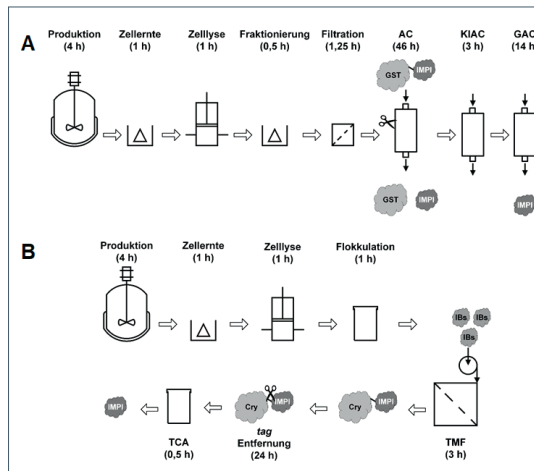


Daniel Hoffmann

Produktion des Insektenmetalloprotease Inhibitors in *Escherichia coli*

Neuartige Plattformtechnologie für die *inclusion body*-basierte Produktaufarbeitung



Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie | Band 12

Herausgeber: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

**Produktion des Insektenmetalloprotease
Inhibitors in *Escherichia coli*
Neuartige Plattformtechnologie für die *inclusion*
body-basierte Produktaufarbeitung**

Dem Fachbereich Biologie und Chemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen zur Erlangung des Grades:

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

Dissertation vorgelegt von:

Daniel Hoffmann

geboren in Frankfurt am Main

Gießen, 2018

Diese Veröffentlichung ist Teil meiner Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) durch den Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek
1. Gutachter: Prof. Dr. Peter Czermak
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Vilcinskas

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und
Pharmazeutische Technologie

Band 12

Daniel Hoffmann

**Produktion des Insektenmetalloprotease Inhibitors
in *Escherichia coli***

Neuartige Plattformtechnologie für die
inclusion body-basierte Produktaufarbeitung

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag
Düren 2019

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.: Giessen, Univ., Diss., 2019

Copyright Shaker Verlag 2019

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

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-6677-7

ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Telefon: 02421 / 99 0 11 - 0 • Telefax: 02421 / 99 0 11 - 9

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

„Wer zur Quelle will, muss gegen den Strom schwimmen“

Hermann Hesse

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Motivation & Arbeitshypothesen	5
2 Grundlagen	9
2.1 Rekombinante Proteinproduktion	9
2.1.1 Antimikrobielle Peptide als Alternative für Antibiotika	10
2.1.2 Der Insektenmetalloprotease Inhibitor (IMPI)	13
2.2 <i>Escherichia coli</i> als Expressionssystem	14
2.3 Fusionsproteine	18
2.3.1 Steigerung der Löslichkeit	19
2.3.2 <i>Pull-down in inclusion bodies</i>	20
2.4 Das Cry4AaCter-tag als Basis für eine neuartige Produktions- plattform	20
2.5 Isolierung von <i>inclusion bodies</i>	22
2.6 Resolubilisierung von <i>inclusion bodies</i>	24
2.7 tag-Entfernung	25
2.8 Prozessskalierung	26
3 Material & Methoden	31
3.1 Geräte, Software und Verbrauchsmittel	31
3.2 Organismen	31
3.3 Plasmide und Oligonukleotide	31
3.4 Kultivierung	33
3.4.1 Erzeugung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen . . .	33
3.4.2 Transformation	34
3.4.3 Mini-Kulturen	34
3.4.4 Anlegen von Kryokulturen	35
3.4.5 Proteinproduktion im Schüttelkolben-Maßstab	35
3.5 Klonierung	36
3.5.1 Mutagenese	36
3.5.2 Plasmidpreparation	37
3.5.3 <i>Golden Gate</i> -Klonierung	37
3.5.4 Kolonie-PCR	38
3.6 Proteinbiochemische Methoden	39
3.6.1 SDS-PAGE	39
3.6.1.1 Coomassie-Färbung	40

3.6.2	Western-Blot	41
3.6.3	<i>Inclusion body</i> Resolubilisierung	42
3.6.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	42
3.6.5	Umpufferung	43
	3.6.5.1 Diafiltration	43
	3.6.5.2 Dialyse	43
	3.6.5.3 Gelfiltration	44
3.6.6	Proteolytische <i>tag</i> -Entfernung	44
3.6.7	IMPI-Aktivitätstest	45
3.6.8	Fällungen	46
	3.6.8.1 Säurefällung	47
	3.6.8.2 Hitzefällung	47
3.6.9	Thiolmessung	47
3.6.10	Lipopolysaccharidmessung	48
3.7	<i>Produktion im Bioreaktor</i>	49
3.7.1	Parameter für die Prozessskalierung	49
3.7.2	500 ml-Reaktoren	51
3.7.3	7l-Reaktoren	52
3.7.4	Micro-24 Reaktorsystem	52
3.8	<i>Produktaufarbeitung</i>	52
3.8.1	Zellernte	53
3.8.2	Zellaufschluss	53
	3.8.2.1 BugBuster® Master Mix	53
	3.8.2.2 Hochdruckhomogenisator	54
3.8.3	Messung der Partikelgrößenverteilung	54
3.8.4	Affinitätschromatographie	54
3.8.5	Kationenaustauschchromatographie	55
3.8.6	Größenausschlusschromatographie	58
3.8.7	Natriumboratlökkulation	58
3.8.8	LPS-Reduktion der <i>inclusion body</i> -Fraktion	59
3.8.9	Tangentialstrommembranfiltration	59
3.8.10	Probensterilisation	60
4	Ergebnisse & Diskussion	61
4.1	Lösliche Produktion von IMPI	61
4.1.1	<i>tag</i> -freie Produktion	61
4.1.2	GST-IMPI	63
4.2	Anpassungen der löslichen Produktion	67
4.2.1	Veränderung des Expressionsvektors	68
4.3	Umsetzung der Produktaufarbeitungsstrategie	76
4.3.1	Zellaufschluss	76

4.3.2	Affinitätschromatographie	76
4.3.2.1	Proteolytische Hydrolyse auf der Säule	77
4.3.3	Ionenaustauschchromatographie	80
4.3.4	Größenausschlusschromatographie	82
4.3.4.1	Aktivitätsuntersuchung und Ausbeute	85
4.3.5	LPS-Entfernung und Probensterilisation	86
4.4	<i>Inclusion body</i> -basierte Produktion von IMPI(I38V) mit <i>pull-down tag</i>	89
4.4.1	Funktionalitätstest des Cry4AaCter- <i>tag</i>	89
4.4.2	Orientierung des Cry4AaCter- <i>tag</i> und Aktivitätsuntersuchung	94
4.5	Anpassungen der IB-basierten Produktion und Produktaufarbeitung	98
4.5.1	Fällungen nach proteolytischer <i>tag</i> -Entfernung	98
4.5.2	Produktion in BL21(DE3) mit reduzierendem Cytoplasma	110
4.5.3	Einfluss der alkalischen Resolubilisierung auf das Zielprotein	113
4.6	Maßstabsvergrößerung der <i>inclusion body</i> -basierten Produktion	123
4.7	Produktaufarbeitung der Cry4AaCter-basierten <i>inclusion bodies</i>	123
4.7.1	Zellaufschluss und Partikelgrößenverteilung	123
4.7.2	Stabilität der Cry4AaCter-basierten <i>inclusion bodies</i> im Lysat	127
4.7.3	Separierung der <i>inclusion bodies</i> von Zelltrümmern und LPS	128
4.7.4	Tangentialstrommembranfiltration	131
4.7.4.1	Vergleich zweier Membranen mit unterschiedlicher Porengröße	132
4.7.4.2	Aufreinigungsbilanz mit der 0,1 µm-Membran	134
4.7.4.3	Produktaufarbeitung nach der Filtration	137
4.7.5	Aktivitätsuntersuchung gegen Pseudolysin	139
4.8	Prozessvergleich	142
4.9	Voruntersuchungen für einen Transfer des IB-Prozesses . . .	145
5	Ausblick	149
5.1	Fazit	152
6	Literaturverzeichnis	155
	Veröffentlichungen	177

Danksagung	179
Anhang	181