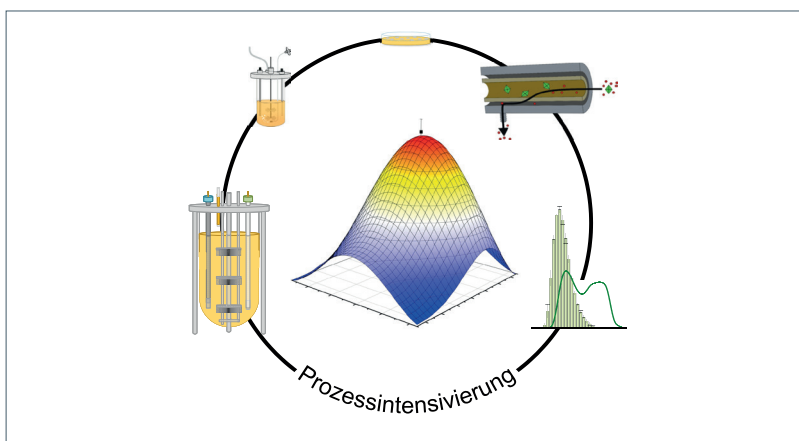


Mathias Joachim

Prozessintensivierung der rekombinanten
Herstellung und neuartigen membranbasierten
Aufreinigung eines Elastin-Like-Polypeptid
gekoppelten antimikrobiellen Peptids



Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische
Technologie | Band 16

Herausgeber: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

**Prozessintensivierung der rekombinanten Herstellung und
neuartigen membranbasierten Aufreinigung eines Elastin-
Like-Polypeptid gekoppelten antimikrobiellen Peptids**

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

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

Dissertation vorgelegt von

M.Sc. Mathias Joachim

Geboren am 12.12.1988 in Stuttgart Bad-Cannstatt

Gießen, 2019

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

1. Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak
2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Vilcinskas

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und
Pharmazeutische Technologie

Band 16

Mathias Joachim

**Prozessintensivierung der rekombinanten
Herstellung und neuartigen membranbasierten
Aufreinigung eines Elastin-Like-Polypeptid
gekoppelten antimikrobiellen Peptids**

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag
Düren 2020

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., 2020

Copyright Shaker Verlag 2020

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

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-7456-7

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

Zusammenfassung

Die Verbreitung von Antibiotika-resistenten Keimen ist eine wachsende Bedrohung für Gesundheitssysteme weltweit. Antimikrobielle Peptide (AMPs) werden als mögliche Lösung der steigenden Nachfrage nach neuen Antibiotika gesehen. Die Ausschöpfung des Potentials vielversprechender AMPs erfordert die Produktion und Aufreinigung der Peptide in ausreichender Menge. Herkömmliche Produktionsprozesse für AMPs bestehen aus *Batch*-Kultivierungen im *Up*- und chromatographischen Aufreinigungsverfahren im *Downstream Processing*. Trotz der Limitationen bezüglich der Maßstabsübertragung und der hohen Kosten ist die Chromatographie noch immer der industrielle Gold-Standard. Alternative Aufreinigungsstrategien, wie der Gebrauch selbst agglomerierender *Tags* und Membranfiltrationen, sind ein vielversprechender Ansatz. Um das volle Potential dieser neuen Prozesse ausschöpfen zu können, müssen diese jedoch von Grund auf entworfen werden. Die Prozessintensivierung eines solchen alternativen Produktions- und Aufreinigungsprozesses war das Ziel dieser Arbeit. Ein chemisch definiertes Minimalmedium für das Wachstum und die rekombinante Proteinproduktion eines AMPs wurde entwickelt. Der Einsatz eines *E. coli*-Stammes mit veränderten Redoxbedingungen im Cytosol erforderte die Entwicklung eines maßgeschneiderten Mediums mit erhöhtem Eisenanteil (M9i). Mit diesem M9i-Medium und der Etablierung einer C-Quellen limitierten *Fed-Batch*-Strategie konnte für *E. coli* Rosetta-gami™ B(DE3)pLysS erstmals das Wachstum in die Hochzelldichte gezeigt werden. Die Anpassung der Induktionsparameter führte zu einer 208-fachen Steigerung des Produkttiters, im Vergleich zum Ausgangsprozess (*Batch*-Prozess im LB-Komplexmedium). Mit dem kombinierten *Scale-up* Kriterium der konstanten Gelöstsauerstoffkonzentration und der übereinstimmenden volumetrischen Energieeinträge an den Grenzen der Rührerkaskade konnte eine erfolgreiche Methode zur Maßstabsübertragung präsentiert werden. Der erfolgreiche Einsatz von selbst agglomerierenden Elastin-Like-Polypeptid (ELP) *Tags*, in Kombination mit keramischen Mikrofiltrationsmembranen zur Aufreinigung konnte gezeigt werden. Eine Kombination aus Rückspülung und mechanischer Zerstörung der Deckschicht konnte erfolgreich benutzt werden, um dem Hauptverblockungsmechanismus während der Filtration entgegen zu wirken.

Schlüsselworte: M9i- Minimalmedium, Hochzelldichtekultivierung (HCDC), Maßstabsvergrößerung, keramische Membranen, Elastin-Like-Polypeptid (ELP), *Fouling*-Analyse

Abstract

The spread of antibiotic-resistant pathogens is a severe threat to healthcare systems worldwide. Antimicrobial peptides (AMPs) have been proposed as a potential solution to the demand for new antibiotics. The exploitation of the full potential of these AMPs demands the production and purification of the peptides in sufficient amounts. Standard production processes for antimicrobial peptides comprise of batch cultivations in up- and chromatographic purification in downstream processing. In spite of limitations in scale-up and high costs, chromatography still remains industrial gold standard. Alternative downstream strategies using aggregating tags and membrane filtration are a promising approach. However, for making use of the full potential of such processes, they have to be engineered from scratch.

Process intensification of such an alternative production and purification process was the aim of this work. A chemically defined minimal medium was developed for growth and recombinant production of an AMP. The use of a redox-engineered *E. coli*-strain required a tailor made medium with an enhanced iron content (M9i). With this medium and a carbon source limited fed-batch strategy, the growth of the *E. coli* Rosetta-gamiTM B(DE3)pLysS to high cell densities was shown for the first time. Adjustment of the induction parameters led to a 208-fold increase of product titers, in comparison to the starting process (batch-process in LB-complex media). With the combined scale-up criteria of a constant dissolved oxygen concentration and matching volumetric power inputs at the borders of the stirrer cascade, a successful scale-up methodology was presented. The successful use of self-agglomerating Elastin-Like-Polypeptide (ELP) tags, in combination with ceramic microfiltration membranes, for purification, was shown. A combination of backflushing and mechanical disruption of the cake layer was used to counteract the main blocking mechanism during the microfiltration.

Keywords: M9i- minimal media, high cell density cultivation (HCDC), scale-up, ceramic membranes, elastin-like-polypeptide (ELP), fouling analysis

Erklärung wissenschaftlicher Integrität

Hiermit erkläre ich, Mathias Joachim, geboren am 12.12.1988 in Stuttgart Bad-Cannstatt, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Prozessintensivierung der rekombinanten Herstellung und neuartigen membranbasierten Aufreinigung eines Elastin-Like-Polypeptid gekoppelten antimikrobiellen Peptids“

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Alle aus veröffentlichten Schriften wörtlich oder sinngemäß übernommene Textstellen sind als Zitate im Text gekennzeichnet und im Literaturverzeichnis angegeben. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware erkläre ich mich einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Erklärung wissenschaftlicher Integrität	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einführung	1
1.1 Ziel der Arbeit	1
2 Theoretische Grundlagen	2
2.1 Antimikrobielle Peptide (AMPs)	2
2.1.1 Insektenmetalloprotease Inhibitor (IMPI)	3
2.2 Molekularbiologische Arbeiten	4
2.2.1 Fusionspartner	4
2.2.2 DNA-Assemblierungsmethoden	6
2.3 Rekombinante Proteinproduktion – <i>Upstream Processing</i>	8
2.3.1 Wirts-Organismus zur rekombinanten Proteinproduktion	8
2.3.2 Bildung von Disulfidbrücken in <i>Escherichia coli</i>	10
2.3.3 Bakteriellies Nährmedium	11
2.3.4 Kultivierung von <i>E. coli</i>	12
2.3.5 Maßstabsvergrößerung	15
2.3.6 Stofftransport von Sauerstoff	16
2.4 Produkt Aufreinigung – <i>Downstream Processing</i>	17
2.4.1 Zellaufschluss	17
2.4.2 <i>Elastin-Like-Polypeptides</i> (ELPs)	19
2.4.3 Filtration	20

2.5	Statistische Versuchsplanung (<i>DoE</i>)	27
3	Material und Methoden.....	33
3.1	Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software	33
3.2	Organismen.....	33
3.2.1	Klonierungsstamm	33
3.2.2	Expressionsstämme.....	33
3.3	Medien	33
3.3.1	Komplexmedium	34
3.3.2	Minimalmedium	34
3.4	Klonierung	35
3.4.1	Erzeugung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
3.4.2	Mutagenese	35
3.4.3	Restriktion und Ligation	35
3.4.4	<i>Golden Gate</i> -Klonierung	36
3.4.5	Transformation und DNA Vermehrung.....	36
3.4.6	DNA-Aufreinigung.....	37
3.4.7	Restriktionsverdau, Gelelektrophorese und Sequenzierung	37
3.5	Schüttelkolbenkultivierungen	37
3.5.1	Herstellung von Kryokulturen	37
3.5.2	Spurelementscreening	38
3.5.3	Fe(III)-Citrat Optimierung.....	38
3.6	Bioreaktorkultivierungen	38
3.6.1	Bioreaktorvorbereitung.....	39
3.6.2	<i>Response-Time</i> der amperometrischen (<i>Clark</i>)-Elektroden.....	40
3.6.3	Bestimmung der volumetrischen Stoffübergangszahl (K_{La})	41
3.6.4	Herstellung von Kryokulturen/Animpfkulturen für die Bioreaktorkultivierung.....	41

3.6.5	Hochzelldichtekultivierung.....	42
3.6.6	Proteinexpressionsoptimierung.....	42
3.6.7	Maßstabsvergrößerung.....	43
3.6.8	Induktionszeitpunkt Untersuchungen	44
3.7	Zellaufschluss	45
3.7.1	Chemische Lyse mittels BugBuster® Mastermix.....	45
3.7.2	Mechanische Lyse mittels Hochdruckhomogenisator	45
3.7.3	Osmotischer Schock	45
3.8	Filtration.....	46
3.8.1	<i>Dead-end</i> Filtration mittels Spritzenvorsatzfilters.....	46
3.8.2	<i>Dead-end</i> Filtration im Rohrmembrandesign	46
3.8.3	Filtration mittels Rührzelle	47
3.9	Analytik	48
3.9.1	Optische Dichte (ΔOD_{600}).....	48
3.9.2	Biotrockenmassebestimmung	49
3.9.3	Plasmidstabilitätsuntersuchung und Mutationsvalidierung	49
3.9.4	SDS-PAGE	49
3.9.5	Western-Blot.....	49
3.9.6	Dot-Blot	50
3.9.7	ELISA	50
3.9.8	IMPI Aktivitätstest.....	51
3.9.9	BCA Protein Assay	51
3.9.10	Protease Aktivität Assay	51
3.9.11	Endotoxin Assay	51
3.9.12	Partikelgrößenverteilung.....	52
3.9.13	Zeta-Potenzial	52
3.9.14	<i>Bubble-Point</i> -Test	52

	3.9.15 Siebkurven	53
4	Ergebnisse und Diskussion	54
4.1	Produktion in Komplexmedium	54
4.2	Entwicklung eines chemisch definierten Mediums	55
4.2.1	Spurenelementscreening	55
4.2.2	Optimierung der Fe(III)-Citrat Konzentration des Minimalmediums	56
4.3	Hochzelldichtekultivierung.....	61
4.4	Induktionsoptimierung.....	63
4.5	Maßstabsvergrößerung des Produktionsprozesses	65
4.6	Einfluss der Fermentationsparameter auf die Produktion	76
4.6.1	Zufütterraten	77
4.6.2	Induktionszeitpunkte.....	80
4.7	Osmotischer Schock zum Zellaufschluss	82
4.7.1	Optimierung des osmotischen Schocks	82
4.7.2	Vergleich mit mechanischer Lyse	84
4.8	Charakterisierung ELPs	86
4.8.1	Übergangstemperatur.....	87
4.8.2	Partikelgrößenverteilung.....	89
4.8.3	Viskosität	91
4.9	Mikrofiltration	91
4.9.1	Aufreinigung mittels Spritzenvorsatzfilter	91
4.9.2	Auswahl der Keramik anhand des Zetapotenzials.....	94
4.9.3	Filtration mit Scheibenmembranen in der Rührzelle.....	96
4.9.4	Filtration in Rohrmembranen	103
4.9.5	Membranvergleich	117
5	Fazit	120
6	Ausblick	123

7	Literaturverzeichnis	124
8	Veröffentlichungen	151
9	Danksagung	153
10	Anhang.....	154
10.1	Nomenklatur	154
10.2	Indizes	158
10.3	Materialien	159
10.3.1	Medien	159
10.3.2	Klonierung	161
10.3.3	Filtration.....	162
10.3.4	Analytik	163
10.4	Geräte.....	164
10.4.1	Klonierung	164
10.4.1	Schüttelkobenkultivierungen	164
10.4.2	Bioreaktoren und Zubehör	165
10.4.3	Filtration.....	166
10.4.4	Analytik	167
10.5	Chemikalien	168
10.6	Ergänzungsdaten.....	168
10.6.1	<i>DoE</i> Spurenelementscreening.....	168
10.6.2	Versuchslayout Fe(III)-Citrat Optimierung	170
10.6.3	Versuchslayout Induktionsoptimierung	170
10.6.4	M9i-Zusammensetzung	172
10.6.5	Versuchslayout osmotischer Schock <i>DoE</i>	173
10.6.6	<i>Dead-end</i> Filtration.....	174
10.6.7	Scheruntersuchung Pumpen.....	174
10.6.8	Korrelation <i>Dot-Blot</i> und ELISA.....	175

10.6.9	Kontaktwinkelmessung.....	176
10.6.10	Umrechnung Molekularmasse und Größe.....	177
11	Abbildungsverzeichnis	179