

Heterologe Expression eines von *Galleria mellonella* abgeleiteten antimikrobiellen Peptids (AMP) mittels insektenzellbasierter Expressionssysteme

Auswirkungen hydrodynamischer Beanspruchungen im
mikroblasenbegasten Rührreaktor

Vorgelegt von
Diplom-Ingenieur (FH)
Damir Druzinec
geb. in Wiesbaden

Von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften
- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr.-Ing. Harald Kruggel-Emden
Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Matthias Kraume
Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak
Gutachter: Prof. Dr.-Ing. habil. Ralf Pörtner

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 17. Februar 2017

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und
Pharmazeutische Technologie

Band 6

Damir Druzinec

**Heterologe Expression eines von *Galleria mellonella*
abgeleiteten antimikrobiellen Peptids (AMP)
mittels insektenzellbasierter Expressionssysteme**

Auswirkungen hydrodynamischer Beanspruchungen
im mikroblasenbegasten Rührreaktor

D 83 (Diss. TU Berlin)

Shaker Verlag
Aachen 2017

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Berlin, Techn. Univ., Diss., 2017

Copyright Shaker Verlag 2017

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-5265-7

ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum 2011 bis 2015 am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen im Rahmen des LOEWE-Schwerpunktes „Insektenbiotechnologie“ angefertigt. Ich möchte mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die moralische und fachliche Unterstützung sowie die schöne Zeit, auch außerhalb der Arbeit, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt den beiden Professoren Herrn Dr.-Ing. Peter Czermak und Herrn Dr.-Ing. Matthias Kraume für die Ermöglichung dieser Arbeit, die anregenden fachlichen Diskussionen und die Gutachtertätigkeit. Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak besonders dafür danken, dass er mich seit meiner Studienzeit stets intensiv förderte und unterstützte.

Besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Dr.-Ing. Denise Salzig für ihre fachliche und persönliche Betreuung sowie die moralische Unterstützung während dieser Zeit.

Timo Feick, Hans-Richard Hör, Jonas Kaltenbach und Miriam Blumenstock danke ich für die experimentellen Ergebnisse, die sie zum Fortschritt dieser Arbeit im Rahmen ihrer studentischen Tätigkeiten und Bachelorarbeiten beigetragen haben.

Meiner Familie danke ich herzlich für die vielfältige Unterstützung während dieser Zeit. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an meine Lebensgefährtin Katrin Söhngen, die während dieser Zeit viel Verständnis und Geduld aufbringen musste und mich auch in schwierigen Zeiten stets motivieren konnte.

Inhaltsverzeichnis

<i>Danksagung</i>	<i>I</i>
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>III</i>
<i>Symbole und Abkürzungen</i>	<i>VII</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>XV</i>
<i>Abstract</i>	<i>XVII</i>
1 <i>Einleitung</i>	1
1.1 Insektenzellen und deren Verwendung in der rekombinanten Proteinproduktion	3
1.1.1 Spodoptera frugiperda abgeleitete Zelllinien.....	3
1.1.2 Drosophila melanogaster abgeleitete Zelllinien	3
1.1.3 Verwendung der Zelllinien für die heterologe Proteinproduktion	4
1.2 Baculovirus-Expressionsvektor-System (BEVS)	5
1.2.1 Biologie der Baculoviren.....	5
1.2.2 Baculoviren als Expressionsvektoren.....	7
1.2.3 Baculovirusinfektion und infektionsassoziierte Einflüsse auf die Proteinproduktion.....	7
1.3 Stabile Expression mittels <i>Drosophila</i> S2 Zellen	9
1.3.1 Systemspezifische Einflüsse auf die Produktion mittels stabil transfizierter S2 Zellen	10
1.4 Gloverin: Ein insektenassoziiertes antimikrobielles Peptid (AMP)	11
1.5 Beschreibung der Turbulenz im gerührten Bioreaktorsystem	14
1.5.1 Strömungsbedingungen und Turbulenz.....	14
1.5.2 Beschreibung der Turbulenz mittels der Energie- und Wirbelkaskade	16
1.5.3 Charakterisierung mittels der turbulenzstabilisierten Dispersion	19
1.6 Kultivierung von Zellkulturen in begasten Rührreaktorsystemen	22
1.6.1 Beanspruchung der Zellen infolge des Rührens	24
1.6.2 Beanspruchung der Zellen infolge der Begasung.....	32
1.6.3 Auswirkungen von Pluronic F68 als zellprotektives Additiv	36
2 Problemstellung und Zielsetzung	39

3	<i>Material und Methoden</i>	43
3.1	Analytische Methoden	43
3.1.1	Bestimmung des AcMNPV Baculovirustiters	43
3.1.2	Bestimmung der GmGlv-GFP Konzentration	45
3.1.3	Quantitative Bestimmung der Zelldichte und Vitalität	49
3.2	Statistisches Design von Experimenten (DoE): Das Antwortflächen-Verfahren	49
3.3	Methoden zur Kultivierung der Expressionssysteme	52
3.3.1	Kryokonservierung der Zellen	52
3.3.2	Auftauen der Zellen und Anzucht des Inokulums	53
3.3.3	Drosophila Expressionssystem (DES)	53
3.3.4	Baculovirus-Expressionsvektor-System (BEVS)	54
3.4	Verfahrenstechnische Charakterisierung des 3 l Rührreaktorsystems	56
3.4.1	Reaktorkonfiguration	56
3.4.2	Ermittlung der Leistungscharakteristiken	58
3.4.3	Bestimmung des volumetrischen Stoffübergangskoeffizienten k_{La}	59
3.4.4	Partikelbasierte Untersuchungen	60
3.4.5	Ermittlung des Verhaltens von Mikrogasblasen im Rührreaktorsystem	61
3.4.6	Energetische Charakterisierung des Rührreaktors mittels Öl/Wasser-Modellsystem	65
3.5	Kultivierung der Expressionssysteme im mikroblasenbegasten 3 l Rührreaktor	68
3.5.1	In-situ Überwachung mittels der Impedanzspektroskopie	68
3.5.2	Anzucht des Inokulums	70
3.5.3	Versuche zum Einfluss hydrodynamischer Belastungen	71
3.6	Bestimmung zellspezifischer Parameter	74
3.6.1	Spezifische O ₂ -Aufnahmerate	74
3.6.2	Zellwachstum, Glukoseverbrauch sowie Laktat- und Ammoniakproduktion	75
3.6.3	Produktion von GmGlv-GFP	76
4	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	77
4.1	Synthese von GmGlv-GFP mittels des BEVS	77
4.1.1	Festlegung der infektionsassoziierten Parameter	77
4.1.2	Einflüsse der infektionsassoziierten Parameter	80

4.1.3	Spezifische <i>GmGlv</i> -GFP Ausbeute	86
4.1.4	Ergebnisvalidierung und Festlegung der Versuchsbedingungen	87
4.2	Synthese von <i>GmGlv</i>-GFP mittels des DES	91
4.2.1	Festlegung der induktionsassoziierten Parameter	91
4.2.2	Einflüsse der induktionsassoziierten Parameter	93
4.2.3	Ergebnisvalidierung und Festlegung der Versuchsbedingungen	97
4.3	Charakterisierung des mikroblasenbegasten Rührreaktorsystems	105
4.3.1	k_{La} -Charakterisierung für verschiedene Rührerkonfigurationen	105
4.3.2	Leistungscharakteristika	111
4.3.3	Einfluss der Rühr- und Begasungsintensität auf Mikrogasblasen in turbulenter Strömung ...	113
4.3.4	Einfluss der Bioreaktorkonfiguration auf Mikrogasblasen in turbulenter Strömung	122
4.3.5	Spezielle Betrachtungen zum Stofftransport	128
4.3.6	Beschreibung der turbulenzinduzierten Beanspruchung	134
4.3.7	Methodik zur isolierten Betrachtung hydrodynamischer Prozesseinflüsse auf Zellen	146
4.4	Biosynthese von <i>GmGlv</i>-GFP im mikroblasenbegasten Rührreaktor	150
4.4.1	Auswirkungen hydrodynamischer Belastungen auf das BEVS	150
4.4.2	Auswirkungen hydrodynamischer Belastungen auf das DES	176
4.4.3	Vergleichende Betrachtungen	192
4.4.4	Theoretische Überlegungen zur Maßstabsübertragung	196
5	<i>Schlussfolgerungen und Ausblick</i>	201
	<i>Literaturverzeichnis</i>	209
	<i>Anhang</i>	231
A1	ANOVA zu den statistischen Beschreibungsmodellen des BEVS	231
A2	ANOVA zu den statistischen Beschreibungsmodellen des DES	232
A3	ANOVA zu den statistischen k_{La} Beschreibungsmodellen	233
A4	Publikationen	234
A5	Lebenslauf	235