausbeutekoeffizienten ergaben sich für diesen Versuch ein $Y_{X/S}$ von 0,422 g/g, ein $Y_{P/S}$ von 0,008 g/g und $Y_{P/X}$ von 0,020 g/g. Die Produktionsphase dauerte achteinhalb Stunden. Bis zum Ende der Proliferation wurde FGG produziert. Und es wurde ebenfalls kein proteolytischer Abbau des rekombinanten FGGs nachgewiesen (Abbildung 36). Die spezifische FGG-Ausbeute ($Y_{P/X}$) erreichte einen Maximalwert von 0,072 g/g drei Stunden nach Induktion.

Auch bei dieser Reaktorkultivierung war die Proliferation gegenüber der Proteinproduktion bevorzugt, was sich in den ermittelten Ausbeutekoeffizienten widerspiegelt.

Vergleich der beiden Reaktorkultivierungen

Anhand der Ausbeutekoeffizienten lässt sich feststellen, dass bei beiden Kultivierungen ein größerer Teil der Glucose vermutlich für die Proliferation anstatt für die heterologe Proteinproduktion genutzt wurde. Je mehr Glucose eingesetzt wurde, desto stärker war dieser Effekt. Dieses wird durch eine um 17 % höhere maximale Wachstumsgeschwindigkeit und der Bildung von 48 % mehr Biomasse je g Glucose bei der Kultivierung 30 g/L Glucose gestützt. Bei einem Einsatz von 30 g/L Glucose wurden zudem 23 % weniger FGG pro g Glucose produziert als in der Kultivierung mit 10 g/L. Insgesamt konnte die Gesamtausbeute an FGG durch den Einsatz von einer höheren Glucosekonzentration um 133 % gesteigert werden. Außerdem wurde die Raumzeitausbeute unter Berücksichtigung der nur geringfügig längeren Fermentationszeit um 68 % gesteigert.

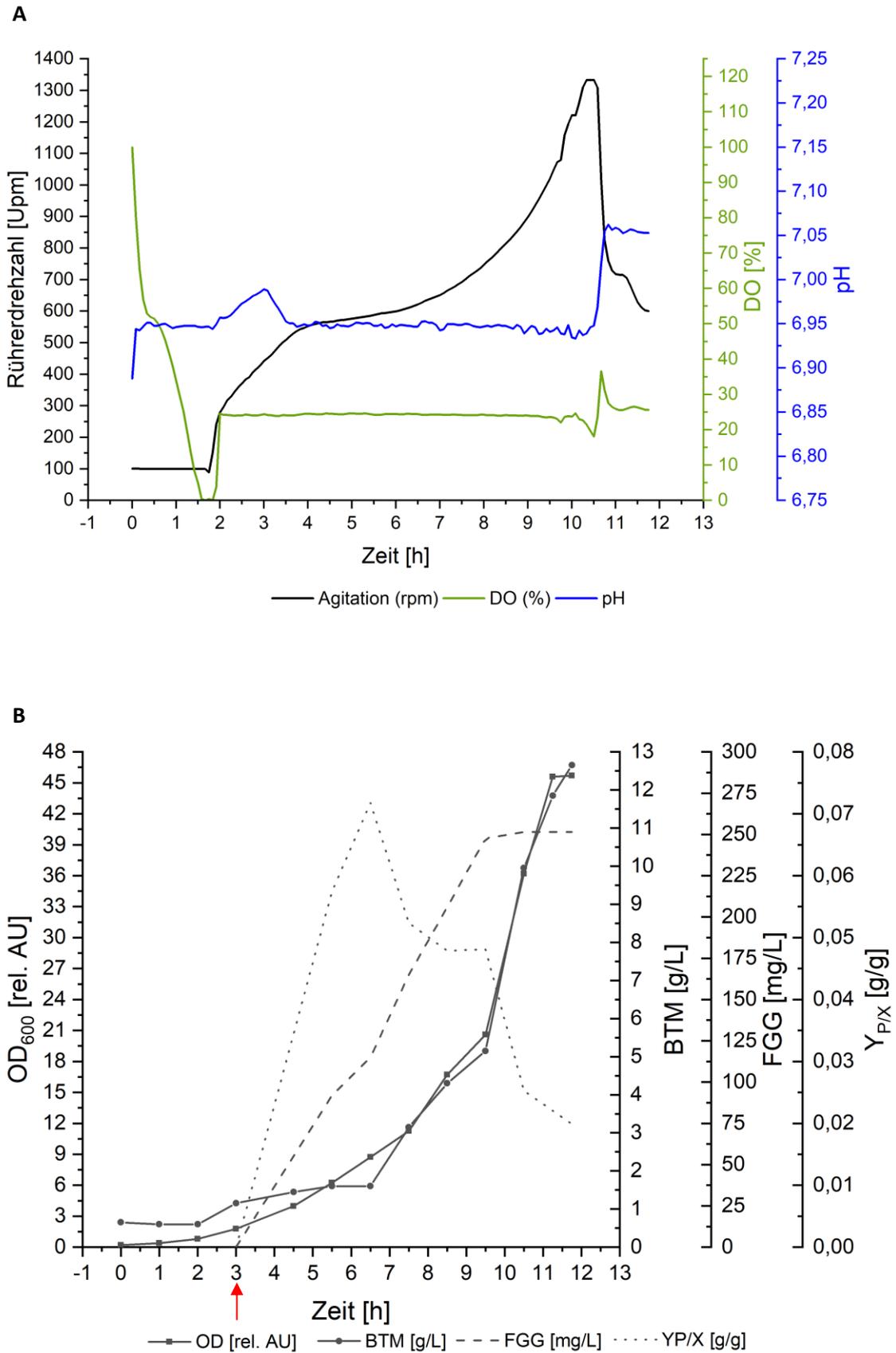


Abbildung 36 A und B: Produktion rekombinanter FGG in einer *Batch*-Kultivierung mit 30 g/L Glucose. Der rote Pfeil markiert den Induktionszeitpunkt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein fibrinbasiertes Biomaterial für die Verwendung als Beschichtungsmaterial in der Zellkultur oder als *Scaffold* für Implantate dargestellt und getestet werden.

Fibrinogen ist aus drei verschiedenen Proteinketten aufgebaut, welche in einem komplexen Zusammenspiel aus Chaperonen und mikrosomalen Membranen zu einem Hexamer angeordnet werden. Da dieser Aufbau für die ausgewählten Produktionsorganismen zu komplex ist, wurde als Grundlage für das fibrinbasierte Biomaterial die γ A-Kette ausgewählt. Die γ A-Kette enthält viele wichtige Bindestellen für verschiedene Zelltypen und eine FXIII-Polymerisierungsstelle.

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war es einen Expressionsstamm für die γ A-Kette des Fibrinogens bereitzustellen, die Produktion zu optimieren, das rekombinante FGg aufzureinigen und erste Bioaktivitätstests durchzuführen.

Als Produktionsstamm wurde zunächst die methylotherme Hefe *K. phaffii* (syn. *Pichia pastoris*) gewählt, da diese rekombinante Proteine sekretieren und posttranslational modifizieren kann. Im Vergleich zu Säugetierzellen stellt sie eine kostengünstige Alternative dar.

Für die Klonierung eines Expressionsvektors wurde die Gensequenz der γ A-Kette codonoptimiert und anschließend synthetisiert. Als Expressionsvektor wurde pPIC9K gewählt, um eine Sekretion des rekombinanten Proteins in den Kulturüberstand und damit ein erleichtertes *Downstreaming* zu ermöglichen. Die Einbringung der Gensequenz in den Zielvektor konnte mittels Sequenzierung bestätigt werden. Der Vektor wurde anschließend in verschiedene *Loci* des proteasedefizienten Stammes SMD1168 transformiert, sodass sowohl Mut⁺ als auch Mut⁻ Klone entstanden. Ebenfalls wurden Klone mit Multicopy-Genkassetten generiert. Insgesamt wurden über 200 Klone hinsichtlich der FGg-Expression gescreent. Sowohl im TCA-gefällten Kulturüberstand als auch im Zelllysat konnten per SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen kein FGg nachgewiesen werden. Proteine, welche offensichtlich überproduziert wurden, wurden per MALDI als

Alkoholoxidase (AOX) identifiziert. Qualitativ wurde per PCR-Analyse nachgewiesen, dass vollständige *fgg*- mRNA gebildet werden kann.

Ob quantitativ eher vollständige oder unvollständige *fgg*- mRNA gebildet wird, müsste mit weiteren Analysen, wie Northern Blot, genauer überprüft werden. Zudem könnte als weitere Optionen ein anderer Produktionsstamm (wie zum Beispiel GS115) oder ein anderer Vektor getestet werden. Da die Expression von rekombinanten Proteinen von Klon zu Klon schwankt, kann es sein, dass zudem zu wenige Klone überprüft wurden. Da aber ein manuelles Hochdurchsatzscreening sehr zeitaufwändig ist, müsste dieses maschinenunterstützt durchgeführt werden. Dieses war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

Als alternatives Expressionssystem bot sich *E. coli* an, da die Zellen leicht zu manipulieren, leicht handzuhaben und ebenfalls kostengünstig sind. Auch für diesen Produktionsorganismus wurde die Gensequenz synthetisiert und codonoptimiert. Per Sequenzierung konnte nach Umklonierung des Gens nachgewiesen werden, dass die Gensequenz in den Expressionsvektor pET-16b eingebracht wurde. Zudem wurde so kloniert, dass das Gen *in frame* mit der vorhandenen His-Tag-Sequenz war. Der His-Tag sollte die spätere Aufreinigung des Proteins erleichtern. In weiteren Schritten wurde der generierte Zielvektor in den Produktionsstamm *E. coli Tuner*TM transformiert.

Mittels SDS-PAGE und Western Blot konnte gezeigt werden, dass der verwendete *E. coli*-Stamm FGG produzieren konnte. Die Identität des Proteins wurde ebenfalls per MALDI bestätigt. Allerdings fand sich das gebildete FGG zu 100 % in der unlöslichen Fraktion. Für den Prozess wurde angestrebt, dass das Protein löslich gebildet werden sollte, um eine native Faltung zu erhalten. Veränderungen der Induktorkonzentration und der Kultivierungstemperatur führten nicht dazu, dass lösliches FGG produziert wurde. Erst durch Koproduktion der Chaperone dnaK-dnaJ-grpE oder tig, konnte –wenn auch nur in geringen Konzentrationen – lösliches FGG produziert werden. Auch hier zeigten Veränderungen von

Kultivierungstemperatur und Induktorkonzentration keine Verbesserung. Die Zellen zeigten außerdem ein schwaches Wachstum, was auf Stress hindeutete.

Aus diesem Grund sollte die Aufarbeitung des FGGs aus *IBs* erfolgen. Eine milde Solubilisierungsmethode wurde etabliert, um potentiell vorhandene Sekundärstrukturen zu erhalten. Durch einen *freeze-thaw-cycle* war bereits 1 M Urea ausreichend um das unlösliche FGG in Lösung zu bringen. Allerdings zeigte sich bei anschließenden chromatographischen Aufreinigungsversuchen, dass das solubilierte FGG vermutlich noch nicht ausreichend stabil in Lösung war und auf der Säule ausfiel. Daher wurde die Ureakonzentration auf 3 M Urea erhöht. Um das Protein weiter aufzureinigen, wurde eine IMAC verwendet. Ni²⁺-Ionen wurden dazu an einer Säule immobilisiert. Das rekombinante Protein konnte allerdings nur mit einer Reinheit von ca. 55 % isoliert werden. Zusätze zum Solubilisierungs- oder Waschpuffer könnten evtl. schon bei der Solubilisierung bzw. bei der Aufreinigung des FGGs zu einer Verbesserung der Reinheit führen. Eine Verbesserung der Reinheit durch Stufenelution konnte nicht erreicht werden.

Da das Protein nicht nur aufgereinigt, sondern auch in seine native Form zurück gefaltet werden musste, wurde ergänzend die Methode des *On-Column Refoldings* getestet. Bei diesem Verfahren konnte das Protein ohne Harnstoff stabil in Lösung gebracht werden, was erste Hinweise auf eine Rückfaltung in den nativen Zustand gab. In weiteren Analysen müsste jedoch überprüft werden, ob tatsächlich eine Rückfaltung stattgefunden hat.

Ein erster Schritt zur Überprüfung der Rückfaltung war die Testung der Bioaktivität. Hierfür wurde ein Zelladhäsionsassay mit Endothelzellen (HUVECs) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Zellen auf FGG beschichteten Zellkulturplatten besser als auf unbeschichtetem Zellkulturplastik adhäreren konnten, wodurch die Bioaktivität bestätigt wurde. Allerdings war die Adhäsion auf Fibrinogen beschichtetem Zellkulturplastik deutlich effektiver, da Fibrinogen pro Mol mehr Bindestellen als FGG besitzt. Nichtsdestotrotz besitzt FGG Potential als Beschichtungsmaterial in der

Zellkultur, da es gegenüber autologen oder xenogenen Varianten eine deutlich erhöhte Biosicherheit aufweist.

Um weitere Anwendungsmöglichkeiten zu überprüfen, wurde getestet, ob das Protein zu einem zusammenhängenden Netz polymerisiert werden kann. Erste Vorversuche in dieser Richtung wurden am Ende der praktischen Bearbeitungszeit durchgeführt. Bei Zugabe von FXIII konnte rheometrisch keine Polymerisierung festgestellt werden. SDS-PAGE-Analysen zeigten im Gegensatz dazu, dass es zu einer Aggregation oder Dimerisierung von Proteinen kam. Die Identität der entstandenen Proteine muss in weiteren Arbeiten mittels MALDI-Analysen geklärt werden. Prinzipiell gibt dieser Versuch jedoch Hinweise darauf, dass die FXIII-Polymerisierungsstelle verfügbar ist und somit das FGG durch das chromatographische *On-Column Refolding* korrekt gefaltet wurde. Zu Bedenken ist ebenfalls, dass jedes FGG-Molekül nur eine Polymerisierungsstelle besitzt und diese vermutlich nicht ausreicht um bei den eingesetzten Konzentrationen ein Polymer zu erzeugen.

Chemische Modifizierungen der Kette bieten die Möglichkeit ein semi-synthetisches polymerisierbares Material herzustellen. Durch Anbringung von lichtaktiven Linkern an das Proteingerüst, könnte durch UV-Aktivierung eine Vernetzung ermöglicht werden. Die Gruppe um Seliktar [99] zeigte, dass sowohl mit Pluronic®F127 konjugiertes als auch PEGyliertes humanes Fibrinogen durch UV-Bestrahlung ein biokompatibles und stabiles Hydrogel bildet.

Da bioaktives Protein aus *IBs* gewonnen werden konnte, wurde anschließend der Produktionsprozess mit einem *Design of experiments* auf Basis eines Box-Behnken-Designs durchgeführt. Die höchste Proteinausbeute konnte im Schüttelkolben bei 37 °C und bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 2 rel. AU mit einer Induktorkonzentration von 0,58 mM IPTG erzielt werden. Die maximale Proteinkonzentration betrug 207,63 mg/L. Im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen FGG-Titern (15-20 µg/mL [54]) konnte eine in etwa 10-fach höhere Konzentration erreicht werden.

Beim *Scale-Up* in den 2L-Rührkesselreaktor zeigte sich, dass die Produktionsbedingungen für die Proliferation optimal, jedoch für die heterologe Proteinproduktion schlechter als im Schüttelkolben waren. Die maximale Proteinkonzentration betrug 251,48 mg/L bei Verwendung von 30 g/L Glucose. Es wurde vermutet, dass sich die erhaltene niedrige spezifische FGG-Ausbeute als Resultat der erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit ergab. Um das Wachstum zu verlangsamen und Stoffströme verstärkt in die heterologe Proteinproduktion zu lenken, könnte beispielsweise eine niedrigere Fermentationstemperatur oder eine *Fed-Batch*-Betriebsweise eingesetzt werden.

Insgesamt ist die Anwendbarkeit des FGGs als neuartiges fibrinbasiertes Biomaterial als positiv zu bewerten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Bereitstellung eines Produktionsstammes sowie erste positive Versuche zur Aufreinigung und Rückfaltung des FGGs eine Basis für weitere Arbeiten geschaffen. Gelingt die Optimierung der Aufreinigung und eine anschließende Vernetzung des Proteins, kann rekombinantes FGG eine interessante Alternative zu autolog gewonnenem Fibrinogen für die Anwendung in der Zellkultur und als *Scaffold* für medizinische Anwendungen sein.

6 Anhang A – Materialien

6.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller, Land
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Agarose	ABgene, Deutschland
Ammoniak (25 %)	AppliChem GmbH, Deutschland
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Deutschland
Biotin	AppliChem GmbH, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Deutschland
Cobaltchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck KGaA, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Gibco, Deutschland
dNTPs	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Endothelial Cell Growth Medium 2	Promocell, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium 2 SupplementMix	Promocell, Deutschland
Essigsäure	AppliChem GmbH, Deutschland
Ethanol (96 %)	VWR International, LLC, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Deutschland
Geneticin®	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Glucose-Monohydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Glycerin	AppliChem GmbH, Deutschland
Glycin	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Guanidinhydrochlorid	AppliChem GmbH, Deutschland
Harnstoff (Urea)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Imidazol	AppliChem GmbH, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller, Land
Isopropanol	Merck KGaA, Deutschland
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Kaliumchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Kupfer(II)sulfat-5-hydrat	Honeywell Speciality Chemicals Seelze GmbH, Deutschland
L-Arabinose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Lysozym	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Magermilchpulver	Difco (Becton, Dickinson and Company), USA
Magnesiumchlorid Pentahydrat	Merck KGaA, Deutschland
Mangan(II)-chlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Methanol $\geq 99\%$	VWR Chemicals, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriummolybdat Dihydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumhydroxid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumthiosulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Nickel(II)-sulfat Heptahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Octoxinol 9 (Triton® X-100)	Serva Elektrophoresis GmbH, Deutschland
Octylphenoxypoly(ethylenoxy)ethanol (Nonident™ P-40)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Pepton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Phosphorsäure (85 %)	Merck KGaA, Deutschland
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Roti®-Safe GelStain	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Salzsäure (rauchend, 37 %)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich Corporation, USA

Fortsetzung Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller, Land
Schwefelsäure (95 %)	VWR International GmbH, LLC, Deutschland
Silbernitrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
TEGO® Antifoam KS 911	Evonic Industries AG, Deutschland
Tetracyclin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
TRIS-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
YNB	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Zinkchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Zinksulat Heptahydrat	AppliChem GmbH, Deutschland

Tabelle 11: Verwendete Kits

Kit	Hersteller, Land
CellTiter-Blur® Cell Viability Assay	Promega, USA
KAPA2G Robust PCR Kit	Peqlab VWR International GmbH, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen, Deutschland
QIAquick Gel Extraction	Qiagen, Deutschland

Tabelle 12: Verwendete DNA- und Proteinmarker

Marker	Hersteller, Land
DNA 100 bp Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
PageRuler Prestained Protein Ladder, 26616	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker, 26610	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Tabelle 13: Antikörper, Proteine und Enzyme

Antikörper, Protein oder Enzym	Hersteller, Land
6x-His-Epitope Tag Rabbit, IgG	Pierce, Deutschland
Accutase® Lösung	Sigma-Aldrich Corporation, USA
<i>Bam</i> H I Restriktionsenzym Fast Digest	Fermentas (Thermo Scientific), USA
<i>Bgl</i> II Restriktionsenzym Fast Digest	Fermentas (Thermo Scientific), USA
<i>Eco</i> R I Restriktionsenzym Fast Digest	Fermentas (Thermo Scientific), USA
Fibrinogen from human plasma (55-75% Protein)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Goat Anti-Mouse, IgG, H&L/ HRP conj	EMD Millipore, Deutschland
GoTaq® DNA-Polymerase	Promega, USA
KAPA2G Robust DNA-Polymerase	Peqlab VWR International GmbH, Deutschland
Mouse-Anti-FGG, IgG, (B-1)	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
<i>Not</i> I Restriktionsenzym Fast Digest	Fermentas (Thermo Scientific), USA
PNGase F	New England Biolabs, Deutschland
<i>Sac</i> I Restriktionsenzym Fast Digest	Fermentas (Thermo Scientific), USA
<i>Sal</i> I Restriktionsenzym Fast Digest	Fermentas (Thermo Scientific), USA
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
<i>Xho</i> I Restriktionsenzym Fast Digest	Fermentas (Thermo Scientific), USA

Tabelle 14: Verwendete Vektoren

Vektor	Hersteller, Land
Chaperon Plasmid Set	Takara Bio, Japan
pET-16b	Novagen (Merck KGaA), Deutschland
pPIC9K	Life Technologies, Darmstadt

Tabelle 15: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' -> 3')	Hersteller, Land
3' AOX Primer	AGGCAAATGGCATTCTGACA TCCT	Life Technologies, Darmstadt
5' AOX Primer	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	Life Technologies, Darmstadt
T7 Promoter Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	Life Technologies, Darmstadt
T7 Terminator Primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Life Technologies, Darmstadt
fgg forward Primer	ATTGCCGATTTCTTGTCCAC	Life Technologies, Darmstadt
fgg reverse Primer	CTCCTCCCAAATGATGCTGT	Life Technologies, Darmstadt
α -Factor Primer	ACTACTATTGCCAGCATTGCT GCT	Life Technologies, Darmstadt

6.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 16: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller, Land
Cellstar Suspensionsplatten (12well)	Greiner Bio One GmbH, Österreich
Einmalsterilpipetten	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Einwegspritzen (1 mL-10 mL)	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Eppendorfhütchen	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Kimtech Science Kimwipes	Kimberly-Clark Professional, USA
Kryoröhrchen 1,5 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Mikrotiterplatten 96 Well	Brand, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Ansell Healthcare, LLC, USA
Petrischalen	Greiner Bio One GmbH, Österreich
Pipettenspitzen (versch. Größen)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
PVDF Immun-Blot-Membran	Bio-Rad, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Sterilfilter (Minisart, 0,25 μ m)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland

Fortsetzung Tabelle 16: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller, Land
T-Flaschen, T 25, T75,T175	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Vivaspin 20 (MWCO 50 kDa)	Sartorius AG, Deutschland
Western Blot Filterpapier	Thermo Fisher, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 mL)	Corning Inc., USA

6.3 Geräte und Software

Tabelle 17: Verwendete Arbeitsgeräte

Gerät / System	Hersteller, Land
Agarose Gelkammer Advance Mupid One	TaKaRa, Japan
Analysenwaage Analytik AC210S	Sartorius Stedium Biotech GmbH, Deutschland
Autoklav Systec V-150	Systec GmbH, Deutschland
Bioreaktor Biostat® A Plus	Sartorius Stedium Biotech GmbH, Deutschland
Brutschrank Heracell™ 240	Heraeus, Deutschland
Chromatographiesäule HiTrap® Q HP	GE Healthcare, USA
Cleanbench Herasafe™	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Cleanbench MSC Advantage	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Eismaschine AF 103	Scotsman Ice Systems, USA
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX50	Olympus GmbH, Deutschland
FPLC-System BioLogic Duo-Flow	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
French Press M-110 L Microfluidizer® Processor	Microfluidics, USA
Gefrierschrank Forma™ 900 Series	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Geldokumentation UV System	Intas, Deutschland
HisPur™ Ni-NTA <i>Spin Columns</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Inkubatorschrank	Thermo Electron Corporation
Kolbenhub-Pipetten (versch. Größen)	Brand GmbH, Deutschland
Kryobehälter MVE	MVE Cryogenics
Kühl -und Gefrierschrank	Siemens AG, Deutschland
Magnetrührer RCT b	IKA Werke GmbH, Staufen

Fortsetzung Tabelle 17: Verwendeten Arbeitsgeräte

Gerät / System	Hersteller, Land
MicroPulser Electroporator	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Mikropipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Olympus IX 50	Olympus, Deutschland
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
pH-Elektrode	Leighton Buzzard, Großbritannien
Photometer Multiskan Go	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Photometer Multiskan Spectrum	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Reinstwassersystem Arium® pro VF-B	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Replikatorstempel 4708.1, 4709.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instruments, Deutschland
Sauerstoffsonde Visiferm DO 225	Hamilton, Schweiz
Scanner Perfection V750 Pro	Epson, Japan
Schüttelinkubator Certomat BS-1	B. Braun Biotech International GmbH, Deutschland
SDS-PAGE Gelsystem	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
SDS-PAGE Gelsystem Mini-PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories Inc., Deutschland
Tetra Cell	
Thermocycler Doppio	VWR International, Deutschland
Thermoblock	Eppendorf AG, Deutschland
Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Deutschland
Ultraschallsonde LABSonic®	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Vortex – Mixer VM-300	GEMMY INDUSTRIAL CORP., Taiwan
Waage (CP8201, Isocal AC211 S)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Deutschland
Western Blot TransBlot® SD Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., Deutschland
YSI 2700 SELECT™ Biochemistry Analyzer	YSI Incorporated, USA

Fortsetzung Tabelle 17: Verwendeten Arbeitsgeräte

Gerät / System	Hersteller, Land
Zählkammer, Neubauer	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zentrifuge Heraeus® Fresco 17	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Zentrifuge Heraeus® Megafuge® 1.0 RS	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Tabelle 18: Verwendete Software

Software	Hersteller, Land
cell ^B Imaging	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Deutschland
Intas-Capture-Software	Intas Science Imaging
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
Nanodrop 1000 V3.7.1	PeqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
CLC Sequence Viewer 6	QIAGEN, Niederlande
Inkscape 0.92	Free Software Foundation, Inc., USA
Serial Cloner 2.6	Serial Basics, USA
Image J	Wayne Rasband (National Institute of Health) USA
GelAnalyzer	Lazersoftware
OriginLab 2019b	OriginLab Corporation, USA
Reaktorüberwachung MFCS	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Modde Pro	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland

6.4 Kulturmedien, Puffer und Reagenzlösungen

Die pH-Werte der hergestellten Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, mit 1 M HCl und 5 M NaOH eingestellt. Die hergestellten Medien wurden durch Autoklavieren (20 min bei 121 °C) oder Sterilfiltrieren (Porengröße des Filters 0,22 µm) sterilisiert.

6.4.1 Kultusmedien und Zusätze für die Kultivierung und den Zellaufschluss von *K. phaffii*

Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) Medium

Tabelle 19: Zusammensetzung YPD-Medium

Bestandteil	Masse oder Volumen
Hefeextrakt	10 g
Pepton	10 g
Antischaum	200 µl
	ad 900 mL H ₂ O
	pH 5,8, autoklavieren

Tabelle 20: Zuckerlösung (10xD) für das YPD-Medium

Bestandteil	Masse oder Volumen
Glucose Monohydrat	220 g
	ad 1 L H ₂ O
	autoklavieren

Für die Kultivierung werden 900 mL des YPD-Grundmediums mit 100 mL 10xD-Lösung komplettiert. Für das Gießen von Platten wird dem Medium vor dem Autoklavieren 20 g/L Agar zugegeben.

Buffered Glycerol-complex (BMGY) und Buffered Methanol-complex (BMMY) Medium

Tabelle 21: Zusammensetzung BMGY/BMMY-Medium

Bestandteil	Konzentration
Kaliumphosphat	100 mM (pH 6)
Yeast nitrogen base	1,34 %
Hefeextrakt	1 %
Pepton	2 %
Biotin	4 %
Glycerol (G) bzw. Methanol (M)	1% bzw. 0,5%

Buffered Minimal Glycerol (BMG) und Buffered Minimal Methanol (BMM) Medium

Die gepufferten Minimalmedia BMG und BMM werden ohne Hefeextrakt und Pepton angesetzt.

Tabelle 22: Zusammensetzung BMG/BMM-Medium

Bestandteil	Konzentration
Kaliumphosphat	100 mM (pH 6)
Yeast nitrogen base	1,34 %
Biotin	4 %
Glycerol (G) bzw. Methanol (M)	1% bzw. 0,5%

*Minimal Dextrose (MD) und Minimal Methanol (MM) Medium***Tabelle 23:** Zusammensetzung MD/MM-Medium

Bestandteil	Konzentration
Yeast nitrogen base	1,34 %
Biotin	4 %
Dextrose (D) bzw. Methanol (M)	2% bzw. 0,5 %

Das Medium wird sterilfiltriert. Für das Gießen von Platten wird dem Medium vor dem Autoklavieren 20 g/L Agar zugegeben.

Zellaufschluss

Der Puffer für den Zellaufschluss wird sterilfiltriert und bei im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Tabelle 24: Zusammensetzung des Lysepuffers

Bestandteil	Masse oder Volumen
EDTA	372 mg
Glycerol	50 ml
Natriumdihydrogenphosphat	6 g
	ad 1L H ₂ O
	pH 7,4

*Elektroporation***Tabelle 25:** BEDS-Lösung

Bestandteil	Konzentration
Bicine-NaOH, pH 8.3	10 mM
Ethylenglykol	3% (v/v)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	5% (v/v)
Sorbitol	1 M

Tabelle 26: Selektionsmedium (Agar)

Bestandteil	Konzentration
Yeast nitrogen base (YNB) ohne Aminosäuren mit Ammoniumsulfat	0,17 % (w/v)
Sorbitol	1 M
Glukose	2 % (w/v)
Agar	2 % (w/v)

Die Lösungen werden sterilfiltriert.

6.4.2 Kultivierungsmedien und Zusätze für die Kultivierung und den Zellaufschluss von *E. coli*

LB-Miller-Medium

Tabelle 27: Zusammensetzung LB-Miller-Medium (*lysogeny broth*)

Bestandteil	Masse oder Volumen
Hefeextrakt	5 g
Natriumchlorid	10 g
Trypton	10 g
	ad 1 L H ₂ O
	pH 7, autoklavieren

Für das Gießen von Platten wird dem Medium 15 g/L Agar zugegeben. Das Medium wird autoklaviert, auf 60 °C abgekühlt und die jeweilige Antibiotikastammlösung zugegeben.

*ZYP-Medium***Tabelle 28:** Puffer für ZYP-Medium (definiertes Medium)

Bestandteil	Masse oder Volumen
KH ₂ PO ₄	6,8 g
Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O	8,9 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,3 g
	ad 900 mL H ₂ O
	pH 7, autoklavieren

Die Spurenelement-Stammlösungen werden sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Tabelle 29: Spurenelemente-Stammlösungen

	Bestandteile	Masse oder Volumen
0,4 M (200x) MgSO ₄ - Stammlösung	MgSO ₄	2,4 g ad 50 mL H ₂ O
0,2 M (2000x) FeCl ₃ - Stammlösung	FeCl ₃	1,6 g ad 50 mL H ₂ O
1,06 mM (2000 x) NaMoO ₄ - Stammlösung	NaMoO ₄	0,218 g ad 50 mL H ₂ O
Spurenelemente-Stammlösung (1000x)	ZnCl ₂ H ₃ BO ₃ MnCl ₂ · 4 H ₂ O FeSO ₄ · 7 H ₂ O CoCl ₂ · 6 H ₂ O CuSO ₄ · 5 H ₂ O NiSO ₄ · 6 H ₂ O	6,54 g 2,00 mg 8,90 mg 400,00 mg 5,00 mg 10,00 mg 10,00 mg ad 100 mL H ₂ O

Tabelle 30: Zuckerlösung für das ZYP-Medium (definiertes Medium)

Bestandteil	Masse oder Volumen
Glucose Monohydrat	55 g ad 250 mL H ₂ O autoklavieren

Die Spurenelementlösungen, Zucker und der Puffer (Tabelle 17) werden erst kurz vor der Verwendung zusammengegeben und die jeweilige Antibiotika-Stammlösung ergänzt.

Tabelle 31: Zusammensetzung des ZYP-Mediums

Bestandteil	Masse oder Volumen
Puffer	900 mL vorlegen
Zuckerlösung	50 mL
Spurenelemente-Stammlösung	1 mL
FeCl ₃ - Stammlösung	0,5 mL
NaMoO ₄ - Stammlösung	0,5 mL
MgSO ₄ -Stammlösung	10 mL
Vorkultur	x mL je nach gewünschter OD ₆₀₀ ad 1 L Puffer

Antibiotikastammlösungen

Die Antibiotikastammlösungen werden sterilfiltriert und in 1 mL Aliquots bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Tabelle 32: Verwendete Antibiotika-Stammlösungen

Bestandteil	Masse oder Volumen	Konzentration
Ampicillin	1 g ad 10 mL H ₂ O	100 mg·mL ⁻¹
Penicillin/Streptomycin	0,1 g ad 10 mL H ₂ O	10 mg·mL ⁻¹
Tetracyclin	10 g 70% Ethanol	0,5 mg·mL ⁻¹

IPTG

Die IPTG-Stammlösung wird sterilfiltriert und in 0,5 mL Aliquots bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

Tabelle 33: IPTG-Stammlösung

Bestandteil	Masse oder Volumen	Konzentration
IPTG	595 mg ad 5 mL H ₂ O	0,5 M

Zellaufschluss

Der Puffer für den Zellaufschluss wird sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 34: Zusammensetzung des Lysepuffers

Bestandteil	Masse oder Volumen
Tris-HCl, pH 8,0	394 mg
Natriumchlorid	1,46 g
Magnesiumchlorid	23,8 g
	ad 50 mL H ₂ O
	pH 8

6.4.3 Kultivierungsmedien *HUVEC**Medium***Tabelle 35:** Zusammensetzung des HUVEC-Kultivierungsmediums

Bestandteil	Menge
Endothel Cell Basal Medium 2	500 mL
Grwoth Medium SupplementMix	1 Packung

Das angesetzte Medium wird im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Vor Verwendung wird das entsprechende Volumen steril abgenommen und in ein Falcontube überführt. Dieses wird im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

6.4.4 Solubilisierung und FPLC

Die nachfolgenden Puffer werden sterilfiltriert und bei Raumtemperatur gelagert. Die FPLC-Puffer werden vor der Verwendung im Ultraschallbad entgast.

IB-Wasch- und Solubilisierungspuffer

Tabelle 36: Zusammensetzung des IB-Waschpuffers

Bestandteil	Konzentration
Tris	50 mM
Natriumchlorid	100 mM
EDTA	1 mM
Harnstoff	1M
Triton X-100	1 %
	pH 8

Tabelle 37: Zusammensetzung eines 10 x PBS-Puffers

Bestandteil	Masse oder Volumen
Natriumchlorid	80 g
Kaliumchlorid	2 µl
Natriumdihydrogenphosphat	14,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,4
	ad 100 mL H ₂ O

Für die Solubilisierung wurde der Puffer 10-fach mit Wasser verdünnt und Urea je nach Experiment in verschiedenen Mengen zugegeben.

Aufreinigung mittels HisPur™ Ni-NTA Spin Columns

Tabelle 38: Zusammensetzung des Equilibrierungspuffers

Bestandteil	Volumen oder Konzentration
1x PBS (siehe Tabelle 37)	50 mL
Imidazol	10 mM

Tabelle 39: Zusammensetzung des Waschpuffers

Bestandteil	Volumen oder Konzentration
1x PBS (siehe Tabelle 37)	50 mL
Imidazol	50 mM

Tabelle 40: Zusammensetzung des Waschpuffers

Bestandteil	Volumen oder Konzentration
1x PBS (siehe Tabelle 37)	50 mL
Imidazol	500 mM

Aufreinigung und On-column Refolding mittels HiTrapTM-IMAC-HP-Säule

Die hergestellten Lösungen werden sterilfiltriert und vor jeder Verwendung im Ultraschallbad entgast.

Tabelle 41: Zusammensetzung des Bindungspuffers

Bestandteil	Volumen oder Konzentration
1x PBS (siehe Tabelle 37)	500 mL
Urea	3 M
Imidazol	20 mM

Tabelle 42: Zusammensetzung des Elutionspuffers

Bestandteil	Volumen oder Konzentration
1x PBS (siehe Tabelle 37)	50 mL
Urea	3 M
Imidazol	500 mM

Tabelle 43: Zusammensetzung der Nickelsulfatlösung

Bestandteil	Masse oder Volumen
Nickelsulfat (Heptahydrat)	0,28 g ad 10 mL H ₂ O

On-column Refolding mittels HiTrapTM-IMAC-HP-Säule

Zusätzlich zu den bereits in den Tabellen 41 – 43 beschriebenen Puffern, werden folgende Puffer benötigt. Die hergestellten Lösungen werden sterilfiltriert und vor jeder Verwendung im Ultraschallbad entgast.

Tabelle 44: Zusammensetzung des *Refolding*puffers

Bestandteil	Volumen oder Konzentration
1x PBS (siehe Tabelle 37)	500 mL
Imidazol	20 mM

Tabelle 45: Zusammensetzung des *Refolding*-Elutionspuffers

Bestandteil	Volumen oder Konzentration
1x PBS (siehe Tabelle 37)	50 mL
Imidazol	500 mM

6.4.5 SDS-PAGE**Tabelle 46:** Zusammensetzung eines 12 % Trenngels

Bestandteil	Masse oder Volumen
Rotiphorese 40 (37,5:1)	1,5 mL
SDS (1%)	500 µl
Tris-HCl (pH 8,8)	1,4 mL
H ₂ O	1,6 mL
TEMED	10 µl
APS (25 %)	10 µl

Tabelle 47: Zusammensetzung eines 6 % Sammelgels (für 1-4 Gele)

Bestandteil	Masse oder Volumen
Rotiphorese 40 (37,5:1)	750 µl
SDS (1%)	300 µl
Tris-HCl (pH 6,8)	630 µl
H ₂ O	3,77 mL
TEMED	10 µl
APS (25 %)	10 µl

Tabelle 48: 10x TGS-Puffer

Bestandteil	Masse oder Volumen
Tris	3 g
Glycin	140 g
SDS	10 g
	ad 1 L H ₂ O
	pH 8,3

Tabelle 49: 2x SDS-Probenpuffer

Bestandteil	Masse oder Volumen
Bromphenolblau	20 mg
EDTA-Natriumsalz	58 mg
SDS	5 g
Tris-HCl	0,315 g
	ad 80 mL H ₂ O

Tabelle 50: Laemmli-Puffer

Bestandteil	Masse oder Volumen
2 x SDS Probenpuffer	800 µl
Glycerin (55 %ig)	100 µl
β-Mercaptoethanol	100 µl

Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Tabelle 51: Zusammensetzung der kolloidalen Coomassie-Färbelösung (Candiano et. Al. 2004)

Bestandteil	Masse oder Volumen
Coomassie Brilliant Blue G250	490 mg
Ammoniumsulfat	40,8 g
Phosphorsäure (85%)	48 mL
Methanol	82 mL
H ₂ O	367 mL

Die Lösung wird in einer braunen Flasche bei 4 °C aufbewahrt. Vor Verwendung muss die Flasche geschüttelt werden.

6.4.6 Western Blot

Tabelle 52: Zusammensetzung des Transferpuffers

Bestandteil	Masse oder Volumen
Tris	0,3 g
Glycin	1,5 g
Methanol	20 ml
	ad 100 mL H ₂ O

Tabelle 53: Zusammensetzung des Blockpuffers

Bestandteil	Masse oder Volumen
Magermilchpulver	5 g
	ad 100 mL PBS

Tabelle 54: Zusammensetzung eines 10 x PBS-Puffers

Bestandteil	Masse oder Volumen
Natriumchlorid	80 g
Kaliumchlorid	2 µl
Natriumdihydrogenphosphat	14,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,4
	ad 100 mL H ₂ O

Tabelle 55: Zusammensetzung eines PBST-Puffers

Bestandteil	Masse oder Volumen
10 % Tween 20	2,5 mL
	ad 500 mL 1xPBS

Tabelle 56: Zusammensetzung der 1. Antikörperlösung

Bestandteil	Masse oder Volumen
Primärer Antikörper (Anti-FGG)	50 µl
Block-PBST (1:1)	5 mL

Tabelle 57: Zusammensetzung der 2. Antikörperlösung

Bestandteil	Masse oder Volumen
Sekundärer Antikörper (Anti-Maus)	4 µl
Block-PBST (1:1)	20 mL

6.4.7 Bradford-Assay

Tabelle 58: Zusammensetzung der BSA-Stammlösung

Bestandteil	Masse oder Volumen
BSA	40 mg
	ad 1 mL H ₂ O

Die Stammlösung wird sterilfiltriert.

6.4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Tabelle 59: Zusammensetzung des 50x TAE-Laufpuffers

Bestandteil	Masse oder Volumen
Tris	242 µl
Essigsäure	57,1 mL
EDTA (0,5 M)	100 mL
	ad 25 mL H ₂ O

6.5 Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme

Tabelle 60: Verwendete Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme

Stammbezeichnung	Herkunft
One-shot chemically competent <i>E.coli</i> TOP10	IBA GmbH, Deutschland
<i>Pichia pastoris</i> #SMD1168	Life Technologies, Deutschland
<i>E. coli</i> Tuner™ (DE3) Competens Cells	Merck KgaA, Deutschland
HUVECp-1M	Gibco Invitrogen Life Technologies, Deutschland

6.6 Plasmidkarten

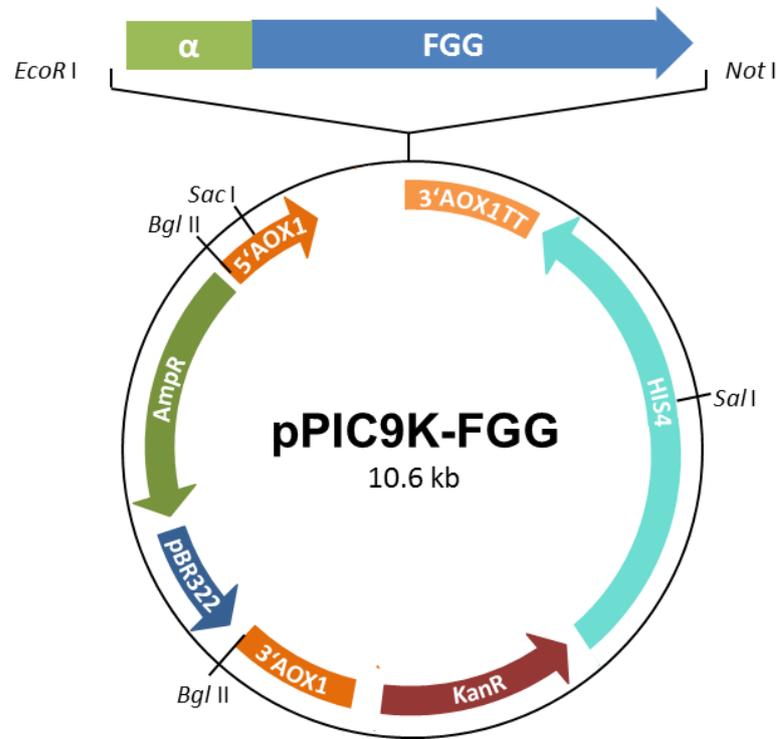


Abbildung 37: Vektorkarte von pPIC9K-FGG

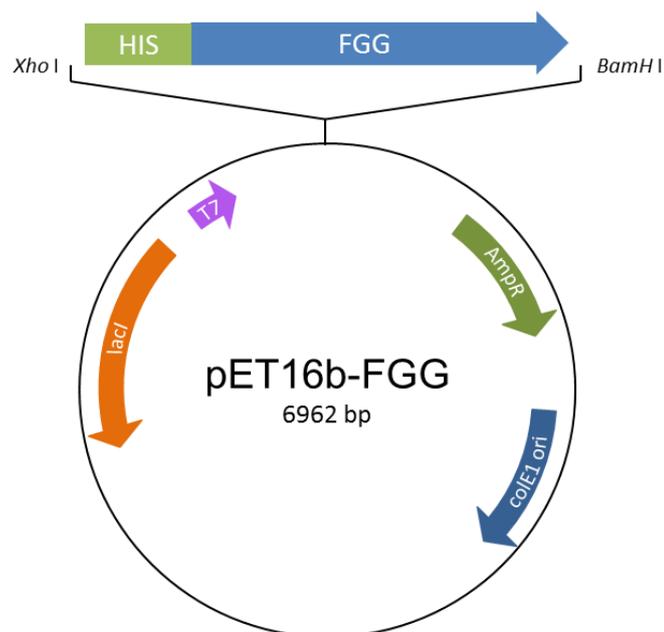


Abbildung 38: Vektorkarte von pET16b-FGG

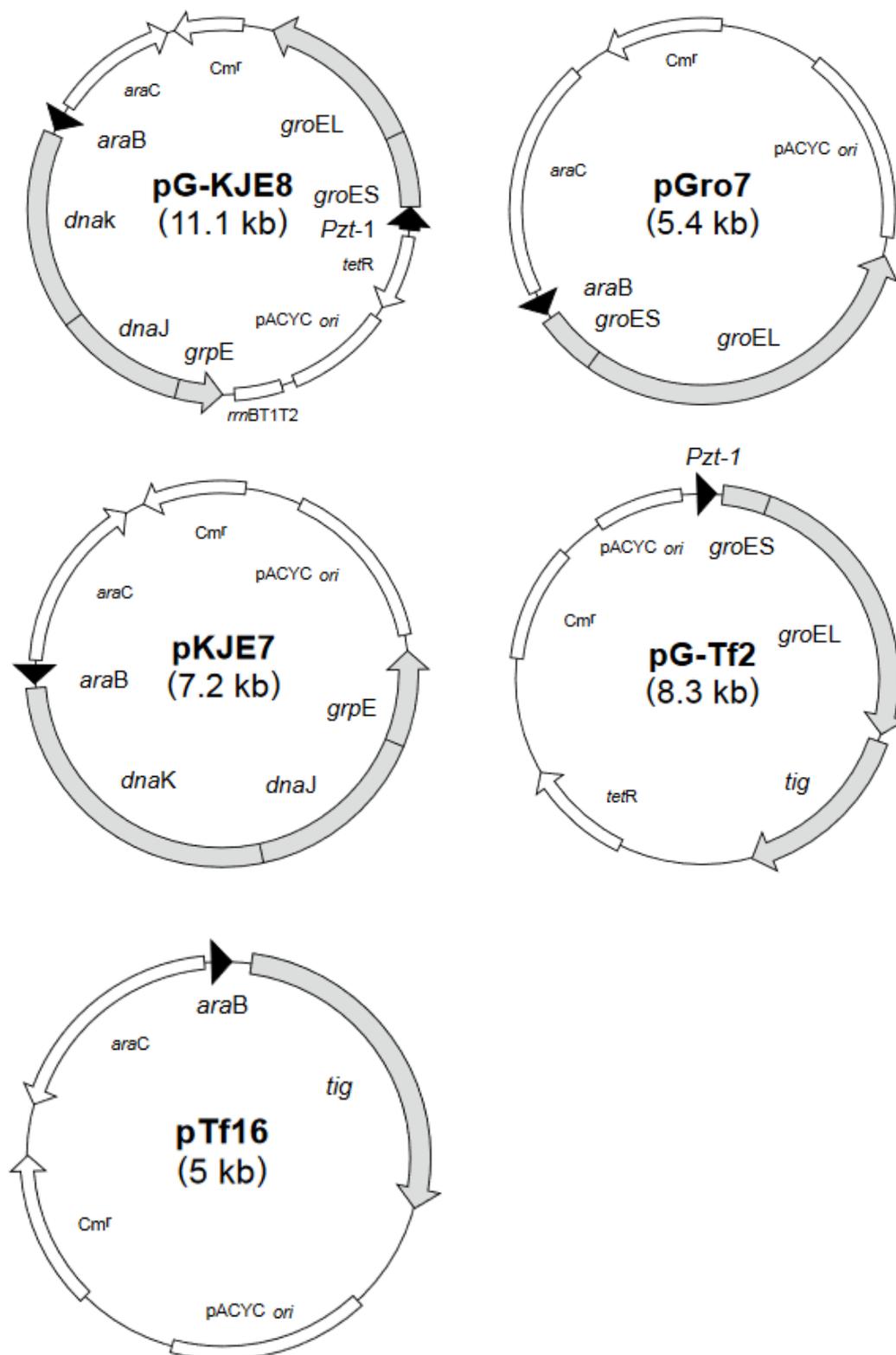


Abbildung 39: Vektorkarten der Plasmide aus dem Plasmid Chaperone Kit (TaKaRa)

7 Anhang B – Methoden

7.1 Molekularbiologische Methoden

7.1.1 Enzymatische Spaltung von DNA

Die Spaltung der DNA erfolgt mit den Restriktionsenzymen der Firmen Fermentas gemäß der Angaben der Hersteller in den entsprechenden Puffern. Der Verdau erfolgt für 1h bei 37 °C. Es werden ca. 200 ng der zu verdauenden DNA eingesetzt. Die Produkte der enzymatischen Spaltung werden auf Agarosegele aufgetragen und analysiert.

7.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Es werden jeweils 1,5 % Agarosegele verwendet. Dazu werden 1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TAE Puffer gelöst und in der Mikrowelle für 120 s (900 Watt) erhitzt. Anschließend werden 5 µl einer Roti®Safe GelStain zugegeben und die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Danach werden Schablonen für die Probenaschen eingesetzt. Nach dem Festwerden des Gels wird dieses in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die Schablonen werden herausgezogen und 20 µl der DNA-Proben in die Taschen pipettiert. Des Weiteren werde 6 µl der 100 bp Markers (3 µl Marker + 3 µl Puffer) aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgt bei einer Spannung von 100 V für 45 min. Die Gele werden unter UV-Anregung fotografiert.

7.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wird mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden ebenfalls von der Firma Qiagen hergestellt. Dazu wird das aufzureinigende Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen. Das 3fache Gelvolumen von QG Puffer (100 µg \approx 100 µl) werden hinzugefügt und bei 50 °C solange geschüttelt, bis sich das Gel aufgelöst hat. Es werden dann 1 Gelvolumen

Isopropanol hinzugegeben. Die Lösung wird gemischt und auf eine QIAquick column gegeben. Bei höchster Geschwindigkeit wird die Lösung für eine Minute zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die Membran mit 750 µl PE Puffer gewaschen. Die spin column wird für 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und erst dann das PE herunter zentrifugiert. Anschließend wird die spin column in eine neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß gestellt und die DNA mit 40 µl 10 mM Tris (pH 8,5) eluiert und die Konzentration des Eluats am NanoDrop-1000 bestimmt.

7.1.4 Ligation von DNA-Enden

Die Verknüpfung von DNA-Enden wird mit einer T4-Ligase der Firma Fermentas durchgeführt. Dazu werden je 9 µl der aufgereinigten DNA-Fragmente mit je 9 µl des Vektors und mit 2 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer vereinigt. Anschließend wird 1µl (5 U) der T4-Ligase hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

7.1.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der DNA wird von der Firma Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Dazu werden 15 µl der zu untersuchenden DNA-Lösung (80-100 ng/µl) mit 5 µl des Primers vermischt und an Eurofins MWG Operon gesendet. Die Ergebnisse der Sequenzierung werden mit dem CLC-Sequence Viewer ausgewertet.

7.1.6 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation werden die kompetenten *E. coli* langsam im Eisbad aufgetaut. Pro Transformationsansatz werden 50 µl *E. coli* und 10 µl (entspricht 50 ng) der DNA verwendet. Der Ansatz werden nach Zugabe der DNA 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt ein Hitzeschock für 5 min bei 37 °C. Die Bakterien werden dann weitere 2 min auf Eis gekühlt. Bei Ampicillinresistenz werden die Zellsuspension auf Agar-Platten ausgestrichen. Bei bestehender Kanamycinresistenz werden die Bakterien in vorgewärmten 900 µl LB-Medium aufgenommen und bei

37 °C für 45 min im Heizblock inkubiert. 100 µl der Zellsuspension werden auf Agar-Platten mit Kanamycin ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.1.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mittels Miniprep

Für die Isolation kleinerer Mengen Plasmid-DNA wird das QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen verwendet. Es werden einige Abwandlungen zum vorgeschlagenen Protokoll der Firma Qiagen vorgenommen. Dazu wird ein Klon über Nacht in 3 ml LB-Medium, mit 50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin, bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wird für 10 min bei 3342 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 250 µl P1 Puffer resuspendiert. Anschließend werden 250 µl P2 Puffer hinzugegeben und das Eppendorf Gefäß 4-6 mal invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 350 µl N3 Puffer zu der Lösung gegeben und die Lösung durch invertieren des Tube für 4-6mal gemischt. Die Lösung wird für 10 min bei der höchsten Geschwindigkeit der Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig auf eine QIAprep *spin column* gegeben. Diese wird dann für 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wird die QIAprep *spin column* mit 750 µl PE Puffer gewaschen und das PE danach abzentrifugiert. Durch erneutes Zentrifugieren wird sichergestellt, dass das PE vollkommen entfernt wird. Die QIAprep *spin column* wird dann in eine neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und die Plasmid-DNA wird mit 40 µl 10 mM Tris (pH 8,5) eluiert. Die Konzentration wird am NanoDrop-1000 bestimmt.

7.1.8 Isolierung von RNA aus *K. phaffii*

Für die Isolation von RNA wird das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Isolation wird laut Herstellerangaben durchgeführt.

7.1.9 Reverse Transkription

Für die Umschreibung der RNA in DNA werden 2 µg der isolierten RNA mit 3 µl oligo(dt)Primer vermischt. Anschließend wird mit RNAse freiem Wasser auf 27 µl aufgefüllt. Die Denaturierung erfolgt für 5 Minuten bei 65 °C im Thermomixer. Danach wird der Mix eine Minute auf Eis inkubiert. Die reverse Transkription erfolgt dann für eine Stunde bei 37 °C nach Zugabe von 8 µl Reverse Transkriptase Puffer (5x), 4 µl dNTPs und 1 µl der reversen Transkriptase.

7.1.10 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann photometrisch ermittelt werden. Dabei wird die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 nm gemessen wird, da Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum aufweisen. Über das Lambert-Beersche Gesetz kann dann die Konzentration bestimmt werden. Der Extinktionswert ist bei einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA näherungsweise 1.

$$E = c \cdot d \cdot e$$

E = Extinktion

c = Konzentration (mol/L)

d = Dicke der Küvette (cm)

e = molarer Extinktionskoeffizient (L·mol⁻¹·cm⁻¹)

Die Messung findet am Nanodrop 1000 von Thermo Scientific mittels der Software ND1000 statt. Als Blankprobe wird der Puffer verwendet, in dem die DNA gelöst ist.

7.1.11 Polymerasekettenreaktion

Zur Überprüfung der transformierten *P. pastoris* bzw. *E. coli*-Zellen wird eine Kolonie-PCR mithilfe des KAPA2G Robust PCR Kits durchgeführt. Der Mastermix setzt sich folgendermaßen zusammen.

Tabelle 61: 2x SDS-Probenpuffer

Bestandteil	Masse oder Volumen
5 x KAPA2G Buffer	5 µl
5 x KAPA2G Enhancer	5 µl
1 mM dNTP Mix	0,5 µl
10 µM forward Primer	1 µl
10 µM reverse Primer	1 µl
KAPA2G Robust DNA Polymerase	0,1 µl
Template DNA	je nach Konzentration ad 25 µL RNase freies Wasser

Für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion wird folgendes Programm verwendet:

Tabelle 62: Protokoll der durchgeführten Polymerase-Kettenreaktion

	Temperatur [°C]	Zeit [s]
Schritt 1	95	180
Schritt 2	95	15
Schritt 3	58	15
Schritt 4	72	30
Schritt 5	72	420
Schritt 6	4	∞

Die Schritte 2-4 werden 35 x hintereinander wiederholt.

Dieses Protokoll wird auch nach der reversen Transkription eingesetzt.

7.2 Arbeiten mit *Komatagaella phaffii* (*Pichia pastoris*)

7.2.1 Transformation mittels Elektroporation

Es wird die Transformation für *Pichia pastoris* von Lin-Cereghino *et al.* [71] durchgeführt, um kompetente Zellen zu erzeugen. Dazu wird eine Übernachtskultur (50 mL, 30 °C, 200 rpm, YPD-Medium) angesetzt. Am nächsten Morgen wird eine Hauptkultur so beimpft, dass eine OD₆₀₀ von 0,1 rel. AU erreicht wurde. Die Kultur wird so lange bei 30 °C im Schüttelkolbeninkubator inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,8-1 rel. AU erreicht wird. Die Zellen werden 5 min bei 500 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das Pellet in 9 mL eiskalter BEDS-Lösung mit 1 mL 1 M DTT-Lösung resuspendiert. Die Zellen werden 5 min bei 30 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Danach werden die Zellen erneut für 5 min bei 500 xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 0,25 mL BEDS-Lösung resuspendiert und in eisgekühlte Elektroporationsküvetten gegeben. Anschließend wird die linearisierte DNA in einer Konzentration von 50-100 ng hinzugefügt. Danach erfolgt eine Inkubation auf Eis für 2 min. Die Elektroporation wird anschließend mit den folgenden Parametern durchgeführt: 1500 V, 200 Ω, 30 µF. Die Zellen werden nach der Elektroporation für drei Stunden in Flüssigmedium bei 30 °C inkubiert bevor sie auf Selektionsmediumsagarplatten ausplattiert werden.

7.2.2 Anlegen von Kryokulturen

Um Kryokulturen anzulegen, wird eine *Komatagaella phaffii* Kultur über Nacht bei 30 °C und 200 rpm in 10 ml YPD-Medium in einem 100 ml Schüttelkolben angezogen. Die Kultur wird auf 50 ml mit einer Animpfdichte von 0,1 rel AU expandiert und so lange bei 30 °C und 200 rpm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 10 rel. AU erreicht ist. Die Zellen werden bei 4 °C zentrifugiert (1500 x g, 5 min) und in YPD-Medium mit 20 % Glycerol (w/v) resuspendiert, sodass die OD₆₀₀ 50 rel. AU beträgt. Die Lösung wird aliquotiert und bei - 80 °C gelagert.

7.2.3 Kultivierung und Induktion im Schüttelkolben und Multiwellplatten

Die Kultivierungen im Schüttelkolben, in der 6-, 24- und 96-Wellplatte werden gleich geführt. Das Arbeitsvolumen beträgt 10 % vom Nennvolumen des Kultivierungsgefäßes, um einen ausreichenden Sauerstoffeintrag zu gewährleisten.

Für die Vorkulturen von Agar-Platten werden einzelne Klone gepickt und in BMGY/MD resuspendiert und 24 Stunden bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Beim Ansetzen von Vorkulturen aus Kryokulturen werden diese schnell erwärmt und in 25 mL BMGY/BMG/MD resuspendiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 30 °C und 200 rpm.

Die Hauptkulturen werden mit einer OD₆₀₀ von 1 rel. AU (Mut⁺) oder mit einer OD₆₀₀ von 5 rel. AU (Mut^S) angeimpft. Für Proteinproduktion wird (bei der Hauptkultur) Methanol-haltiges Medium (wie BMMY, BMM oder MM) verwendet. Die Kultivierung erfolgt über 3-7 Tage. Um eine ununterbrochene Kohlenstoffversorgung sowie Induktion zu gewährleisten, erfolgt eine zweimal tägliche Zugabe von 0,5 % Methanol.

7.2.4 *Posttransformational vector amplification*

Die Hefekolonien werden auf YPD-Agarplatten herangezogen. Anschließend werden die Kolonien gepickt und vereinzelt auf Geneticin-haltige (0,25; 0,5; 1; 2; 3 und 4 mg/mL) Agarplatten übertragen. Angewachsene Kolonien werden auf die nächsthöhere „Genetecinkonzentrationsplatte“ übertragen. Je resistenter eine Kolonie gegen Genetecin ist, desto mehr Expressionskassetten enthält ihre DNA.

7.2.5 Zellaufschluss

Die Proben, welche während der Kultivierung entnommen werden, werden für 5 min bei 2000 *xg* bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µL Breaking Puffer resuspendiert. Danach wurde das gleiche Volumen an Glasbeads zugegeben. Für den Zellaufschluss erfolgte ein Zyklus

aus 30 s vortexen und 30 s auf Eis inkubieren. Dieser Zyklus wird achtmal wiederholt.

7.2.6 Yeastern Blot

Es wurde das Protokoll von Cregg *et. al.* [72] verwendet. Frisch angewachsene Kolonien werden auf Whatman Filterpapier 1 übertragen. Anschließend wird das Papier auf eine Agarplatte mit Induktionsmedium (BMMY) gelegt, sodass die Zellen nach oben gerichtet sind. Es erfolgt eine Inkubation bei 30 °C für 1-2 Tage. Eine Nitrozellulosemembran wird auf die Größe des Filterpapiers zugeschnitten und mindestens 5 min in 15 mL Transferpuffer inkubiert. Mit zwei Filterpapieren wird gleich verfahren. Das Filterpapier mit den Kolonien und die Nitrocellulosemembran werden zwischen die mit Transferpuffer getränkten Filterpapiere platziert. Danach erfolgt die Übertragung der Proteine mittels konstantem Strom (1-4 mA/cm²) auf die Nitrocellulose. Alle weiteren Schritte entsprechen der Immunofärbung des Western Blots (Abschnitt 7.6.4).

7.2.7 Messung der optischen Dichte

Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei 600 nm im Photometer. Ist die optische Dichte höher als 0,8 rel. AU werden die Proben verdünnt. Die Verdünnung erfolgt mit einer 0,9 % (w/v) Natriumchlorid-Lösung. Anschließend wird die Probe erneut vermessen.

7.3 Arbeiten mit *Escherichia coli*

7.3.1 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation werden die kompetenten *E. coli* langsam im Eisbad aufgetaut. Pro Transformationsansatz werden 50 µl *E. coli* und 10 µl (entspricht 50 ng) der DNA verwendet. Der Ansatz werden nach Zugabe der DNA 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgt ein Hitzeschock für 5 min bei 37 °C. Die Bakterien werden

dann weitere 2 min auf Eis gekühlt. Bei Ampicillinresistenz wird die Zellsuspension auf Agar-Platten ausgestrichen. Bei bestehender Kanamycinresistenz werden die Bakterien in vorgewärmten 900 µl LB-Medium aufgenommen und bei 37 °C für 45 min im Heizblock inkubiert. 100 µl der Zellsuspension werden auf Agar-Platten mit Kanamycin ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.3.2 Anlegen von Kryokulturen

Beim Anlegen von Kryokulturen aus einzelnen Kolonien, werden einzelne Kolonien von der Platte gepickt und über Nacht bei 37 °C in 10 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 180 rpm kultiviert. Bei der Stammhaltung, wird eine Kryokultur aufgetaut und über Nacht bei 37 °C in 20 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 180 rpm kultiviert.

Am nächsten Morgen wird eine Hauptkultur (50 mL LB-Medium) so beimpft, dass eine OD_{600} von 0,15 rel. AU eingestellt wird. Bei 37 °C und 180 rpm wird bis zum Erreichen von einer OD_{600} von 3 rel. AU kultiviert. Dann werden jeweils 700 µl Kulturbrühe mit 300 µl sterilem Glycerol gemischt und bei 80 °C eingefroren.

7.3.3 Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab

Es wird eine Vorkultur in einem 100 mL Schüttelkolben angesetzt. Dazu werden 25 mL LB-Medium vorgelegt und mit Ampicillin komplettiert. Anschließend wird eine Kryokultur aufgetaut und in dem vorlegten Medium resuspendiert. Die Kultivierung bei 37 °C und 180 rpm bis eine OD_{600} von 3 rel. A.U erreicht wird. Für die zweite Vorkultur werden 100 mL ZYP-Medium mit Antibiotikum in einem Schüttelkolben vorgelegt. Die zweite Vorkultur wird so beimpft, dass eine OD_{600} von 0,15 rel. AU erreicht werden. Es folgt eine Inkubation bei 37 °C und 180 rpm über Nacht. Am nächsten Morgen kann die Hauptkultur beimpft werden. Dafür werden in einem Schüttelkolben 100 mL von ZYP-Medium mit Ampicillin vorgelegt. Die Hauptkultur wird mit einer optischen Dichte von 0,2 rel. AU angeimpft. Es folgt

eine Inkubation bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen gewünschten optischen Dichte bei 600 nm. Die Induktion wird mit IPTG-Konzentration eingeleitet. Für einige Versuche wird die Kultivierungstemperatur bei Induktion gesenkt. Für weitere Analysen wird stündlich eine Probe der Bakteriensuspension entnommen und deren optische Dichte gemessen. Anhand dieser das benötigte Volumen für die spätere normierte Analyse bestimmt. Das benötigte Volumen wird in 2 ml Mikroreaktionsgefäße gefüllt und anschließend zum Ernten der Zellen 5 min bei 14400 \times g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Präzipitat der unlöslichen Fraktion bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

7.3.4 Kultivierung im Bioreaktor

Für die Kultivierung in Bioreaktor wird eine Vorkultur im Schüttelkolben (Abschnitt 7.3.3) angesetzt.

Die Hauptkultur wird im 2 L-Rührkesselreaktor bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Der pH wird auf einen Wert von 7 mit 1 M HCl und 10 Gew.-% NH₃-Lösung statiert. Zur Reduzierung der Schaumbildung wird dem Medium Antischaum zugesetzt. Die Regelung der Rührgeschwindigkeit erfolgt kaskadierend, sodass eine Gelöstsauerstoffkonzentration von 20 % gewährleistet wird.

Der Bioreaktor wird mit einer optischen Dichte von 0,2 rel. AU beimpft. Beim Erreichen einer optischen Dichte von 2 rel. AU wird mit 0,58 mM IPTG induziert.

Es werden regelmäßig Proben der Bakteriensuspension über den Kultivierungszeitraum entnommen und deren optische Dichte bestimmt. Anhand dieser wird das benötigte Volumen der Bakteriensuspension für die spätere normierte Analyse berechnet und entsprechend gewonnen. Diese werden in je 2 ml Mikroreaktionsgefäße gefüllt und anschließend zum Ernten der Zellen 5 min bei 14400 \times g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zudem wird die Glucosekonzentration während der Kultivierung mit Hilfe eines YSI-Analysers ermittelt. Für die

Bestimmung der Biotrockenmasse werden in der Vorbereitung Mikrotitrationsgefäße mit Hilfe eines Trockenschrankes dehydriert. In diese werden jeweils bei jeder Probennahme 2 ml der Bakteriensuspension eingefüllt und die Feuchtigkeit durch den Trockenschrank entzogen. Durch die Messung des Gewichts wird die Biotrockenmasse bestimmt. Nach abgeschlossener Kultivierung wird die Kultivierungsbrühe aus dem Reaktor gewonnen und in 50 ml Falcontubes abgefüllt. Diese werden mehrfach mit 4000 $\times g$ für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets werden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C lagern.

7.3.5 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss werden Proben aus der Kultivierung so entnommen, dass das Probenvolumen auf eine optische Dichte von 10 rel. AU normalisiert wird. Die Proben werden 5 min bei 4000 $\times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 300 μl Lysepuffer resuspendiert. Anschließend erfolgt der Zellaufschluss mit einer Ultraschallsonde. Die Zellen werden dazu 6-8 mal für 15 s unter Eiskühlung mit Ultraschall behandelt (Amplitude 70%, Zyklus 0,6 s). Zwischen den einzelnen Probenbeschallungen erfolgt eine Pause von 15 s. Im Anschluss werden die Proben für 25 min bei 4 °C zentrifugiert.

7.3.6 Messung der optischen Dichte

Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei 600 nm im Photometer. Ist die optische Dichte höher als 0,8 rel. AU werden die Proben verdünnt. Die Verdünnung erfolgt mit einer 0,9 % (w/v) Natriumchlorid-Lösung. Anschließend wird die Probe erneut vermessen.

7.4 Arbeiten mit *HUVECs*

7.4.1 Passagieren und Kultivierung von *HUVECs*

Die HUVEC-Zellen werden in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 95 % CO₂ kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in Endothelmedium plus SupplementenMix. Wird eine Konfluenz von $\geq 90\%$ erreicht, werden die Zellen passagiert. Dazu wird das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Ablösung der Zellen mit 5 mL Accutase (Inkubation 5 min, 37 °C und 95 % CO₂). Nach der Inkubation werden 5 mL Medium auf die Zellen gegeben und diese in ein Falcontube überführt. Anschließend wird die Zellzahl bestimmt (Abschnitt 7.4.4). Etwa ein Zehntel der Zellen wird in neues Medium überführt. Die Zellen werden alle 3-4 Tage passagiert.

7.4.2 Kryokonservierung

Die Zellen werden zunächst 5 min bei 180 x g abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in frischem Medium + 10 % DMSO resuspendiert. Je 1,6 ml werden in Kryoröhrchen überführt. Die Zelldichte pro Kryoröhrchen beträgt $4 \cdot 10^6$ Zellen. Die befüllten Kryoröhrchen werden in einer vorgekühlten Kühlbox bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h können die Zellen in Kryotanks überführt werden, wo sie in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert werden.

7.4.3 Revitalisierung

Die bei -196 °C gelagerten entsprechenden Kryoröhrchen werden langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend werden die Zellen in 10 mL kaltes Medium überführt und für 5 min bei 180 xg zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 6 mL warmem Medium resuspendiert.

7.4.4 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Mit Hilfe der Neubauer Improved Zählkammer kann die Zellzahl bestimmt werden. Die Neubauer-Zählkammer besteht aus neun Großquadraten. Gezählt werden jeweils die Zellen in den vier Großquadraten in den Ecken. Durch Trypanblau-

Färbung können die lebendigen Zellen von den toten Zellen unterschieden werden. Der Farbstoff dringt durch die kaputte Membran der toten Zellen ein und färbt diese blau. Im Gegensatz dazu erscheinen die lebenden Zellen unter dem Mikroskop hell, da der Farbstoff nicht durch die intakte Membran dringen kann.

Aus der Kultur werden 20 µl entnommen und diese mit 20 µl 0,4 %iger Trypanblau-Lösung versetzt. Diese wird dann auf die Neubauer Improved Zählkammer aufgetragen. Alle Zellen innerhalb der vier Großquadrate werden gezählt. Der Mittelwert wird gebildet, die Verdünnung mit Trypanblau (1:2) berücksichtigt und anschließend dem Faktor 10^4 multipliziert. Wird die zellhaltige Lösung zuvor verdünnt, muss die Verdünnung entsprechend eingerechnet werden.

7.4.5 Fixieren und Färben von Zellen

Für das Fixieren der Zellen, wird das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Das PBS wird anschließend abgenommen. Danach werden die Zellen mit einer 0,02 %igen Kristallviolett-Lösung gefärbt und fixiert. Es folgt eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Färbelösung wird abgenommen und die Zellen werden mehrfach mit PBS gewaschen, bis keine Färbung mehr zu erkennen ist. Anschließend können die Zellen mikroskopiert werden.

7.4.6 CellTiterBlue®-Assay

Das Kulturmedium wird abgenommen. Die adhärenierten Zellen werden zweimal mit 1 mL PBS gewaschen bevor 500 µl des CellTiterBlue®-Reagenzes auf die Zellen gegeben werden. Die Blakprobe erfolgt durch Zugabe von CellTiterBlue®-Reagenzes in ein leeres Kultivierungsgefäß. Anschließend wird für 1,5 Stunden bei 37 °C und 95 % CO₂ inkubiert. Es erfolgt dann die Überführung des Überstandes in 96-Wellplatten. Die Fluoreszenz wird dann bei 560 nm (Anregung) und 590 nm (Emission) bestimmt.

7.5 Proteinchemische Methoden

7.5.1 FXIII –*Crosslinking*

Als Basispuffer wird eine Tris-gepufferte Saline (50 mM Tris und 150 mM NaCl) mit einem pH-Wert von 7,4 eingesetzt. Anschließend werden 130 µg FGg, 4 µg FXIII, 0,1 U Thrombin und 5 mM CaCl₂ zugefügt. Das Gesamtvolumen beträgt 100 µl. Die Ansätze werden im Thermoblock bei 37 °C jeweils einen bestimmten Zeitraum inkubiert und das *Crosslinking* durch Zugabe von Laemmli-Puffer (Abschnitt 6.4.5) gestoppt.

7.5.2 Beschichtung von Multiwellplatten mit Proteinen

Die zu beschichteten Proteine werden in sterilem PBS aufgenommen. Die Konzentration beträgt jeweils 10 µg/mL. Für die Beschichtung der Platten werden die *Wells* über Nacht mit den in PBS gelösten Proteinen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag werden nicht gebundene Proteine durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt.

7.5.3 Solubilisierung von *Inclusion Bodies*

Die Zellen werden mit Ultraschall aufgeschlossen (Abschnitt 7.3.5). Der Überstand wird verworfen. Die unlösliche Fraktion wird zweimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Das gewaschene Pellet wird in 300 µl Solubilisierungspuffer resuspendiert und anschließend bei – 20 °C mindestens über Nacht eingefroren. Die Probe wird am nächsten Morgen bei Raumtemperatur aufgetaut. Im Anschluss werden die Proben für 25 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet wird verworfen.

7.6 Analytik

7.6.1 TCA-Fällung

Für die Fällung mit TCA werden je 900 µl der Probe mit 100 µl 100 %iger TCA versetzt. Die Proben werden für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 20 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wird in 40 µl Laemmli-Puffer aufgenommen.

7.6.2 SDS-PAGE

Das 12%-ige Trenngel wird zwischen zwei Glasplatten gegossen. Nach dem Auspolymerisieren wird das 6%-ige Sammelgel über das Trenngel gegossen. Dieses wurde mit einem Kamm solange stehen gelassen, bis es fest war. Die Proteinproben werden mit Laemmli-Puffer zu gleichen Teilen vermischt und für 10 min bei 95°C im Thermoblock geschüttelt. Anschließend wird die Elektrophoresekammer mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt und das auspolymerisierte Gel in die Kammer gesetzt. Vorsichtig wird der Kamm aus dem Gel entfernt. Bei Gelen mit zehn Taschen werden 17 µL der vorbereiteten Proben in die Geltaschen sowie in eine Geltasche 4 µL des Molekulargewichtsmarkers aufgetragen. Bei Gelen mit 15 Taschen werden je 8 µl der Proteinproben und 3 µl des Molekulargewichtsmarkers aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt für ca. 2h bei einer Spannung von 100 V, bis die Lauffront (Bromphenolblau) das Ende des Gels erreicht hat.

7.6.3 Färbung mit kolloidalem Coomassie

Das Gel wird nach der elektrophoretischen Auftrennung kurz in Wasser gewaschen. Im Anschluss wird es über Nacht (mindestens 5 Stunden) in der Färbelösung unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entfärbung erfolgt durch Abnahme der Färbelösung und durch mehrfaches Waschen des Gels in Wasser. Das Wasser wird solange ausgetauscht, bis der Hintergrund des Gels farblos ist.

7.6.4 SemiDry Western Blot und Immunodetektion

Mithilfe des Western Blots können Proteine von SDS-Page-Gelen auf Nitrocellulose-Membrane übertragen werden. Anschließend können die Proteine über spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Als erstes werden die PVDF-Membranen für 20 min in Methanol geschwenkt. Anschließend wird die Membran in Transferpuffer überführt und mindestens 5 min darin inkubiert. Auf die Anode der Blotting-Apparatur wird dann ein in Transferpuffer getränktes Whatman-Paper gelegt. Nun wird darüber die PVDF-Membran und SDS-PAGE-Gel plaziert. Anschließend folgt ein weiteres feuchtes Whatman-Paper. Die Blots werden mit Transferpuffer befeuchtet und die Apparatur wird verschlossen. Das Blotting erfolgt für 45 min bei 15 V.

Anschließend wird die Membran kurz in ddH₂O geschwenkt. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wird die Membran für eine Stunde oder bei 4 °C über Nacht in der Blocklösung inkubiert. Die Membran wird dann 3 mal 5 min in PBST gewaschen. Es folgt eine Inkubation von einer Stunde in 20 mL der primären Antikörperlösung.

Die Membran wird danach erneut 3 mal 5 min mit PBST gewaschen und dann für eine Stunde in der Lösung mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Erneut wird die Membran 3 mal 5 min mit PBST gewaschen. Die Entwicklung der Membran erfolgt mit 1 mL TMB-Reagenz. Durch Waschen der Membran mit Wasser wird die Färbung gestoppt.

7.6.5 Bradford-Assay

10 µl der Proben und der BSA-Standardreihe werden in 96-Wellplatten pipettiert. Im Anschluss werden je *Well* 300 µl des Bradford-Reagenz zugegeben. Die Platte wird für 30 s im Photometer geschüttelt und dann für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Absorption bei 595 nm gemessen.

7.6.6 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Densitometrie

Für die densitometrische Bestimmung der Proteinkonzentration werden die zu analysierenden Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel mittels kolloidaler Coomassie-Lösung angefärbt und nach Entfärbung eingescannt. Danach werden die Probenspuren mit der Software GelAnalyzer analysiert und die relative Farbdichte der gesamten Probenspur und der zu analysierenden Proteinbande bestimmt. Die bestimmten Intensitäten werden in Relation mit den im Bradford-Assay (Abschnitt 7.6.5) gemessenen Proteinkonzentrationen gesetzt.

7.7 Chromatographische Methoden

7.7.1 Aufreinigung mit NTA-*Spin*-Columns

Es werden die HisPur™ Ni-NTA *Spin Columns* der Firma Thermo Fisher eingesetzt. Die Aufreinigung des Proteins wird nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung des in Abschnitt 6.4.4 beschriebenen Puffers durchgeführt.

7.7.2 Aufreinigung mit NTA-*HiTrap*® QHP- Chromatographiesäule

Vor der Aufreinigung werden die Puffer angeschlossen und alle Schläuche durchgespült.

Folgendes Programm wird für die Aufreinigung verwendet.

- Isocratic Flow (Bindungspuffer): 10 min
- Isocratic Flow (Probe): 20 min
- Isocratic Flow (Bindungspuffer): 10 min
- Isocratic Flow (Elutionspuffer): 15 min
- Isocratic Flow (Bindungspuffer): 15 min
- Isocratic Flow (Wasser und Ethanol 20%): je 10 min

Die Flussrate beträgt bei allen Schritten 1 mL/min. Ein Teil des Durchflusses und die eluierten Proben werden mithilfe eines Probensammlers aufgefangen (je 2 mL Fraktionen). Die Proben werden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

7.7.3 On-column Refolding

Vor der Aufreinigung werden die Puffer angeschlossen und alle Schläuche durchgespült.

Folgendes Programm wird für die Aufreinigung verwendet.

- Isocratic Flow (Bindungspuffer mit Urea): 7 min
- Isocratic Flow (Probe): 20 min
- Isocratic Flow (Bindungspuffer mit Urea): 15 min
- Gradient Flow (0 – 100 % Bindungspuffer ohne Urea): 30 min
- Isocratic Flow (Bindungspuffer ohne Urea): 10 min
- Isocratic Flow (Elutionspuffer ohne Urea): 15 min
- Isocratic Flow (Bindungspuffer ohne Urea): 10 min
- Isocratic Flow (Wasser und Ethanol 20%): je 10 min

Die Flussrate beträgt bei allen Schritten 1 mL/min. Ein Teil des Durchflusses und die eluierten Proben werden mithilfe eines Probensammlers aufgefangen (je 2 mL Fraktionen). Die Proben werden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

On-column Refolding mit Stufenelution

Vor der Aufreinigung werden die Puffer angeschlossen und alle Schläuche durchgespült.

Folgendes Programm wird für die Aufreinigung verwendet.

- Isocratic Flow (Bindungspuffer mit Urea): 7 min
- Isocratic Flow (Probe): 20 min
- Isocratic Flow (Bindungspuffer mit Urea): 15 min
- Gradient Flow (0 – 100 % Bindungspuffer ohne Urea): 30 min
- Isocratic Flow (Bindungspuffer ohne Urea): 10 min
- Gradient Flow (0 – 100 % Elutionspuffer ohne Urea): 55 min
- Isocratic Flow (Bindungspuffer ohne Urea): 10 min
- Isocratic Flow (Wasser und Ethanol 20%): je 10 min

Die Flussrate beträgt bei allen Schritten 1 mL/min. Ein Teil des Durchflusses und die eluierten Proben werden mithilfe eines Probensammlers aufgefangen (je 2 mL Fraktionen). Die Proben werden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

8. Anhang C – Zusätzliche experimentelle Daten

8.1 Gensequenzen

Original FGG DNA-Sequenz (Gene Accession Number C9JC84)

TATGTTGCTACCAGAGACAACTGCTGCATCTTAGATGAAAGATTCCGGTAGTTATTGTC
 CAACTACCTGTGGCATTGCAGATTTCTGTCTACTTATCAAACCAAAGTAGACAAGG
 ATCTACAGTCTTTGGAAGACATCTTACATCAAGTTGAAAACAAAACATCAGAAGTCA
 AACAGCTGATAAAAGCAATCCAACACTACTTATAATCCTGATGAATCATCAAACCAA
 ATATGATAGACGCTGCTACTTTGAAGTCCAGGAAAATGTTAGAAGAAATTATGAAAT
 ATGAAGCATCGATTTTAAACACATGACTCAAGTATTCGATATTTGCAGGAAATATATA
 ATTCAAATAATCAAAGATTGTTAACCTGAAAGAGAAGGTAGCCCAGCTTGAAGCAC
 AGTGCCAGGAACCTTGCAAAGACACGGTGCAAATCCATGATATCACTGGGAAAAGATT
 GTCAAGACATTGCCAATAAGGGAGCTAAACAGAGCGGGCTTTACTTTATTAACCTC
 TGAAAGCTAACCAGCAATTCTTAGTCTACTGTGAAATCGATGGGTCTGGAAATGGAT
 GGACTGTGTTTCAGAAGAGACTTGATGGCAGTGTAGATTTCAAGAAAACCTGGATTC
 AATATAAGAAGGATTTGGACATCTGTCTCCTACTGGCACAACAGAATTTTGGCTGG
 GAAATGAGAAGATTCATTTGATAAGCACACAGTCTGCCATCCCATATGCATTAAGAG
 TGGAAGCTGGAAGACTGGAATGGCAGAACCAGTACTGCAGACTATGCCATGTTCAAGG
 TGGGACCTGAAGCTGACAAGTACCGCCTAACATATGCCTACTTCGCTGGTGGGGATG
 CTGGAGATGCCTTTGATGGCTTTGATTTTGGCGATGATCCTAGTGACAAGTTTTTCAC
 ATCCCATAATGGCATGCAGTTCAGTACCTGGGACAATGACAATGATAAGTTTGAAGG
 CAACTGTGCTGAACAGGATGGATCTGGTTGGTGGATGAACAAGTGTACGCTGGCCA
 TCTCAATGGAGTTTATTACCAAGGTGGCACTTACTCAAAGCATCTACTCCTAATGGT
 TATGATAATGGCATTATTTGGGCCACTTGGAAAACCCGGTGGTATTCCATGAAGAAA
 ACCACTATGAAGATAATCCATTCAACAGACTCACAATTGGAGAAGGACAGCAACAC
 CACCTGGGGGGAGCCAAACAGGCTGGAGACGTTTAA

Optimierte FGG DNA-Sequenz für die Produktion in K. phaffii

GAATTCTATGTCGCCACTAGAGATAACTGTTGTATTCTCGATGAGAGATTTGGATCAT
 ATTGTCCTACTACTTGTGGTATTGCCGATTTCTTGTCCACTTATCAGACTAAAGTAGA
 TAAGGATCTCCAATCCCTTGAGGATATTCTCCATCAGGTCGAGAACAAAACCTCCGA
 GGTCAAACAATTGATAAAAGCCATTCAGCTTACTTATAACCCAGATGAGTCCTCCAA
 ACCTAACATGATAGATGCCGCCACTCTTAAGTCTAGAAAAATGCTCGAGGAGATTAT
 GAAATATGAGGCCTCGATTCTCACCCATGATTCTCAATTCGTTATCTTCAAGAGATA
 TATAACTCCAACAACCAGAAGATTGTCAACTTGAAAGAAAAGGTAGCTCAACTTGAG
 GCCCAATGTCAAGAGCCATGTAAAGATACGGTTCAGATTCATGATATTACTGGAAAA
 GATTGTCAGGATATTGCTAACAAGGGAGCCAAACAATCCGGACTTTACTTCATTTAA
 CCATTGAAAGCCAACCAACAGTTTCTCGTCTACTGTGAGATTGATGGATCCGGAAAC

GGATGGACTGTTTTCCAAAAGAGACTTGATGGTTCAGTAGATTTTAAGAAAACTGG
 ATTCAGTATAAAGAGGGATTCGGACATTTGTCCCAACTGGTACCACCGAGTTCTGGT
 TGGGAAACGAAAAGATTCATCTTATATCCACCCAATCCGCTATTCCTTATGCCCTCAG
 AGTTGAGTTGGAGGATTGGAACGGTAGAACTTCAACTGCCGATTATGCTATGTTTTAA
 GGTGGACCAGAGGCCGATAAGTACAGACTCACCTATGCTTACTTTGCCGGAGGAGA
 TGCCGGAGATGCTTTCGATGGTTTCGATTTCCGGAGATGATCCATCAGATAAGTTCTTT
 ACCTCTCATAACGGTATGCAATTTTCAACTTGGGATAACGATAACGATAAGTTTCGAG
 GGTAAGTGTGCCGAGCAAGATGGATCCGGATGGTGGATGAACAAGTGTGCATGCCGGT
 CATCTTAACGGAGTCTATTACCAGGGAGGTACTTACTCCAAAGCCTCCACTCCAAACG
 GATATGATAACGGTATTATTTGGGCTACTTGGAAAAGTACTAGATGGTATTCTATGAAGA
 AACTACTATGAAGATAATTCCTTTTAAACAGACTTACCATTGGAGAGGGACAACAGC
 ATCATTGTTGGAGGAGCTAAACAAGCCGGAGATGTCTAATAGTAAGCGGCCGCT

Optimierte FG DNA-Sequenz für die Produktion in E. coli

CTCGAGGATATCATGTATGTTGCAACCCGTGATAATTGCTGCATTCTGGATGAACGTT
 TTGGTAGCTATTGTCCGACCACCTGTGGTATTGCAGATTTTCTGAGCACCTATCAGAC
 CAAAGTTGATAAAGATCTGCAGAGCCTGGAAGATATTCTGCATCAGGTTGAAAACAA
 AACCAGCGAAGTTAAACAGCTGATTAAAGCAATTCAGCTGACCTATAATCCGGATGA
 AAGCAGCAAACCGAATATGATTGATGCAGCAACCCTGAAAAGCCGTAATGCTGG
 AAGAGATCATGAAATATGAAGCCAGCATTCTGACCCATGATAGCAGCATTTCGTTATC
 TGCAAGAAATCTACAATAGCAATAATCAGAAAATTGTGAATCTGAAAGAAAAAGTG
 GCACAGCTGGAAGCACAGTGTCAAGAACCGTGTAAGATAACCGTTCAGATTCATGAT
 ATCACCGGTAAAGATTGTCAGGATATTGCAAACAAAGGTGCAAACAGAGCGGTCTG
 TATTTTATCAAACCGCTGAAAGCAAATCAGCAGTTTCTGGTGTATTGCGAAATTGATG
 GTAGCGGTAATGGTTGGACCGTTTTTCAGAAACGTCTGGATGGTAGCGTGGACTTCA
 AAAAAACTGGATTCAGTATAAAGAAGGCTTTGGTCATCTGAGCCCGACCGGCACCA
 CCGAATTTTGGCTGGGTAATGAAAAAATTCATCTGATTAGCACCCAGAGCGCAATTC
 CGTATGCACTGCGTGTGAACTGGAAGATTGGAATGGTCGTACCAGCACCGCAGATT
 ATGCAATGTTTAAAGTTGGTCCGGAAGCCGATAAATATCGTCTGACCTATGCATATTT
 TGCCGGTGGTGTGATGCCGGTGTGATGATTTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 GATAAATCTTTACCAGCCATAATGGTATGCAGTTTATGACCTGGGATAACGATAAC
 GATAAATTTGAAGGCAATTGTGCCGAACAGGATGGTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 TGTCATGCAGGTCATCTGAACGGCGTTTATTATCAGGGTGGCACCTATAGCAAAGCA
 AGCACCCCGAATGGTTATGATAATGGTATTATTTGGGCAACCTGGAAAACCCGTTGG
 TACAGCATGAAAAAACCACCATGAAAATCATCCCGTTTAAACCGTCTGACCATTGGT
 GAAGGTCAGCAGCATCATCTGGGTGGTGCAAAAACAAGCCGGTGTGTGTAATAAAA
 GGATCCGTCGAC

8.2 Screening verschiedener *K. phaffii*-Klone unter unterschiedlichen Bedingungen

Veränderung von Kultivierungstemperatur, Induktorkonzentration und des pH Wertes des Mediums

Da die Produktion von rekombinanten Proteinen nicht nur vom Klon, sondern auch von den Kultivierungsbedingungen abhängen kann, wurden die Kultivierungsbedingungen verändert. Um die Produktionsrate zu steigern wurde die Kultivierungstemperatur nach der Induktion auf 22 °C abgesenkt. Des Weiteren wurden verschiedene Methanolkonzentrationen (0,5-2 % (v/v)) getestet um auszuschließen, dass der AOX-Promoter nicht ausreichend induziert wurde. Außerdem wurde das Kultivierungsmedium auf die pH-Werte 3 und 6 eingestellt um zu gewährleisten, dass sekretiertes Protein nicht aufgrund von Stabilitätsproblemen zerfällt. Bei einem pH-Wert von 3 wird zudem die Aktivität von Proteasen reduziert. Abbildung 40 zeigt exemplarisch die Analyse von Überstands- und Lysatproben eines Mut^S-Klones bei Induktion mit verschiedenen Methanolkonzentrationen bei einer Kultivierungstemperatur von 22 °C. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Veränderung der Kultivierungsparameter keine FGG-Produktion hervorrufen konnte.

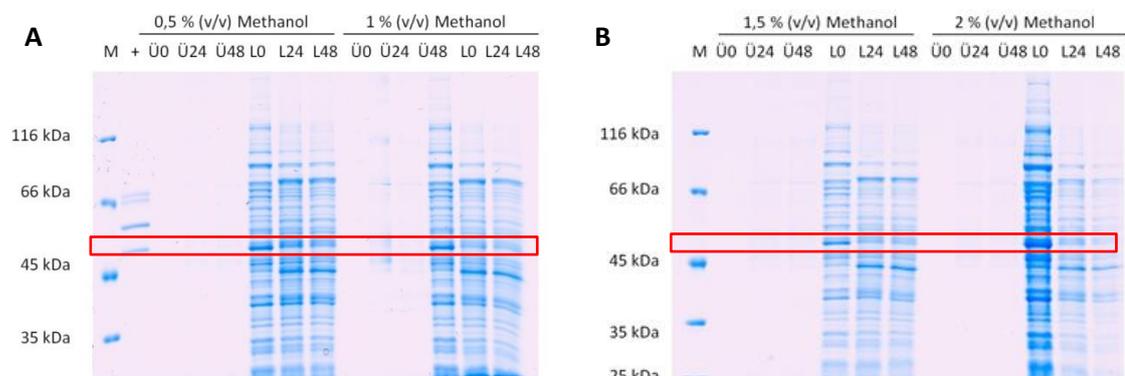


Abbildung 40: Screening eines Mut^S-Klones hinsichtlich FGG-Proteinproduktion 0, 24, und 48 Stunden nach der Induktion bei verschiedenen Methanolkonzentrationen. Aufgetragen sind sowohl die gefällten zellfreien Kulturüberstände (Ü) als auch die Zelllysate (L). Als Positivkontrolle ist humanes Fibrinogen (+) aufgetragen.

Nachfolgend sind exemplarische SDS-PAGE-Analysen bei Verwendung von definiertem und komplexem Kultivierungsmediums dargestellt.

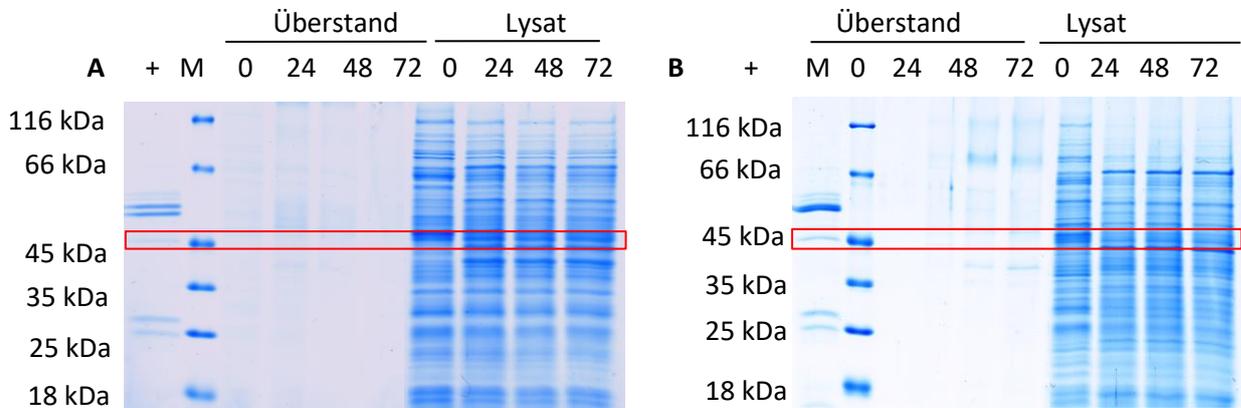


Abbildung 41: Screening eines Mut^S-Klones hinsichtlich FG_G-Proteinproduktion 0, 24, und 48 Stunden nach der Induktion in komplexem Medium (A) und definiertem Medium (B). Aufgetragen sind die gefällten zellfreien Kulturüberstände und die Zellysate. Als Positivkontrolle ist humanes Fibrinogen (+) aufgetragen.

Screening von Multicopy-Klonen

Klone, welche eine Mehrfachintegration der Expressionskassette aufweisen (*Multicopy*-Klone), zeigen häufig eine erhöhte Proteinproduktion. Da das pPIC9K-FGG-Plasmid ein Kanamycin-Resistenzgen besitzt, wird in *K. phaffii* eine Resistenz gegen das Antibiotikum G-418 vermittelt. Bei erhöhter Anzahl an Expressionskassetten steigt dementsprechend die Resistenz gegen G-418. Das Screening erfolgte auf Agarplatten mit steigenden G-418 Konzentrationen (0-3 mg/mL). Die Klone mit der ausgeprägtesten Resistenz wurden in Flüssigkulturen kultiviert.

Parallel zu dem Screening von natürlich entstandenen *Multicopy*-Klonen, wurde versucht die Anzahl von Expressionskassetten weiter zu steigern. Dafür wurde die Methode der Posttransformationalen Vektor Amplifikation (PTVA) nach Sunga et al. angewandt [72]. Bei der PTVA werden die Klone ebenfalls auf ihre G-418-Resistenz untersucht. Anschließend werden die Klone dann auf Platten mit der nächsthöheren Antibiotikakonzentration bei der kein Wachstum mehr feststellbar

war ausplattiert. Bei 40 % der Klone konnten Sunga et al. eine 3-5-fache, bei 5-6 % sogar eine mehr als 10-fache Erhöhung der Kopienzahl erreichen. Dieses führte zu einer proportionalen Erhöhung der Proteinproduktion [72]. Die Klone mit der höchsten Resistenz wurden ebenfalls in Flüssigkulturen kultiviert und die Proteinproduktion mit 0,5 % (v/v) Methanol induziert.

Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Auch durch Isolation von G-418 resistenten konnte keine FGG-Produktion erzielt werden.

Western-Blot-Analysen

Für alle Kultivierungen wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Exemplarisch ist hier eine angefärbte Western-Blot-Membran dargestellt. Es konnte lediglich die Fibrinogen- γ -Kette der Positivkontrolle (humanes Fibrinogen) detektiert werden.

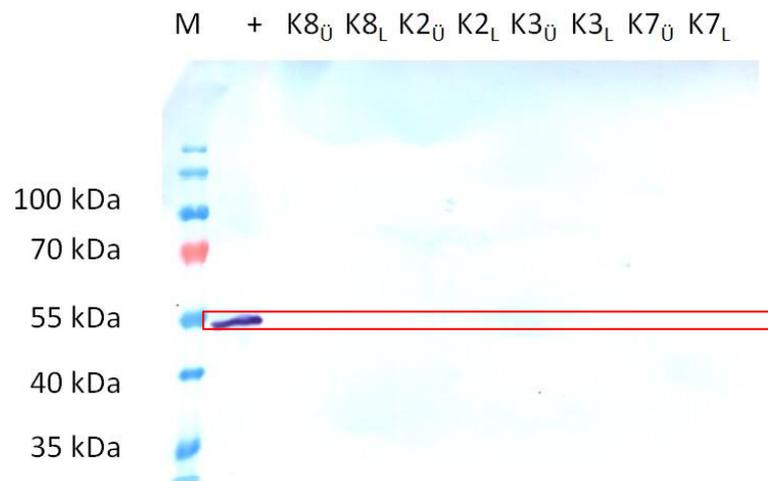


Abbildung 42: Western Blot-Analyse mehrerer Klone (K) hinsichtlich FGG-Proteinproduktion 48 Stunden nach der Induktion. Aufgetragen sind die gefällten zellfreien Kulturüberstände (Ü) und die Zellysate (L). Als Positivkontrolle ist humanes Fibrinogen (+) aufgetragen.

8.3 Screening zur löslichen Produktion von FGG in *E. coli*

Auch bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C und verschiedenen Induktorkonzentrationen konnte kein lösliches FGG produziert werden (Abbildung 43).

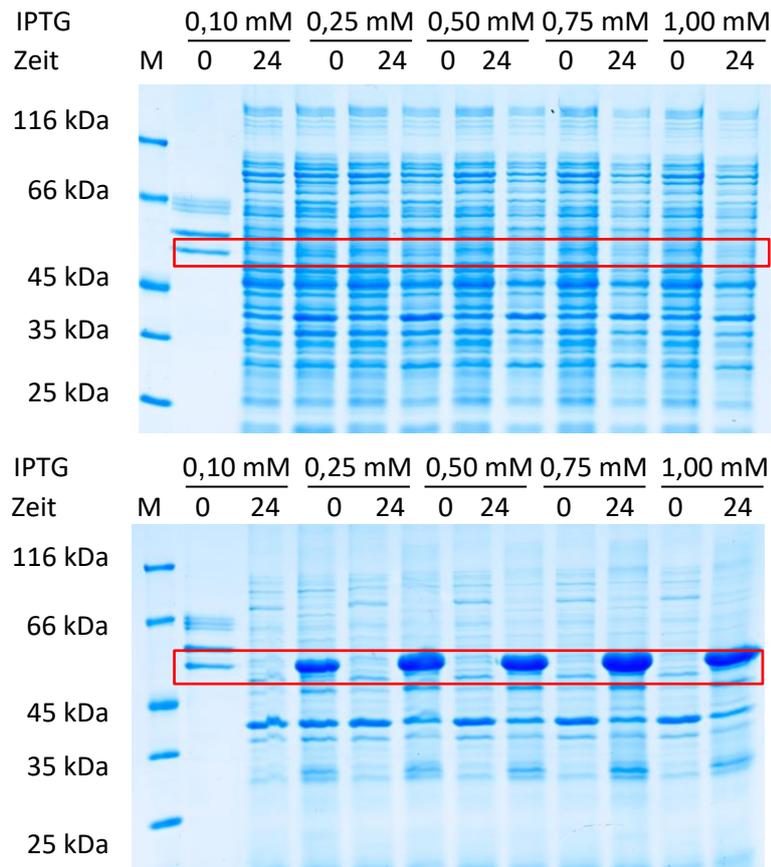


Abbildung 43: Screening eines *E. Coli*- Klon hinsichtlich der FGG-Proteinproduktion 0 und 24 Stunden nach der Induktion bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C. Aufgetragen sind die unlöslichen (unten) und löslichen (oben) Fraktionen.

8.4 Western-Blot-Analysen

Für die Kombinationen 3 und 5 konnte in der löslichen Fraktion FGG mittels immunologischer Färbung nachgewiesen werden.

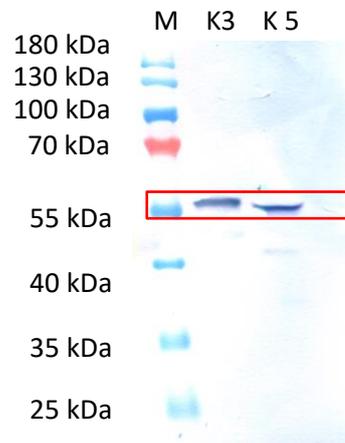


Abbildung 44: Western Blot-Analyse der Chaperonkombinationen 3 und 5 hinsichtlich der Produktion von löslichem FGG. Aufgetragen sind die Fraktionen 6,5 Stunden nach Induktion des FGGs.

8.5. Design of Experiments

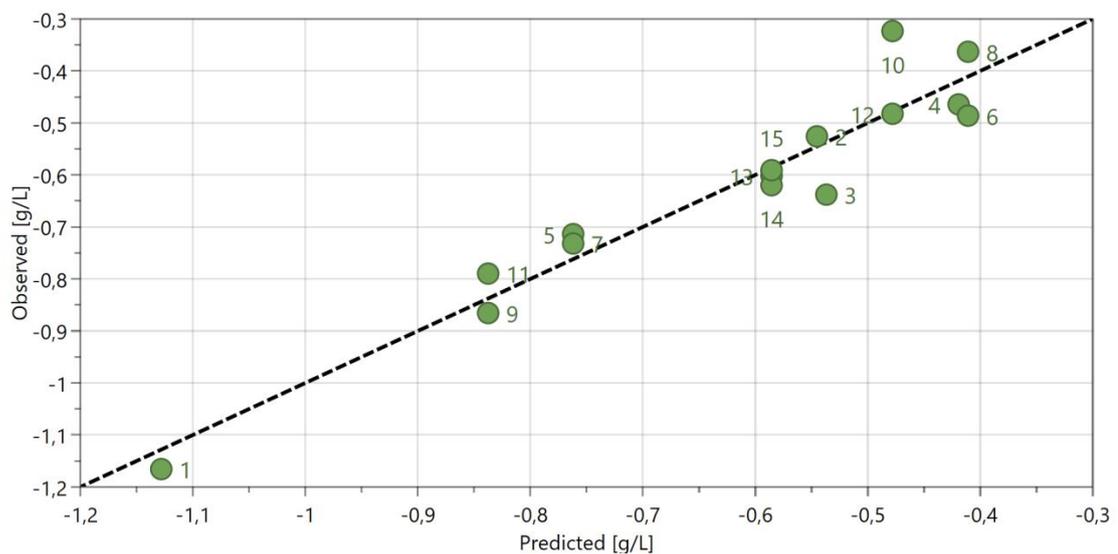


Abbildung 45: Observed vs. Predicted Plot

9 Literaturverzeichnis

- [1] World Health Organization (2017), "Factsheet on cardiovascular diseases (CVDs) 2017". Online verfügbar unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Aktualisiert am 17.5.2017, zuletzt geprüft am 29.4.2019.
- [2] T. Aper (2015): "Maßgeschneiderte autologe bioartifizielle Gefäßprothesen: Neuartiges Verfahren zur Generierung von Fibrinmatrices". In: *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie* 29 (5), S. 342–348.
- [3] J. W. Weisel and L. Medved (2005): "Fibrinogen and Fibrin". In: *Advances in Protein Chemistry* 70 (4), S. 247–299.
- [4] E. M. Weijers et al. (2010): "Molecular weight fibrinogen variants alter gene expression and functional characteristics of human endothelial cells". In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8 (12), S. 2800–2809.
- [5] H. M. Liu, D. L. Wang, and C. Y. Liu (1990): "Interactions between Fibrin, Collagen and Endothelial Cells in Angiogenesis". In: *Fibrinogen, Thrombosis, Coagulation, and Fibrinolysis. Advances in Experimental Medicine and Biology* 281, S. 319–331.
- [6] D. Davalos und K. Akassoglou (2012): "Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease". In: *Seminar in Immunopathology*. 34 (1), S. 43–62.
- [7] R. F. Doolittle(1984): "Fibrinogen and Fibrin". In: *Annual Reviews of Biochemistry* 53 (1), S. 195–229.
- [8] R. Ohta, N. Saito, T. Ishizaki und O. Takai (2006): "Visualization of human plasma fibrinogen adsorbed on highly oriented pyrolytic graphite by scanning probe microscopy". In: *Surface Science* 600 (8), S. 1674–1678.

- [9] J. Weisel, C. Stauffacher, E. Bullitt und C. Cohen (1985): "A model for fibrinogen: domains and sequence". In: *Science* 230 (4732), S. 1388–1391.
- [10] A. H. Henschen-Edman (2001): "Fibrinogen Non-Inherited Heterogeneity and Its Relationship to Function in Health and Disease". In: *Annals of the New York of Sciences* 936 (1), S. 580–593.
- [11] B. Holm, D. W. T. Nilsen, P. Kierulf und H. C. Godal (1985): "Purification and characterization of 3 fibrinogens with different molecular weights obtained from normal human plasma". In: *Thrombosis Research*. 37 (1), S. 165–176.
- [12] B. Holm und H. C. Godal: "Quantitation of the three normally occurring plasma fibrinogens in health and during so-called 'acute phase' by SDS electrophoresis of fibrin obtained from EDTA-plasma". In: *Thrombosis Research*. 35 (3), S. 279–290.
- [13] E. L. Kaijzel, P. Koolwijk, M. G. M. Van Erck, V. W. M. Van Hinsbergh und M. P. M. De Maat (2006): "Molecular weight fibrinogen variants determine angiogenesis rate in a fibrin matrix in vitro and in vivo". In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 4 (9), S. 1975–1981.
- [14] D. L. Amrani (1990): "Regulation of fibrinogen biosynthesis: glucocorticoid and interleukin-6 control". In: *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 1(4-5), S. 443–446.
- [15] C. M. Redman und H. Xia (2001): "Fibrinogen Biosynthesis". In: *Annals of the New York of Sciences* 936 (1), S. 480–495.
- [16] J. A. Kant, A. J. Fornace, D. Saxe, M. I. Simon, O. W. McBride und G. R. Crabtree (1985): "Evolution and organization of the fibrinogen locus on chromosome 4: gene duplication accompanied by transposition and inversion". In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 82 (8), S. 2344–2348.

- [17] J. E. Nesbitt und G. M. Fuller (1991): "Transcription and translation are required for fibrinogen mRNA degradation in hepatocytes". In: *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*. 1089 (1), S. 88–94.
- [18] S. Roy, A. Sun und C. Redman (1996): "In vitro assembly of the component chains of fibrinogen requires endoplasmic reticulum factors". In: *The Journal of Biological Chemistry* 271 (40), S. 24544–24550.
- [19] U. M. Spornitz (2007): *Anatomie und Physiologie*, 5. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- [20] J. M. Berg, J. L. Tymoczko und L. Stryer (2013): *Stryer Biochemie*, 16. Auflage, übersetzt von C. Lange *et al.*, Heidelberg, Springer Spektrum.
- [21] J. W. Weisel und R. I. Litvinov (2013): "Review Article Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications". In: *Blood* 121 (10), S. 1712–1719.
- [22] G. Thews, E. Mutschler, and P. Vaupel (1999): *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, 5. Auflage, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- [23] H. Zhao, L. Ma, J. Zhou, Z. Mao, C. Gao und J. Shen (2008): "Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma". In: *Biomedical Materials*. 3 (1), S. 1–9.
- [24] Z. S. Latallo, A. P. Fletcher, N. Alkjaersig, und S. Sherry (1962): "Influence of pH, ionic strength, neutral ions, and thrombin on fibrin polymerization". In: *American Journal of Physiology* 202 (4), S. 675–680.
- [25] J. D. Ferry und P. R. Morrison (1947): "Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. VIII. The Conversion of Human Fibrinogen to Fibrin under Various Conditions". In: *Journal of the American Chemical Society* 69 (2), S. 388–400.

-
- [26] W. D. Spotnitz (2014): "Fibrin Sealant: The Only Approved Hemostat, Sealant, and Adhesive - a Laboratory and Clinical Perspective". In: *ISRN Surgery* 2014, 203943.
- [27] Baxter Healthcare Corporation (2014): "TISSEEL [Fibrin Sealant] - Prescribing Information". Online verfügbar unter: http://www.tisseel.com/us/pdf/TISSEEL_PI.pdf, zuletzt geprüft am 10.07.2019
- [28] P. A. Janmey, J. P. Winer und J. W. Weisel (2009): "Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications". In: *Journal of the Royal Society. Interface* 6 (30), S. 1–10.
- [29] I. Grant, K. Warwick, J. Marshall, C. Green und R. Martin (2002): "The co-application of sprayed cultured autologous keratinocytes and autologous fibrin sealant in a porcine wound model". In: *British Journal of Plastic Surgery* 55 (3), S. 219–227.
- [30] V. Falanga *et al.* (2007): "Autologous Bone Marrow–Derived Cultured Mesenchymal Stem Cells Delivered in a Fibrin Spray Accelerate Healing in Murine and Human Cutaneous Wounds". In: *Tissue Engineering* 13 (6), S. 1299–1312.
- [31] D. Whelan, N. M. Caplice und A. J. P. Clover (2014): "Fibrin as a delivery system in wound healing tissue". In: *Journal of Controlled Release* 196, S. 1–8.
- [32] C. Schneider-Barthold, S. Baganz, M. Wilhelmi, T. Scheper, and I. Pepelanova (2016): "Hydrogels based on collagen and fibrin – frontiers and applications". In: *BioNanoMaterials* 7 (1–2), S. 3–12.
- [33] T. Aper *et al.* (2016): "Novel method for the generation of tissue-engineered vascular grafts based on a highly compacted fibrin matrix". In: *Acta Biomaterialia* 29, S. 21–32.

- [34] B. Jiang, T. M. Waller, J. C. Larson, A. A. Appel und E. M. Brey (2013): “Fibrin-Loaded Porous Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels as Scaffold Materials for Vascularized Tissue Formation”. In: *Tissue Engineering. Part A* 19(1–2), S. 224–234.
- [35] S. H. Park, J. H. Cui, S. R. Park und B. H. Min (2009): “Potential of fortified fibrin/hyaluronic acid composite gel as a cell delivery vehicle for chondrocytes”. In: *Artificial. Organs* 33 (6), S. 439–447.
- [36] B. Tschoeke *et al.* (2008): “Development of a composite degradable/nondegradable tissue-engineered vascular graft”. In: *Artificial Organs* 32 (10), S. 800–809.
- [37] B. Tschoeke *et al.* (2009): “Tissue-Engineered Small-Caliber Vascular Graft Based on a Novel Biodegradable Composite Fibrin-Polylactide Scaffold”. In: *Tissue Engineering Part A* 15 (8), S. 1909–1918.
- [38] D. Eyrich *et al.* (2007): “In Vitro and In Vivo Cartilage Engineering Using a Combination of Chondrocyte-Seeded Long-Term Stable Fibrin Gels and Polycaprolactone-Based Polyurethane Scaffolds”. In: *Tissue Engineering* 13 (9), S. 2207–2218.
- [39] A. Lesman, J. Koffler, R. Atlas, Y. J. Blinder, Z. Kam und S. Levenberg (2011): “Engineering vessel-like networks within multicellular fibrin-based constructs”. In: *Biomaterials* 32 (31), S. 7856–7869.
- [40] B. Blombäck (2001): “Fibrinogen: Evolution of the Structure-Function Concept”. In: *Annals of the New York of Sciences* 936 (1), S. 1–10.
- [41] E. J. Cohn und L. E. Strong (1946): “Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids”. In: *Journal of the American Chemical Society* 68 (2), S. 459–475.

- [42] A. O. Oseni, P. E. Butler und A. M. Seifalian (2013): “Rapid production of autologous fibrin hydrogels for cellular encapsulation in organ regeneration,” *Methods in Molecular Biology* 1001, S. 145–152.
- [43] R. C. Gosselin, E. Larkin, J. T. Owings und P. Coehlo (1997): “CryoSeal™ System, a New Device for Generating Cryoprecipitate from Plasma”. In: *Clinical Chemistry* 43 (9), S. 1782–1783.
- [44] T. Aper (2012): “Fibrinogen Preparations for Tissue Engineering Approaches”. In: *Journal of Bioengineering and Biomedical Science* 2 (3), S. 2–6.
- [45] J. L. Velada und D. A. Hollingsbee (2001): “Physical Characteristics of Vivostat® Patient-Derived Sealant”. In: *European Surgical Research* 33 (5–6), S. 399–404.
- [46] C. Buchta, H. C. Hedrich, M. Macher, P. Höcker und H. Redl (2005): “Biochemical characterization of autologous fibrin sealants produced by CryoSeal® and Vivostat® in comparison to the homologous fibrin sealant product Tissucol/Tisseel®”. In: *Biomaterials* 26 (31), S. 6233–6241.
- [47] N. Tojo, I. Miyagi, M. Miura und H. Ohi (2008): “Recombinant human fibrinogen expressed in the yeast *Pichia pastoris* was assembled and biologically active”. In: *Protein Expression and Purification* 59 (2), S. 289–296.
- [48] J. Calcaterra *et al.* (2013): “Recombinant Human Fibrinogen That Produces Thick Fibrin Fibers with Increased Wound Adhesion and Clot Density”. In: *Biomacromolecules* 14 (1), S. 169–178.
- [49] S. P. Butler, T. K. O’Sickey, S. T. Lord, H. Lubon, F. C. Gwazdauskas und W. H. Velander (2004): “Secretion of recombinant human fibrinogen by the murine mammary gland”. In: *Transgenic Research* 13, S. 437–450.

- [50] M. Hirashima *et al.* (2016): “High-level expression and preparation of recombinant human fibrinogen as biopharmaceuticals”. In: *The Journal of Biochemistry* 159 (2), S. 261–270.
- [51] V. Radulovic, F. Baghaei, I. F. Blixter, S. Samuelsson und A. Jeppsson (2012): “Comparable effect of recombinant and plasma-derived human fibrinogen concentrate on ex vivo clot formation after cardiac surgery”. In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 10 (8), S. 1696–1698.
- [52] S. T. Lord (1985): “Expression of a cloned human fibrinogen cDNA in *Escherichia coli*: synthesis of an A alpha polypeptide” In: *DNA* 4 (1), S. 33–38.
- [53] M. G. Bolyard und S. T. Lord (1989): “Expression in *Escherichia coli* of the human fibrinogen B beta chain and its cleavage by thrombin”. In: *Blood* 73 (5), S. 1202–1206.
- [54] M. G. Bolyard und S. T. Lord (1988): “High-level expression of a functional human fibrinogen gamma chain in *Escherichia coli*”. In: *Gene* 66 (2), S. 183–192.
- [55] D. H. Farrell (2004): “Pathophysiologic roles of the fibrinogen gamma chain”. In: *Current Opinion in Hematology*.11 (3), S. 151–155.
- [56] F. Lottspeich und A. Henschen (1977): “Amino acid sequence of human fibrin. Preliminary note on the completion of the gamma-chain sequence”. In: *Hoppe-Seyler's. Zeitschrift für Physiologische Chemie* 958 (7), S. 935–938.
- [57] S. Iwanaga, B. Blombäck, N. J. Gröndahl, B. Hessel und P. Wallén (1968): “Amino acid sequence of the N-terminal part of γ -chain in human fibrinogen”. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure* 160 (2), S. 280–283.

-
- [58] M. W. Mosesson, J. S. Finlayson und R. A. Umfleet (1972): "Human Fibrinogen Heterogeneities: III. Identification of γ chain variants". In: *The Journal of Biological Chemistry* 247 (16), S. 5223–5227.
- [59] A. V Cooper, K. F. Standeven und R. A. S. Arie (2003): "Fibrinogen gamma-chain splice variant γ' alters fibrin formation and structure". In: *Blood* 102 (2), S. 535–540.
- [60] L. A. Falls und D. H. Farrell (1997): "Resistance of $\gamma A/\gamma'$ Fibrin Clots to Fibrinolysis". In: *The Journal of Biological Chemistry* 272 (22), S. 14251–14256.
- [61] R. S. Lovely *et al.* (2002): "Association of $\gamma A/\gamma'$ fibrinogen levels and coronary artery disease". In: *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 88 (1), S. 26–31.
- [62] R. Chen und R. F. Doolittle (1969): "Identification of the polypeptide chains involved in the cross-linking of fibrin". In: *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 63 (2), S. 420–427.
- [63] R. Chen und R. F. Doolittle (1971): "Cross-Linking Sites in Human and Bovine Fibrin". In: *Biochemistry* 10 (24), S. 4486–4491.
- [64] K. Yokoyama, X.-P. Zhang, L. Medved und Y. Takada (1999): "Specific Binding of Integrin $\alpha\beta 3$ to the Fibrinogen γ and αE Chain C-Terminal Domains". In: *Biochemistry* 38 (18), S. 5872–5877.
- [65] T. Vogl, F. S. Hartner und A. Glieder (2013): "New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in *Pichia pastoris*". In: *Current Opinion in Biotechnology* 24 (6), S. 1094–1101.
- [66] M. W. Rixon, D. W. Chung und E. W. Davie (1985): "Nucleotide sequence of the gene for the γ chain of human fibrinogen". In: *Biochemistry* 24 (8), S. 2077–2086.

- [67] E. Angov, C. J. Hillier, R. L. Kincaid und J. A. Lyon (2008): "Heterologous Protein Expression Is Enhanced by Harmonizing the Codon Usage Frequencies of the Target Gene with those of the Expression Host". In: *PLoS One* 3 (5), e2189.
- [68] P. M. Sharp and W. Li (1987): "The codon adaptation index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications". In: *Nucleic Acids Research* 15 (3), S. 1281–1295.
- [69] M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler und H. Schwab (2014): "Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production". In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (12), S. 5301–5317.
- [70] Invitrogen Corporation (2014): "Pichia Expression Kit "Anwenderprotokoll.
- [71] J. M. Cregg, K. R. Madden, K. J. Barringer, G. P. Thill und C. A. Stillman (1989): "Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*". In: *Molecular and Cellular Biology* 9 (3), S. 1316–1323.
- [72] J. Lin-Cereghino *et al.* (2005): "Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*". In: *Biotechniques* 38 (1), S. 44–48.
- [73] J. J. M. Cregg, I. Tolstorukov, A. Kusari, J. Sunga, K. Madden und T. Chappell (2009): "Chapter 13 Expression in the Yeast *Pichia pastoris*". In: *Methods in Enzymology* 463, S. 169–189.
- [74] T. Maier, M. Güell und L. Serrano (2009): "Correlation of mRNA and protein in complex biological samples". In: *FEBS Letters* 583 (24), S. 3966–3973.

- [75] L. Medved, S. Litvinovich, T. Ugarova, Y. Matsuka und K. Ingham (1997): “Domain structure and functional activity of the recombinant human fibrinogen gamma-module (gamma148-411)”. In: *Biochemistry* 36 (15), S. 4685–4693.
- [76] V. C. Yee *et al.* (1997): “Crystal structure of a 30 kDa C-terminal fragment from the gamma chain of human fibrinogen”. In: *Structure* 5 (1), S. 125–138.
- [77] G. L. Rosano und E. A. Ceccarelli (2014): “Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges”. In: *Frontiers in Microbiology* 5 (172).
- [78] S. Gottesman (1996): “Proteases and their targets in Escherichia Coli”. In: *Annual Review of Genetics* 30 (1), S. 465–506.
- [79] F. Baneyx (1999): “Recombinant protein expression in Escherichia coli”. In: *Current Opinion in Biotechnology* 10 (5), S. 411–421.
- [80] A. Fernández-Castané, C. E. Vine, G. Caminal und J. López-Santín (2012): “Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by Escherichia coli in fed-batch high cell density cultures”. In: *Journal of Biotechnology* 157 (3), S. 391–398.
- [81] A. Khlebnikov und J. D. Keasling (2002): “Effect of lacY expression on homogeneity of induction from the Ptac and Ptrc promoters by natural and synthetic inducers”. In: *Biotechnology Progress*.18 (3), S. 672–674.
- [82] Merck KGaA (2011): “pET System Manual 11 th Edition”. Anwenderprotokoll
- [83] H. P. Sørensen und K. K. Mortensen (2005): “Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli”. In: *Microbial Cell Factories* 4 (1).

- [84] A. de Marco, E. Deuerling, A. Mogk, T. Tomoyasu und B. Bukau (2007): “Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*”. In: *BMC Biotechnology* 7 (32), S. 1–9.
- [85] A. Mogk, M. P. Mayer und E. Deuerling (2001): “Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential: Mechanismen der Proteinfaltung”. In: *Biologie in unserer Zeit* 31 (3), S. 182–192.
- [86] B. Bukau, E. Deuerling, C. Pfund und E. A. Craig (2000): “Getting newly synthesized proteins into shape”. In: *Cell* 10 (2), S. 119–122.
- [87] B. Alberts *et al.* (2017): *Molekularbiologie der Zelle*, 6. Auflage. Übersetzt von B. Häcker, C. Horstmann und A. Prowald, Wiley-VCH, Weinheim.
- [88] D. Voet und J.G. Voet (1992): *Biochemie*. Übersetzt und herausgegeben von: A. Maelicke und W. Müller-Esterl, Wiley-VCH, Weinheim.
- [89] R. Rudolph und H. Lilie (1996): “In vitro folding”. In: *FASEB Journal* 10 (1), S. 49–56.
- [90] A. Singh, V. Upadhyay, A. K. Upadhyay, S. M. Singh und A. K. Panda (2015): “Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process”. In: *Microbial Cell Factories* 14 (41), S. 1–10.
- [91] X. Qi, Y. Sun und S. Xiong (2015): “A single freeze-thawing cycle for highly efficient solubilization of inclusion body proteins and its refolding into bioactive form”. In: *Microbial Cell Factories* 14 (24), S. 1–12.
- [92] G. B. Strambini und E. Gabellieri (1996): “Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding”. In: *Biophysical Journal* 70 (2), S. 971–976.

- [93] K. A. Pikal-Cleland, N. Rodríguez-Hornedo, G. L. Amidon und J. F. Carpenter (2000): "Protein Denaturation during Freezing and Thawing in Phosphate Buffer Systems: Monomeric and Tetrameric β -Galactosidase". In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384 (2), S. 398–406.
- [94] F. Lottspeich und J. W. Engels (2009): *Bioanalytik*, 2. Auflage, Heidelberg, Springer Spektrum.
- [95] M. Li, Z. G. Su und J. C. Janson (2004): "In vitro protein refolding by chromatographic procedures". In: *Protein Expression and Purification* 33 (1), S. 1–10.
- [96] GE Healthcare (1999): "Rapid and efficient purification and refolding of a (His) 6 -tagged recombinant protein produced in E . coli as inclusion bodies". Application Note S. 18–21.
- [97] Jena Bioscience (2011): "IMAC-immobilized metal affinity chromatography". Online verfügbar unter: https://www.jenabioscience.com/images/1b94dca880/Newsletter_Affi_May11.html, zuletzt geprüft am 27.09.2018.
- [98] Minitab LLC (2019): "What are response surface designs, central composite designs, and Box-Behnken designs?". Online verfügbar unter: <https://support.minitab.com/en-us/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/>, zuletzt geprüft am 31.05.2019.
- [99] Y. Shachaf, M. Gonen-Wadmany und D. Seliktar: "The biocompatibility of Pluronic®F127 fibrinogen-based hydrogels". In: *Biomaterials* 31 (10), S. 2836–2847.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung des Fibrinogens	4
Abbildung 2	Schematische Darstellung der Fibrinogen-Biosynthese	6
Abbildung 3	Schematische Darstellung der sekundären Hämostase	7
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Polymerisation von Fibrinogen zu Fibrin	8
Abbildung 5	Rasterelektronenmikroskopaufnahme von Fibrin-Gerinnsehn mit unterschiedlichen γ -Varianten	15
Abbildung 6	Schematischer Überblick über Bindestellen der FGg	16
Abbildung 7	Schematische Darstellung des pPIC9K-FGG-Konstruktes	19
Abbildung 8	Ergebnisse der Kolonie-PCR zur Überprüfung des Mut-Phänotyps verschiedener Klone	21
Abbildung 9	Screening eines Mut ^S - und eines Mut ⁺ -Klons hinsichtlich der FGg-Proteinproduktion 0, 24, 48 und 72 Stunden nach Induktion	23
Abbildung 10	Ergebnisse der Überprüfung der Transkription 0, 3, 24 und 29 Stunden nach der Induktion	25
Abbildung 11	Schematische Darstellung der Prozessstrategie	27
Abbildung 12	Schematische Darstellung des pET16-FGG-Expressionsvektors	29
Abbildung 13	Screening eines <i>E. coli</i> -Klons hinsichtlich der FGg-Proteinproduktion 0, 1,5, 3, 4,5 und 6 Stunden nach der Induktion	31
Abbildung 14	Überprüfung der Proteinidentität nach 0 und 4 Stunden nach der Induktion.	33
Abbildung 15	Screening eines <i>E. coli</i> -Klons hinsichtlich der FGg-Proteinproduktion 0 und 24 Stunden nach der Induktion	35

Abbildung 16	Screening der Chaperonkombinationen im Hinblick auf die Proteinproduktion von löslichem FGG.	38
Abbildung 17	Variation der Induktionsstrategie	39
Abbildung 18	Screening der Proteinkonzentration bei Veränderung der IPTG-Konzentration bei einer Kultivierungstemperatur von 20 °C.	41
Abbildung 19	Screening der FGG-Proteinkonzentration	42
Abbildung 20	Schematischer Überblick der getesteten Solubilisierungsansätze	44
Abbildung 21	Vergleich der beiden Solubilisierungsmethoden	45
Abbildung 22	Vergleich verschiedener Urea-Konzentrationen hinsichtlich Solubilisierung des unlöslichen FGGs	46
Abbildung 23	Analyse der Aufreinigung des FGGs mittels IMAC bei Verwendung von 1 M Urea	47
Abbildung 24	Analyse der Aufreinigung des FGGs mittels IMAC bei Verwendung von 2 und 3 M Urea	48
Abbildung 25	Chromatographische Aufreinigung des FGGs mittels Ni ²⁺ -IMAC	50
Abbildung 26	Chromatographisches Refolding des FGGs mittels Ni ²⁺ -IMAC	51
Abbildung 27	Stufenelution zur Aufreinigung des FGGs mittels Ni ²⁺ -IMAC	53
Abbildung 28	Ultrafiltration und Aufkonzentrierung der eluierten Proben	54
Abbildung 29	Lichtmikroskopische Aufnahme von adhärierten HUVEC-Zellen 15, 30 und 60 min nach Beschickung der <i>Wells</i>	57
Abbildung 30	Ergebnisse der ermittelten Zellzahl im Zellkulturüberstand und der gemessenen Fluoreszenz resultierend aus den CTB-Tests	60
Abbildung 31	Polymerisierungsversuch des rekombinanten FGGs mit FXIII	61
Abbildung 32	Koeffizientenplots vor der Verfeinerung des Modells (A) und nach der Verfeinerung des Modells (B)	65

Abbildung 33	Zusammenfassendes Diagramm der Modellgüte-Kennzahlen nach der Optimierung des Modells	66
Abbildung 34	Konturplot	67
Abbildung 35	Produktion rekombinanter FGG in einer <i>Batch</i> -Kultivierung mit 10 g/L Glucose	70
Abbildung 36	Produktion rekombinanter FGG in einer <i>Batch</i> -Kultivierung mit 30 g/L Glucose	72
Abbildung 37	Vektorkarte von pPIC9K-FGG	98
Abbildung 38	Vektorkarte von pET16b-FGG	98
Abbildung 39	Vektorkarten der Plasmide aus dem Plasmid Chaperone Kit	99
Abbildung 40	Screening eines <i>Mut^S</i> -Klones hinsichtlich FGG-Proteinproduktion 0, 24, und 48 Stunden nach der Induktion bei verschiedenen Methanolkonzentrationen	121
Abbildung 41	Screening eines <i>Mut^S</i> -Klones hinsichtlich FGG-Proteinproduktion 0, 24, und 48 Stunden nach der Induktion in komplexem Medium (A) und definiertem Medium (B)	122
Abbildung 42	Western Blot-Analyse mehrerer Klone (K) hinsichtlich FGG-Proteinproduktion 48 Stunden nach der Induktion	123
Abbildung 43	Screening eines <i>E. Coli</i> - Klons hinsichtlich der FGG-Proteinproduktion 0 und 24 Stunden nach der Induktion bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C.	124
Abbildung 44	Western Blot-Analyse der Chaperonkombinationen 3 und 5 hinsichtlich der Produktion von löslichem FGG	125
Abbildung 45	Observed vs. Predicted Plot	125

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Überblick über die Hauptformen des Fibrinogens	5
Tabelle 2	Überblick von verschiedenen Fibrin-Biomaterialien für biomedizinische Anwendungen	11
Tabelle 3	Überblick rekombinante Produktion von Fibrinogen	13
Tabelle 4	Überblick rekombinante Produktion einzelner Fibrinogenketten	14
Tabelle 5	Mögliche Phänotypen des Stammes SMD1168 durch Integration von pPIC9K	21
Tabelle 6	Chaperonkombinationen	36
Tabelle 7	Überblick der Co-Chaperone von DnaK und GroEL	37
Tabelle 8	Überblick Induktionsstrategie	39
Tabelle 9	Versuchsplanung und Ergebnisse	64
Tabelle 10	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	78
Tabelle 11	Verwendete Kits	80
Tabelle 12	Verwendete DNA- und Proteinmarker	81
Tabelle 13	Antikörper, Proteine und Enzyme	81
Tabelle 14	Verwendete Vektoren	81
Tabelle 15	Verwendete Primer	82
Tabelle 16	Verwendete Verbrauchsmaterialien	82
Tabelle 17	Verwendete Arbeitsgeräte	83
Tabelle 18	Verwendete Software	85
Tabelle 19	Zusammensetzung YPD-Medium	86
Tabelle 20	Zuckerlösung (10xD) für das YPD-Medium	86
Tabelle 21	Zusammensetzung BMGY/BMMY-Medium	86
Tabelle 22	Zusammensetzung BMG/BMM-Medium	87
Tabelle 23	Zusammensetzung MD/MM-Medium	87
Tabelle 24	Zusammensetzung des Lysepuffers	87

Tabelle 25	BEDS-Lösung	88
Tabelle 26	Selektionsmedium (Agar)	88
Tabelle 27	Zusammensetzung LB-Miller-Medium (<i>Lysogeny broth</i>)	88
Tabelle 28	Puffer für ZYP-Medium (definiertes Medium)	89
Tabelle 29	Spurenelemente-Stammlösungen	89
Tabelle 30	Zuckerlösung für das ZYP-Medium (definiertes Medium)	89
Tabelle 31	Zusammensetzung des ZYP-Mediums	90
Tabelle 32	Verwendete Antibiotika-Stammlösungen	90
Tabelle 33	IPTG-Stammlösung	91
Tabelle 34	Zusammensetzung des Lysepuffers	91
Tabelle 35	Zusammensetzung des HUVEC-Kultivierungsmediums	91
Tabelle 36	Zusammensetzung des IB-Waschpuffers	92
Tabelle 37	Zusammensetzung eines 10 x PBS-Puffers	92
Tabelle 38	Zusammensetzung des Equilibrierungspuffers	92
Tabelle 39	Zusammensetzung des Waschpuffers	93
Tabelle 40	Zusammensetzung des Waschpuffers	93
Tabelle 41	Zusammensetzung des Bindungspuffers	93
Tabelle 42	Zusammensetzung des Elutionspuffers	93
Tabelle 43	Zusammensetzung der Nickelsulfatlösung	93
Tabelle 44	Zusammensetzung des <i>Refolding</i> puffers	94
Tabelle 45	Zusammensetzung des <i>Refolding</i> -Elutionspuffers	94
Tabelle 46	Zusammensetzung eines 12 % Trenngels	94
Tabelle 47	Zusammensetzung eines 6 % Sammelgels (für 1-4 Gele)	94
Tabelle 48	10x TGS-Puffer	95
Tabelle 49	2x SDS-Probenpuffer	95
Tabelle 50	Laemmli-Puffer	95
Tabelle 51	Zusammensetzung der kolloidalen Coomassie-Färbelösung	95

Tabelle 52	Zusammensetzung des Transferpuffers	96
Tabelle 53	Zusammensetzung des Blockpuffers	96
Tabelle 54	Zusammensetzung eines 10 x PBS-Puffers	96
Tabelle 55	Zusammensetzung eines PBST-Puffers	96
Tabelle 56	Zusammensetzung der 1. Antikörperlösung	96
Tabelle 57	Zusammensetzung der 2. Antikörperlösung	97
Tabelle 58	Zusammensetzung der BSA-Stammlösung	97
Tabelle 59	Zusammensetzung des 50x TAE-Laufpuffers	97
Tabelle 60	Verwendete Zelllinien, Bakterien- und Hefestämme	97
Tabelle 61	2x SDS-Probenpuffer	104
Tabelle 62	Protokoll der durchgeführten Polymerase- Kettenreaktion	104

12 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sabrina Grünert, geb. Baganz
Geburtsdatum/-ort: 09.12.1987/Georgsmarienhütte
Nationalität: deutsch

Schulische und akademische Ausbildung:

07/2013 – 10/2019 Leibniz Universität Hannover, Promotion in Chemie
Promotionsthema: Rekombinante Produktion der *fibrinogen gamma chain* (FGG)
04/2011 – 04/2013 Medizinische Hochschule Hannover, M.Sc. in Biochemie
Thema der Masterarbeit: Expression des rekombinanten Wachstumsfaktors TGF- β in hochproduzierenden Säugetierzellen
10/2007 – 04/2011 Leibniz Universität Hannover, B.Sc. in Chemie
Thema der Bachelorarbeit: Expression und Aufreinigung von Wachstumsfaktoren in CHO-Zellen
08/2000 – 06/2007 Gymnasium Bad Iburg, Abitur

Berufliche Erfahrungen

02/2019 – heute Realschullehrerin, Oberschule Marklohe
08/2018 – 01/2019 Vertretungslehrkraft, Oberschule Verden
01/2017 – 07/2018 Vorbereitungsdienst für das Lehramt an Realschulen an der Realschule Verden, Studienseminar Verden
07/2013 – 07/2016 Wissenschaftliche Hilfskraft/Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover
06 – 11/2010 Studentische Hilfskraft, imug Beratungsgesellschaft für sozial ökonomische Innovationen, Hannover

13 Publikationsliste

*Erstautor/Vortragender

Fachartikel

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

Posterbeiträge

S. Baganz*, I. Pepelanova, M. Wilhelmi, U. Rinas, T. Scheper, On the way to a clinically reliable source of fibrin-based biomaterials, *ProcessNet Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen*, Aachen, Deutschland, 2016

S. Baganz*, I. Pepelanova, M. Wilhelmi, U. Rinas, T. Scheper, On the way to a clinically reliable source of fibrin-based biomaterials, *International Symposium of Biofabrication* Hannover, Deutschland, 2015

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

S. Baganz*, I. Pepelanova, F. Stahl, K. Friehs, U. Rinas, T. Scheper, Production of recombinant fibrinogen gamma chain in *Pichia pastoris*, *Biofabrication for NIFE Retreat*, Hannover, Deutschland, 2014

Conference Proceedings

E. Abdulkerim*, **S. Baganz**, A. Schambach, C. Kasper, T. Scheper, Production and purification of TGFb-1 (IL2 SP) in CHO^{SFS}-Cells, Proceeding of the 22nd Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Wien, 2011

Betreute Arbeiten

Im Rahmen der Promotion wurden folgende Abschlussarbeiten betreut:

- Lukas Raddatz: Screening und Selektion hochproduzierender *Pichia pastoris* Klone zur Produktion der Fibrinogen- γ -Kette, Masterarbeit im Fach Life Science, Mai 2014 – November 2014
- Tobias Steinwedel: Produktion der *fibrinogen gamma chain* in *Escherichia coli*, Bachelorarbeit im Fach Life Science, Februar 2015 – April 2015
- Katharina Schmidt: Produktion und Aufreinigung der *fibrinogen gamma chain* (FGG), Bachelorarbeit im Fach Life Science, Februar 2016 – April 2016