

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Proteinproduktion mittels Präzisionsfermentation	3
2.2 Bovines β -Lactoglobulin als Hauptmolkenprotein der Kuhmilch	5
2.2.1 Struktur und Denaturierungsverhalten von bovinen BLG	6
2.2.2 Amyloides Aggregationsverhalten	7
2.2.3 Ligandenbindung von bovinem BLG	9
2.2.4 Rekombinante Produktion von bovinem BLG	10
2.3 <i>Escherichia coli</i> als Gram-negativer Proteinproduktionswirt	13
2.3.1 Das T7-Expressionssystem	14
2.3.2 Mechanismen der Disulfidbrücken-Bildung in <i>E. coli</i>	15
2.3.3 <i>Inclusion bodies</i> (IBs)	16
2.4 <i>Bacillus subtilis</i> als Gram-positiver Produktionswirt	18
2.4.1 Das Xylose-Operon	20
2.4.2 Der Sec-Sekretionsweg in <i>Bacillus subtilis</i>	21
2.4.3 Mechanismen der Disulfidbrücken-Bildung in <i>Bacillus subtilis</i>	22
2.4.4 Einsatz genomreduzierter <i>Bacillus subtilis</i> Stämme zur rekombinanten Proteinproduktion	24
3 Materialien und Methoden	26
3.1 Stämme	26
3.2 Plasmide	26
3.3 Primer und Oligonukleotide	28
3.4 Chemikalien	29
3.5 Medien und Medienzusätze	32
3.6 Mikrobiologische Methoden	33
3.6.1 Sterilisation	33
3.6.2 Stammhaltung	33
3.6.3 Kultivierungen	33
3.6.3.1 <i>Escherichia coli</i> Kultivierungen	33
3.6.3.2 <i>Bacillus subtilis</i> Kultivierungen	35
3.6.4 Zellernte und Zellaufschluss	35
3.6.5 Isolierung, Waschen und Lösen von <i>Inclusion bodies</i>	36
3.6.5.1 Prozess bei der Variante rBLG-C	36
3.6.5.2 Prozess bei N-terminalen BLG-Peptiden	36

3.7 Molekularbiologische Methoden	36
3.7.1 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	36
3.7.2 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	36
3.7.3 Herstellung und Transformation von kompetenten <i>Bacillus subtilis</i> -Zellen	37
3.6.3.1 Herstellung und Transformation natürlich kompetenter <i>Bacillus subtilis</i> -Zellen	37
3.7.3.2 Herstellung und Transformation von <i>Bacillus subtilis</i> -Protoplasten.....	38
3.7.4 Quantifizierung von DNA.....	40
3.7.5 Polymerase-Kettenreaktion	40
3.7.6 Positionsspezifische Mutagenese mit der QuikChange™-Methode.....	40
3.7.7 Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	41
3.7.8 Phosphorylierung und Ligation neu synthetisierter DNA.....	42
3.7.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA	42
3.7.10 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	42
3.8 Analytische und proteinbiochemische Methoden	43
3.8.1 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	43
3.8.2 Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration.....	43
3.8.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	43
3.8.4 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	43
3.8.5 Ionenaustauschchromatographie	44
3.8.5.1 Proteinreinigung über eine Schwerkraftsäule.....	44
3.8.5.2 Halbautomatische Proteinreinigung mittels ÄKTA-System.....	45
3.8.6 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).....	45
3.8.7 Glutathion-Agarose-Affinitätschromatographie	45
3.8.8 Größenausschlusschromatographie.....	46
3.8.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
3.8.10 Densitometrie.....	48
3.8.11 Western Blot und N-terminale Sequenzierung	49
3.8.12 Proteinpräzipitation	49
3.8.12.1 Trichloressigsäure-Fällung.....	49
3.8.12.2 Ammoniumsulfat-Fällung	50
3.8.13 Hydroxylamin-Spaltung	50
3.8.14 Dialyse	51
3.8.15 Gefriertrocknung	51
3.9 Methoden zur Protein-Charakterisierung	51
3.9.1 Zirkulardichroismus	51
3.9.2 Intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz	52

3.9.3 Retinol-Assay	53
3.9.4 Extrinsische 8-Anilinonaphthalin-1-sulfonsäure (ANS)-Fluoreszenz	53
3.9.5 Thioflavin-T (ThT) Assay.....	53
4 Ergebnisse und Diskussion	55
4.1 Produktion und Charakterisierung rekombinanter β -Lactoglobulin-Varianten	55
4.1.1 Rekombinante Produktion von β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten mit <i>Escherichia coli</i>	55
4.1.2 Struktur-Analyse rekombinanter β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten.....	60
4.1.2.1 Sekundärstruktur rekombinanter β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten	61
4.1.2.2 Tertiärstruktur rekombinanter β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten.....	62
4.1.2.3 Quartärstruktur rekombinanter β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten	66
4.1.2.4 Hitze-Denaturierungsverhalten von β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten.....	67
4.1.3 Retinol-Bindeeigenschaften von β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten	69
4.1.4 Amyloide Aggregation rekombinanter β -Lactoglobulin-Cystein-Varianten	71
4.1.4.1 Amyloide Aggregation bei pH 2,0 (Hoppenreijs et al. 2023b).....	72
4.1.4.2 Amyloide Aggregation bei pH 7,0 (Hoppenreijs et al. 2023a)	73
4.1.4.3 Methodenetablierung zum Nachweis amyloider Aggregation im reduzierten Maßstab	74
4.1.5 Kernergebnisse der strukturellen und funktionellen Eigenschaften der BLG-Varianten.....	76
4.2 Rekombinante Produktion von N-terminalen β -Lactoglobulin Peptiden in <i>E. coli</i>	80
4.2.1 Produktion eines N-terminalen BLG-Peptides fusioniert an einen Glutathion-S-Transferase-Tag	81
4.2.2 Produktion von BLG-Peptiden über <i>Inclusion bodies</i>	82
4.2.2.1 Etablierung der Hydroxylamin-Spaltung in rekombinantem rBLG-C	83
4.2.2.2 Modifizierung von rBLG-C	84
4.2.3 Steigerung der <i>Inclusion body</i> -Ausbeute mittels Hochzelldichtekultivierung	86
4.2.3.1 Optimierung des Kultivierungsmediums.....	86
4.2.3.2 Kultivierung im Batch-Betrieb	88
4.2.3.3 Fed-Batch mit exponentiellem Feed	89
4.2.3.4 Fed-Batch mit pH-stat Feed-Zugabe.....	91
4.2.3.5 Vergleich der Fed-Batch-Strategien	93
4.2.4 Produktion von BLG-Peptiden mit His-Tag.....	96
4.3 <i>Bacillus subtilis</i> : Produktion, Reinigung und Charakterisierung von rekombinantem β -Lactoglobulin	99
4.3.1 Konstruktion des Plasmids pSBBs01 zur rekombinanten Produktion von BLG in <i>Bacillus subtilis</i>	100
4.3.2 Produktion und Sekretion von β -Lactoglobulin mittels konventioneller <i>Bacillus subtilis</i> -Stämme	100

4.3.2.1 Reinigung von sekretiertem rBLG.....	102
4.3.2.2 Strukturelle Charakterisierung von sekretiertem rBLG.....	104
4.3.3 Produktion und Sekretion von β -Lactoglobulin mittels genomreduzierter <i>Bacillus subtilis</i> - Stämme	105
5 Zusammenfassung und Ausblick	113
6 Literatur	116
7 Anhang.....	128