



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Rekombinante Produktionssysteme in der Enzym-
Prodrug-Therapie: Integrierte Ansätze für die kontrollierte,
skalierbare und kosteneffiziente Herstellung“

verfasst von / submitted by

Katharina Übelhör

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag. pharm.)

Wien, 2020 / Vienna, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Mag. pharm. Dr. Lukas Neutsch

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	1
Zusammenfassung.....	2
Abstract	3
Theoretischer Hintergrund.....	4
Advanced Drug Delivery Systems in der Pharmazie.....	4
Drug Delivery System: Mikro- & Nanopartikel	5
Rekombinante Produktionssysteme im Vergleich (E. coli/PIP)	8
<i>Pichia pastoris</i> – Verwendung des Hefestamms als Organismus zur Herstellung von Fusionsproteinen	9
Hydrophobin – Vorkommen und Eigenschaften	13
Einsatzgebiete von Hydrophobin	14
Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i> im Bioreaktor	15
Versuchsaufbau Reaktorkultivierung von <i>P. pastoris</i>	15
Vorbereitung der benötigten Medien	15
Herstellung des Inokulums – Upstream Process	16
Einstellung der passenden Parameter an Bioreaktor-Steuerung und Prozessleitsystem.....	17
Probennahme, Bestimmung des CDW, OD ₆₀₀ sowie Metabolite (HPLC)	17
Probennahme mit Numera und HPLC-Messung	18
Prozessstrategien für Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen	18
Ende der Kultivierung	19
Isolierung & Aufreinigung des Fusionsproteins	20
Lyticase	20
Kugelmühle.....	20
Behandlung mit Ultraschall	21
Ultrafiltration.....	21
His Mag Sepharose™ Ni Säule.....	22
ATPS – Aqueous Two-Phase System.....	22
Aufreinigung mittels Size-Exclusion Chromatography – Äkta	0
Mikro-/Nanopartikel	1
Herstellung der Mikropartikel	1

Herstellung der Nanopartikel	2
Beladung der Partikel	2
Analytik des Fusionsproteins.....	3
Bestimmung der optimalen Mess-Wellenlängen der Fluoreszenzmarker.....	3
Verwendete Fluoreszenz-Werte.....	3
Analyse mit dem Lichtmikroskop	3
Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop	3
SDS-PAGE.....	4
Bestimmung der Proteinmenge mittels Pierce-Assay.....	5
Messung der Partikelgröße von PIP_514 mittels Flow Cytometer (FCM).....	5
Zellbindungs- und Internalisierungsversuche	6
Caco-2-Einzelzellen und -Monolayer	6
SvHuc-Einzelzellen und -Monolayer	8
Resultate Kultivierungen	9
Resultate Kultivierung PIP_503	10
Resultate Kultivierung PIP_504	10
Resultate Kultivierung PIP_506	11
Resultate Kultivierung PIP_508	11
Resultate Kultivierung PIP_510	12
Resultate Kultivierung PIP_511	12
Resultate Kultivierung PIP_512	13
Resultate Kultivierung PIP_513	13
Resultate Kultivierung PIP_514	14
Visuelle Resultate	15
Resultate Isolierung von Hydrophobin	16
Lyticase	16
Kugelmühle.....	17
Behandlung mit Ultraschall	18
Messung der Partikelgröße von PIP_514 mittels Flow Cytometer (FCM).....	19
Ultrafiltration.....	20
His Mag Sepharose™ Ni-Säule	21
ATPS – Aqueous Two Phase System.....	21
Aufreinigung mittels Size-Exclusion Chromatography – Äkta	23
Resultate Analytik.....	29

Messwellenlängen der Fluoreszenzmarker	29
Aufnahmen mit dem Licht-/Fluoreszenzmikroskop	30
SDS-PAGE	31
Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Pierce-Assay	31
Resultate Zellbindungs- und Internalisierungsversuche	37
Diskussion	42
Referenzen	44
Anhang	48
Verwendete <i>Pichia pastoris</i> Stämme und Hydrophobin-Vektoren.....	48
Abkürzungen.....	48
Geräteliste	49
Verwendete Medien.....	50
Puffer für Äkta Size Exclusion Chromatography.....	51
Rohdaten Kultivierung PIP_503.....	52
Rohdaten Kultivierung PIP_504.....	52
Rohdaten Kultivierung PIP_506.....	53
Rohdaten Kultivierung PIP_508.....	54
Rohdaten Kultivierung PIP_510.....	55
Rohdaten Kultivierung PIP_511.....	56
Rohdaten Kultivierung PIP_512.....	57
Rohdaten Kultivierung PIP_513.....	58
Rohdaten Kultivierung PIP_514.....	59

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei meinem Betreuer Dr. Lukas Neutsch bedanken, der mir von Anfang an großes Vertrauen geschenkt hat und mir ein wunderbares Auslandssemester an der ZHAW Wädenswil ermöglicht hat. Seine volle Unterstützung und seine manchmal auch sehr herausfordernden Fragen haben mich nicht nur fachlich weitergebracht, sondern auch auf persönlicher Ebene gestärkt.

Weiters danke ich Alex Hämmerli für die Betreuung meiner Arbeit im Labor und für alle Antworten auf meine endlosen Fragen. Außerdem hat mich Alex während meiner Zeit an der ZHAW nicht nur bei verschiedensten Laborarbeiten unterstützt, sondern sich auch um meinen „Sprachunterricht“ in Schweizer Deutsch gekümmert.

Dem restlichen Team der Arbeitsgruppe Dr. Neutsch danke ich für die herzliche Aufnahme ins Team, viele wunderbare Arbeitstage und die lustigen gemeinsamen Abende.

Mag. Dr. Michael Wirth von der Universität Wien danke ich dafür, den Stein für meinen Auslandsaufenthalt ins Rollen gebracht zu haben, indem er mir Lukas vorgestellt hat. Vielen Dank auch an das Team des Departments für pharmazeutische Technologie, die mir bei meinen Versuchen in Wien tatkräftig zur Seite gestanden sind.

Meinen Eltern Irene und Franz Übelhör danke ich für ihr großes Vertrauen in mich und ihre mentale, physische und finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums. Ein großer Dank gilt auch meinen Brüdern Max und Paul, meinen Großeltern und meiner restlichen Familie, die mich auch während stressreichen Lernphasen tatkräftig unterstützt haben.

Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Kultivierung von *Pichia pastoris* (in weiterer Folge *P. pastoris* genannt), Hefezellen, die mittels rekombinanter DNA das Protein Hydrophobin produzieren und sekretieren, dem darauffolgenden Aufschluss der Hefezellen, dem Aufreinigungsprozess und der anschließenden Testung des reinen Hydrophobins auf den Zelllinien Caco-2 (Colon-Karzinom-Zellen) und SvHuc (mit Simian-Virus infizierte humane Uroepithelzellen).

P. pastoris stellt einen attraktiven biotechnologischen Wirtsorganismus dar, da der Hefestamm sehr robust gegenüber äußerer Stressfaktoren, wie pH-Wert- oder Druck-Veränderungen, und schnell und einfach zu kultivieren ist. Außerdem weist *P. pastoris*, im Gegensatz zum häufig eingesetzten Bakterienstamm *Escherichia coli* (in Folge *E. coli* genannt), die vorteilhafte Eigenschaft auf, dass bei der Protein-Produktion die korrekten, für ein funktionierendes Protein notwendigen, post-translationalen Modifikationen ausgeführt werden können. Über einen Vektor wurde die DNA der Hefe so verändert, dass das Protein Hydrophobin, fusioniert mit einem roten oder grünen Fluoreszenz-Marker, produziert und sekretiert wird.

Auf die Kultivierung folgt ein Zellaufschluss, um die gesamte Ausbeute an produziertem, aber teilweise nicht sekretiertem Hydrophobin zu gewinnen. Diese Versuchsreihe stellt den Hauptfokus dieser Arbeit dar, da der Aufschluss der Hefe aufgrund deren Robustheit und die speziellen tensidartigen Eigenschaften des produzierten Fusionsproteins den Down-Stream-Prozess erschweren. Der Aufschluss der Hefezellen wurde mit verschiedenen Verfahren getestet, unter anderem enzymatisch durch Zusatz von Lyticase, mechanisch, mittels Einsatzes einer Kugelmühle und zwei verschiedener Sonotroden.

Nach dem Aufschluss waren mehrere Aufreinigungsschritte notwendig, um Verunreinigungen und in der Suspension verbliebene Hefezell-Bestandteile abzutrennen, wofür Methoden wie Ultrafiltration, Zentrifugation, ein Zwei-Phasen-Trenn-System (ATPS) und Säulenchromatografie zur Anwendung kamen. Filtration und Zentrifugation dienten der Abtrennung größerer Suspensionspartikel, zur Trennung des Hydrophobins von anderen, durch die Hefezelle produzierten, Proteinen kam die Säulenchromatografie zur Anwendung.

Die aufgereinigten Proben konnten danach für Bindungs- und Internalisierungsversuche an den oben genannten Zelllinien eingesetzt werden. Die Bindungsversuche wurden an Einzelzellsuspensionen durchgeführt und mittels Flow Cytometer (FCM) vermessen, die Internalisation wurde an Zell-Monolayern getestet und die Fluoreszenz des Fusionsproteins via Spektrophotometrie gemessen.

Weiters wurden einige Probe-Chargen von Mikro- und Nanopartikeln aus biodegradabilem Polylactid-co-Glycolid (PLGA) hergestellt, wie sie im zielgerichteten Wirkstoff-Transport Anwendung finden. Rekombinantes Hydrophobin könnte hier möglicherweise eine Alternative bieten zu bisher eingesetzten Stabilisatoren bei der Herstellung der Partikel, könnte als Überzugsmittel zur Erhöhung der Hydrophilie fungieren, oder gemeinsam mit einem bioadäsiven Liganden (als Fusions-Protein) für zielgerichtetes Drug-Targeting eingesetzt werden.

Abstract

This thesis deals with the cultivation of the yeast *Pichia pastoris* (subsequently written as *P. pastoris*) that produces and secretes the amphiphile protein Hydrophobin, the breakdown of the yeast cells, the purification process of the fusion protein and the testing of its interaction with Caco-2 cells (colon carcinoma cells) and SvHuc cells (simian virus-transformed human uroepithelial cells).

P. pastoris poses as an attractive host organism system for biotechnological processes as its cultivation is relatively easy and cost efficient. The yeast also holds an advantage to commonly used bacterial host *Escherichia coli* (*E. coli*) as *P. pastoris* produces proteins with the correct post-translational modifications. A DNA-vector-system was used to provide a genetically modified yeast that produces and secretes an organism foreign protein fused with red or green fluorescent markers.

Different methods were used to break down the host cell walls after the purification process to get a hold of un-secreted fusion protein. These experiments represent the focus of this thesis as *P. pastoris* is a very robust type of yeast that withstands different external influences.

After breaking down the cell walls, several purification steps were needed to separate the Hydrophobin from the rest of the harvest biomass. Methods like ultrafiltration, centrifugation, an aqueous two-phase system (ATPS) and size exclusion chromatography were tested as purification methods.

The last step was to test the ability of the purified protein to bind onto or internalize into mammal cell-lines like Caco-2 or SvHuc. Single-cell suspensions and cell monolayers were used for these experiments.

Another aspect of this thesis was the production of micro- and nanoparticles made from biodegradable polylactic-co-glycolic acid (PLGA) and the possibility of using Hydrophobin as a stabilizing agent in the process or coating the particles with the protein to enhance the hydrophilicity of the particles so that they may enhance targeted drug-delivery.

Einleitung

Theoretischer Hintergrund

Advanced Drug Delivery Systems in der Pharmazie

Tabletten, Kapseln, Granulate etc. sind klassische „Drug Delivery Systems“ (Wirkstoff-Transport Systeme), die innerhalb ihrer jeweiligen Kategorie über spezielle Eigenschaften verfügen (magensaft-, speichelresistent, retardierte Freisetzung von Wirkstoff etc.) und Abgabeformen aufweisen (peroral, intravenös, nasal, buccal, intramuskulär etc.), um an einem spezifischen Ort im Körper ihre Wirkung zu entfalten^{1,2}.

Manche Wirkstoffe entfalten aber trotz aufwändig entwickelter Technologien nicht nur am erwünschten Ort ihre Wirkung, sondern greifen unspezifisch an mehreren Orten im Organismus an. Dieses Phänomen tritt oft auf, wenn ein Wirkstoff nicht direkt am Wirkort appliziert werden kann, sondern systemisch eingesetzt wird. Ein wichtiges Beispiel dafür sind Zytostatika, die oft schon in geringen Dosen hoch toxisch sind, schwere Nebenwirkungen verursachen und eine gezielte Therapie sehr schwierig machen. Sehr häufig ist eine hohe Dosierung dieser Medikamente notwendig, da am Weg zum Wirkort schon ein Großteil des Wirkstoffs verstoffwechselt wird, aber für einen Angriff der Tumorzellen eine noch ausreichend wirksame Dosis am Zielort erforderlich ist³⁻⁶.

Daraus lässt sich schließen, dass – abhängig vom konkreten Anwendungsfall – sowohl der Wirkstoff vor der Metabolisierung als auch der menschliche Körper vor dem toxischen Einfluss durch den Wirkstoff geschützt werden müssen. Das zu entwickelnde System muss also optimale pharmakodynamische und pharmakokinetische Eigenschaften und im Idealfall eine hohe Spezifität für das Zielgewebe aufweisen.

Viele Forschungsgruppen haben sich im Bereich der Pharmazeutischen Biotechnologie mit genau diesen Problemen beschäftigt und verschiedene Lösungen entwickelt. Mikropartikel, Nanopartikel, Liposomen, Goldpartikel und magnetische Mikro-/Nanopartikel stellen einige Beispiele der Kategorie „Advanced Drug Delivery Systems“ (weiterentwickelte Wirkstoff-Abgabe Systeme) dar^{1,3,7}.

In dieser Arbeit wird die Herstellung und Verwendung von biodegradablen Mikro- und Nanopartikeln aus Polymeren (speziell PLGA) näher diskutiert.

Mithilfe dieser Mikro-/Nanopartikel können Wirkstoffe, vor äußeren Einflüssen geschützt, durch den Körper transportiert werden, zusätzlich können über diese Weise auch „Prodrugs“ ins biologische System eingeschleust werden. „Prodrugs“ sind Substanzen, die selbst noch keine pharmakologische Wirkung auf den Körper haben, deren Metabolite aber eine Wirkung verursachen⁸.

Drug Delivery System: Mikro- & Nanopartikel

Mikro-/Nanopartikel sind 1-1000nm groß, werden aus verschiedenen Materialien, wie unterschiedlichen natürlichen/synthetischen Polymeren, Lipiden für Liposomen oder Mizellen, Carbon oder auch Gold, hergestellt und können für die pharmazeutische Anwendung als Wirkstoff-Träger verwendet werden, da viele dieser Materialien bereits von der FDA (Food and Drug Administration) als sicher eingestuft worden sind^{9(p14),10}.

Der Wirkstoff liegt entweder gelöst oder als Feststoff im Kern des Nanopartikels eingeschlossen vor, ist in der Matrix des Partikels verteilt oder an der Partikel-Oberfläche adsorbiert^{4,11,12}. Um Nanopartikel größentechnisch besser einordnen zu können, sind verschiedene Beispiele in **Abbildung 1** als Vergleich angeführt.

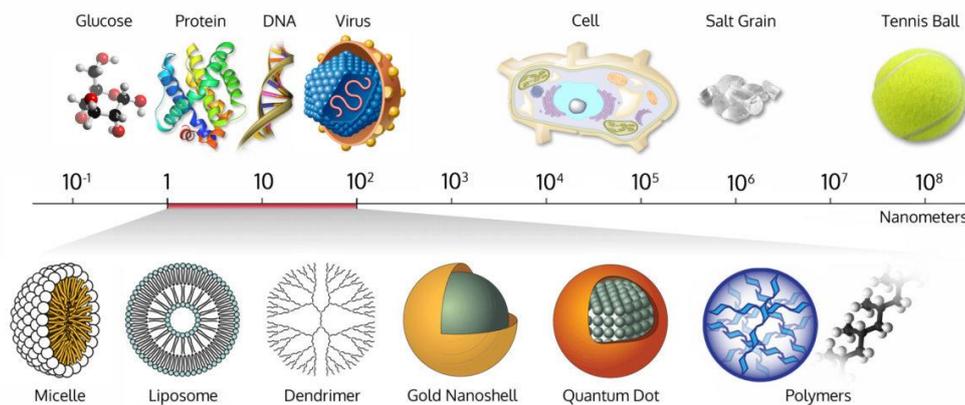


Abbildung 1 - Größenvergleich von Nanopartikeln mit verschiedenen Beispielen zum besseren Verständnis¹³

Paul Ehrlich prägte Ende des 19. Jahrhunderts den Begriff „Magic Bullet“, womit er Partikel bezeichnete, die, nach Verabreichung, zielgerichtet an einen bestimmten Ort im Körper wandern. Ehrlich beschäftigte sich zwar nur mit der Einfärbung von Geweben mittels verschiedener Chemikalien und nicht direkt mit der Heilung von Krankheiten über diesen Weg, legte aber damit schon den Grundstein für die zielgerichtete Arzneimitteltherapie^{14,15}.

Auch der Physiker Richard Feynman sprach schon 1959 in seinem Vortrag *There's Plenty of Room at the Bottom* von „sehr kleinen, aber sehr aktiven Zellen, deren Nachahmung große Möglichkeiten eröffnen könnte“, ohne die Bezeichnung „Nanopartikel“ dafür zu verwenden¹⁶. Erst etwas später definierte Prof. Norio Taniguchi den heute verwendeten Begriff dafür, „Nanotechnologie“, den er vom lateinischen Begriff für Zwerg (*nanus*) ableitete¹⁷.

Im medizinischen und pharmazeutischen Bereich sind Nanopartikel unter anderem deshalb so interessant, da sie (i) eine erniedrigte systemische Abgabe-Dosis von zum Beispiel Zytostatika durch Schutz vor Wirkungseintritt vor Ankunft am Zielort und erhöhte Dosis am erwünschten Wirkort ermöglichen² und (ii) aufgrund ihrer geringen Größe auch für intravenöse oder intraarterielle Injektionen geeignet sind, da sie auch kleinste Blutgefäße (\varnothing 3-8 μ m) passieren können^{12(p164)}.

Für die Behandlung gewisser Krankheiten (z.B. Tumorzellen) wurden Nanopartikel schon in die derzeit angewandten Therapien integriert oder sind am Weg zur Zulassung, wie zum Beispiel Albumin-gebundenes Paclitaxel (Brustkrebstherapie)¹⁰, in Liposomen verkapseltes Doxorubicin (Krebstherapie)³, Cisplatin in PLGA-mPEG Nanopartikeln (Krebstherapie)³, Rhodamin-Nanopartikel (zur Behandlung von Schädigungen der Chochlea)¹⁰ und Partikel, die die

Blut-Hirn-Schranke passieren können sollen¹⁰. Zusätzlich kommen Nanopartikel nicht nur bei der gezielten Verabreichung von Arzneistoffen zur Anwendung, sondern auch als Vehikel für bildgebende diagnostische Verfahren^{3,10}.

Weiters bieten Nanopartikel auch die Option der Oberflächenmodifikationen, die zum Beispiel die Bioverfügbarkeit verlängern und den Wirkort genauer definieren können. Dies funktioniert zum Beispiel über kovalent an die Partikel gebundene Liganden, Antikörper, die nur am korrespondierenden Antigen an der Zielzelle binden und auf diese Weise zu ihrem Wirkort geleitet werden. Eine andere Möglichkeit stellen Peptide oder auch Liganden dar, die nur an Zellen mit exakt passendem Rezeptor andocken. Einige Tumorzellen exprimieren verstärkt Folsäure-Rezeptoren, zu denen Nanopartikel, deren Oberfläche mit Folsäure modifiziert wurde, geleitet werden können^{3,5,6}. Oberflächenmodifikationen sind nicht nur für den zielgerichteten Angriff auf maligne Zellen wichtig, sondern auch, um dem vorzeitigen Abbau durch das Retikuloendotheliale System (RES) zu entkommen. Das RES ist eine der wichtigsten Barrieren in biologischen Systemen, das als Teil des Immunsystems dafür zuständig ist, nicht-körpereigene Moleküle zu identifizieren, zu opsonieren und zu eliminieren. Um eine längere Zirkulationszeit im System zu erreichen und damit die Chance zu erhöhen, möglichst viel vom verabreichten Wirkstoff zum gewünschten Wirkort zu bringen, sollten Nanopartikel hydrophile Eigenschaften und eine Größe unter 100nm aufweisen^{5,9}.

Mithilfe von folgenden Substanzen, ist es möglich, eine hydrophile Schutzschicht zu schaffen und dadurch die Zirkulationszeit im Blut zu verlängern: Polyethylenglykol, Polyvinylpyrrolidon, Humanes Serum Albumin (HSA), Polysorbate, Polysaccharide und weitere⁶.

Die für diese Arbeit verwendeten Mikro-/Nanopartikel wurden aus Polylactid-co-Glycolid (PLGA), einem synthetischen Polymer, hergestellt, das aufgrund seiner guten Bioabbaubarkeit, Biokompatibilität, niedrigen Toxizität und Immunogenität von der FDA (Food and Drug Administration) als sicher eingestuft wurde.^{18,19} In **Abbildung 2** ist die Struktur eines PLGA-Polymers skizzenhaft dargestellt.

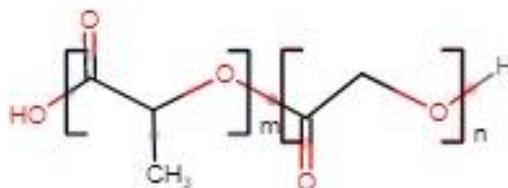


Abbildung 2 - chemische Struktur von PLGA - m: Anzahl der Lactid-Monomere, n: Anzahl der Glycolid-Monomere

Für die Herstellung von Nanopartikeln gibt es unterschiedliche Verfahren, die in **Tabelle 1** aufgelistet sind. Nachdem Hydrophobin, ein amphiphiles Protein, das aus Pilzen isoliert werden konnte, die Eigenschaft besitzt, sich an Grenzflächen anzulagern und auf diese Weise stabilisierend zu wirken, könnte das Protein in Zukunft den Einsatz klassischer Stabilisatoren ersetzen^{20,21}. Weitere Einsatzmöglichkeiten von Hydrophobin sind im Kapitel **Einsatzgebiete von Hydrophobin** zu finden.

Tabelle 1 - Herstellungstechniken für Nanopartikel - eine Übersicht der angewendeten Techniken und deren Referenz-Literatur

Methode	Material	Referenz-Literatur
solvent evaporation	PLGA	Fessi et al. ²² , Ho et al. ²³ , Soppimath et al. ²⁴
spontaneous emulsification/solvent diffusion	PLGA/PLA/PLG	Soppimath et al. ²⁴
nanoprecipitation	PLGA-PMBH	Esfandyari-Manesh et al. ²⁵ , Mora-Huertas et al. ²⁶
desolvation	HSA (+ Glutyaldehyde-Linker)	Langer et al. ²⁷ , Weber et al. ²⁸
salting-out	Eudragit L 100-55	Galindo-Rodriguez et al. ²⁹

Nach einiger Zeit werden die Partikel vom Körper durch Hydrolyse der Esterbindungen zwischen Lactat und Glycolsäure metabolisiert. Der Abbau wird vom Abwehrsystem des Körpers über die sogenannte Oponierung gesteuert, ein Prozess, bei dem die Partikel von Makrophagen erkannt und aufgenommen werden, um in weiterer Folge phagozytiert und somit aus dem System entfernt zu werden^{6,10}.

Die Geschwindigkeit der Matabolisierung hängt von verschiedenen Parametern, wie der Morphologie der Nanopartikel, der Partikelgröße (kleine Partikel werden aufgrund der verhältnismäßig größeren Oberfläche schneller abgebaut), der Polymer-Zusammensetzung (50:50 Monomer-Verhältnis wird am schnellsten abgebaut, Verhältnisse, die auf eine Seite der beiden Grundstrukturen verschoben sind, langsamer) und der Hydrophilie/Lipophilie (hydrophile Partikel entkommen der Oponierung länger als lipophile) ab. Da die Monomer-Strukturen (Lactat und Glycolsäure – Strukturformeln siehe **Abbildung 3**) auch als Zwischenprodukte verschiedener metabolischer Abbauwege im Körper gebildet werden, können diese mit minimaler toxischer Wirkung auf das System hydrolysiert werden und beschleunigen außerdem den weiteren Abbau des noch verbleibenden Polymers^{10,30}.

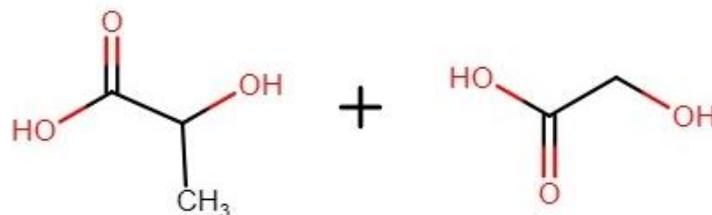


Abbildung 3 - PLGA Monomere - links: Lactat, rechts: Glycolsäure

Rekombinante Produktionssysteme im Vergleich (E. coli/PIP)

Die Verwendung von rekombinanter DNA (rDNA) – DNA, die im Labor verändert oder über einen Vektor eingebrachten Genabschnitt erweitert wurde – ermöglicht die Produktion von Fusionsproteinen durch Mikroorganismen, die diese Produkte in ihrem natürlichen Umfeld nicht herstellen würden³¹. Für die rekombinante DNA-Technologie können sowohl Prokaryonten (z.B. Bakterien) als auch Eukaryonten (z.B. Hefe, einzellige Algen und Pilze oder Säugerzellen) verwendet werden, da beide Arten hohe Wachstumsraten aufweisen und das Einbringen fremder DNA-Bestandteile ohne großen Aufwand möglich ist³¹⁻³³. Einige Beispiele für verschiedene Expressionssysteme für die Produktion von rekombinanten Proteinen sind in **Tabelle 2** angeführt.

Tabelle 2 - Beispiele für Expressionssysteme und gebildete rekombinante Proteine - adaptiert von Schmidt et al.³⁴

rekombinantes Protein	Expressionssystem
Blutgerinnungsfaktoren	BHK Zellen (baby hamster kidney cells) CHO Zellen (chinese hamster ovary cells)
Erythropoetin	CHO Zellen
Hepatitis B Impfstoff	Hefezellen (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Hansensula polymorpha</i>)
Insulin	Bakterien (<i>E. coli</i>) Hefezellen (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Hydrophobin	Bakterien (<i>E. coli</i>) Hefezellen (<i>P. pastoris</i>)

Das einfachste und am besten charakterisierte Produktionssystem der Biotechnologie ist *E. coli*, welches seit Jahren aufgrund seiner kurzen Generationszeit und weit entwickelter Fermentationstechnik für die großtechnische Herstellung unterschiedlicher Produkte (z.B. verschiedener Proteine) herangezogen wird^{31,34}. Auch zur Hydrophobin-Produktion wird in der Industrie bevorzugt *E. coli* verwendet, da sehr schnell eine hohe Zelldichte mit komplexen Medien aus billigen und einfachen Rohstoffen erzielt werden kann.^{32,33}

Ein großer Nachteil, den *E. coli* aber mit sich bringt, ist, dass dieser Mikroorganismus nicht die passenden post-translationalen Modifikationen – richtige Faltung, Glykosylierung, Phosphorylierung – ausführen kann, die für ein funktionierendes Protein oft (aber nicht immer) notwendig sind^{31,33}. Deshalb wird für Proteine, die eben diese speziellen post-translationalen Modifikationen benötigen, ein Mikroorganismus herangezogen, der diese Veränderungen ausführen kann: Hefe. Einige Forschungsgruppen teilen die Meinung, dass Hefen einen optimalen Kompromiss zwischen den passenden posttranslationalen Modifikationen und der Einfachheit und Effizienz der Expressionssysteme darstellen³³⁻³⁶.

Begonnen wurde die Protein-Produktion über Hefen mit *Saccharomyces cerevisiae*, dem bisher am besten charakterisierten Eukaryonten. Auch *P. pastoris* ist eine gern eingesetzte Hefe für die Produktion von rekombinanten Proteinen, da sie schnell und in billigen Medien zu einer hohen Zelldichte fermentiert werden kann, weder pyrogene noch pathogene Eigenschaften aufweist und schon für die Produktion von über 1000 rekombinanten Proteinen als Expressionssystem genutzt wurde^{31,34,37}.

Im ersten Schritt des MUP wird Methanol im Peroxisom von der Alkohol Oxidase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Formaldehyd (HCOH) oxidiert. Damit diese Reaktion ablaufen kann, ist zusätzlich Sauerstoff notwendig. Die beiden durch diese Oxidation entstehenden Komponenten sind sehr reaktiv und toxisch für die Zelle und werden deshalb noch innerhalb des Peroxisoms wieder abgebaut. H_2O_2 wird durch das Enzym Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut, Formaldehyd wird über verschiedene Enzyme verwertet, bis schlussendlich über eine der Reaktionen CO_2 entsteht, das von der Zelle an die Umgebung abgegeben wird. Für den Abbau von Methanol und die Induktion der Produktbildung sind also intakte Peroxisomen und die passende Menge an Methanol als Substrat notwendig^{36,38-40}.

Sollte die Toxizität von Methanol ein Problem für die Herstellung und Aufreinigung des Produkts darstellen, wie zum Beispiel in der Lebensmittelindustrie, können alternative Promotoren verwendet werden, die dann die Verwendung eines anderen Substrats erfordern. Eine ausführliche Abhandlung zu diesem Thema wurde von Vogl et al. verfasst, dessen Forschungsgruppe diverse Promotoren getestet hat⁴¹.

P. pastoris produziert das gewünschte Protein nur, wenn es die richtigen Informationen für dessen Bildung auf der DNA besitzt. Diese Informationen, im Falle dieser Projektarbeit für das Protein *Hydrophobin*, wurde mittels eines Vektors in die Hefezelle eingebracht. Über einen Vektor kann rekombinante (= fremde) DNA in die Wirtszelle eingebaut werden. Weitere notwendige Abschnitte sind (i) der „ori“ (origin of replication), an dem die Translation beginnt, (ii) eine Promoter-Sequenz, die die Produktbildung erst in Gang setzt, wenn das passende Substrat vorliegt, (iii) eine Terminator-Sequenz, die die Transkription beendet, (iv) eine Antibiotika-Resistenz, die dafür sorgt, dass die Zelle bei Anwesenheit von Antibiotika im Medium den Vektor behält. Optional sind (v) Fluoreszenzmarker (hier: red fluorescent protein – RFP bzw. green fluorescent protein – GFP) und (vi) ein alpha-Faktor, der dafür sorgt, dass das Produkt vom Wirtsorganismus sekretiert wird, was die Aufreinigung erheblich erleichtert^{31,37,40,42}. In **Abbildung 5** sind *P. pastoris* Zellen nach Ende eines Kultivierungsruns im Bioreaktor dargestellt.

In vielen Fällen kommt es aber vor, dass das gebildete Protein trotz richtiger Faltung, α -Faktor und richtiger intrazellulärer Weiterleitung nicht sekretiert wird. Bisher konnte aber noch nicht festgestellt werden, was diese Limitation auslöst^{31,33}.

Wird das Protein intrazellulär behalten, also nicht sekretiert, kann das zur Bildung von „Inclusion Bodies“ (kurz: IB, falsch gefaltete, nicht funktionsfähige Proteine) führen und in weiterer Folge zu Protein-Instabilität und -Aggregation, wie es auch häufig bei *E.coli* der Fall ist^{31,32,43}. In **Abbildung 6** sind granuläre Strukturen zu erkennen, die auf das Vorliegen von Inclusion Bodies hinweisen könnten (**Abbildung 7** zeigt eine vergrößerte Aufnahme). Um aktive rekombinante Proteine zu erzielen, müssen diese aber von der Wirtszelle sekretiert werden³¹.

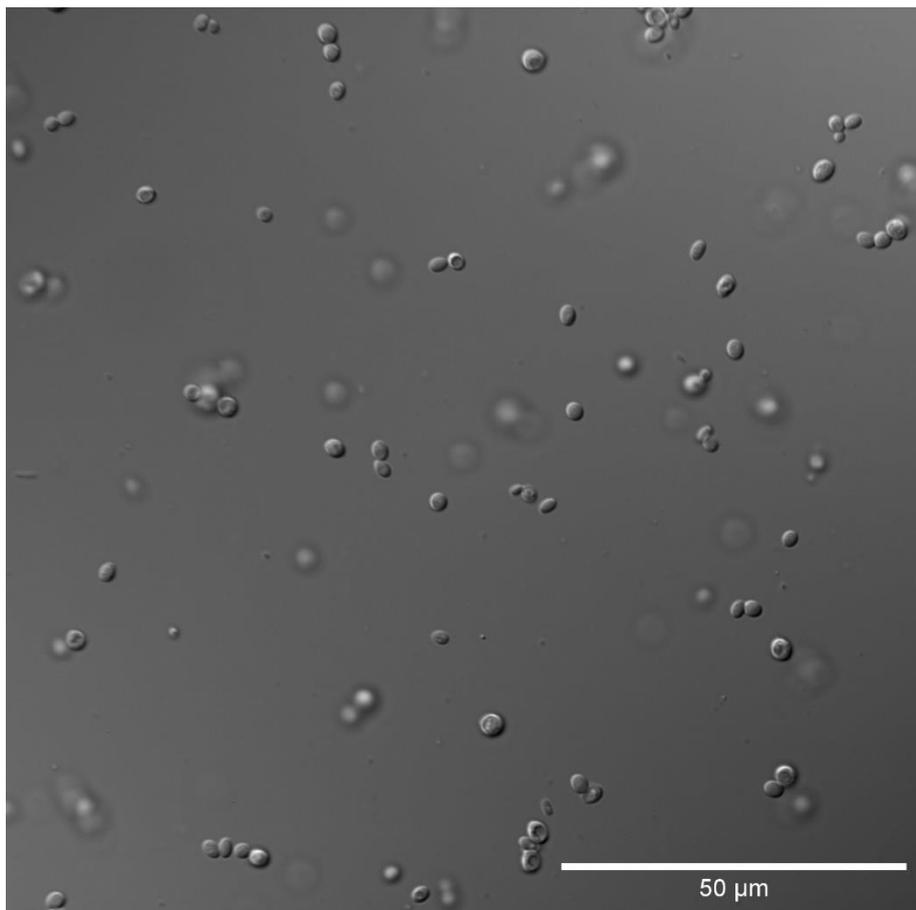


Abbildung 5 – *P. pastoris* Zellen (PIP_514) am Ende der Kultivierung – intakte Hefezellen – Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, DIC, 100x Ölimmersions-Objektiv, Numerische Apertur: 1.4

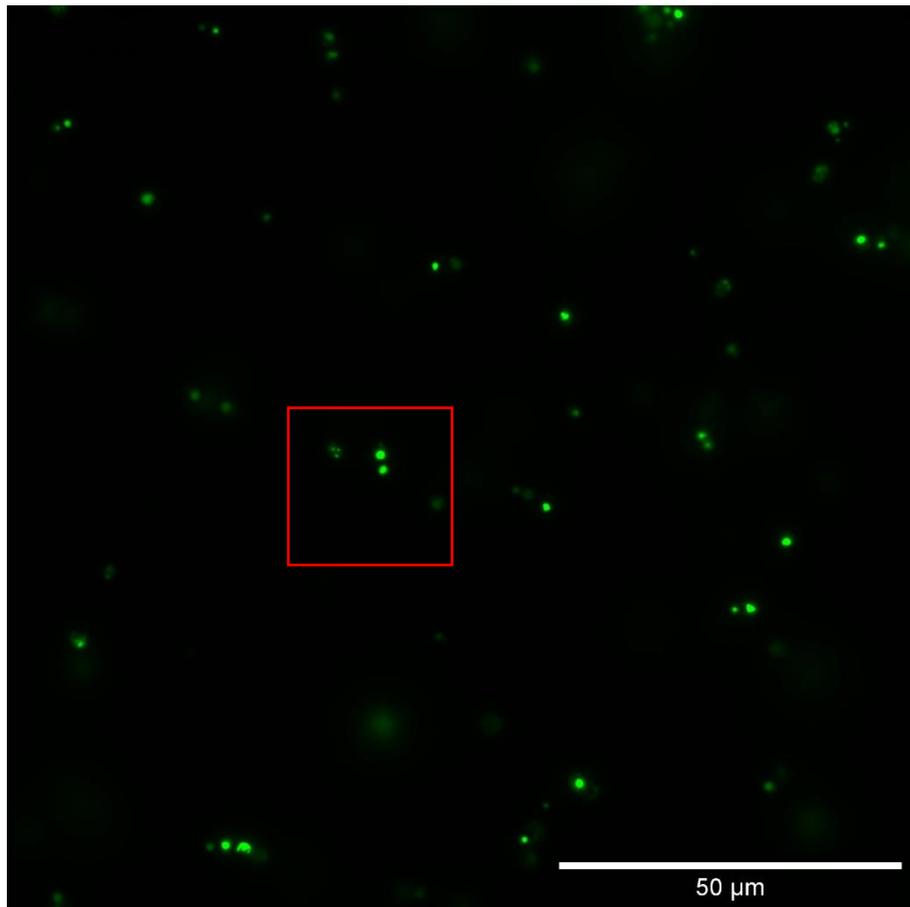


Abbildung 6 – *P. pastoris* Zellen (PIP_514) am Ende der Kultivierung – Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, FITC, 100x Ölimmersions-Objektiv, Numerische Apertur: 1.4 – rot umrandet: In dieser Zelle sind Strukturen zu erkennen, die möglicherweise Inclusion Bodies darstellen (siehe Ausschnitt – **Abbildung 7**)

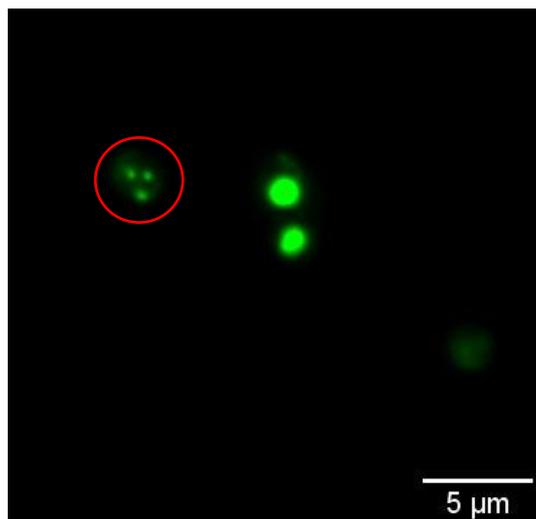


Abbildung 7 – *P. pastoris* Zellen (PIP_514) am Ende der Kultivierung - Ausschnitt aus Abbildung 6 - Die drei einzelnen Punkte in der rot umrandeten Zelle stellen möglicherweise Inclusion Bodies dar, in den beiden anderen Zellen befindet sich das Hydrophobin jeweils in der Vakuole.

Hydrophobin – Vorkommen und Eigenschaften

Filamentöse Pilze können durch Sekretion sehr kleiner (etwa 100 Aminosäuren langer), cysteinreicher Proteine die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzen und so eine Überwindung von Grenzflächen möglich machen, sodass beispielsweise im Wasser lebende Pilze auch an Land weitere Hyphen ausbilden können. Diese Proteine werden als „Hydrophobine“ bezeichnet und werden in der Natur einzig von filamentösen Pilzen produziert. Das bekannteste Protein dieser Gruppe ist das sogenannte „SC3“, das aus *Schizophyllum commune* isoliert wurde^{44,45}. Eine übersichtliche Darstellung des Phänomens der Überwindung der Oberflächenspannung ist in **Abbildung 8** zu sehen.

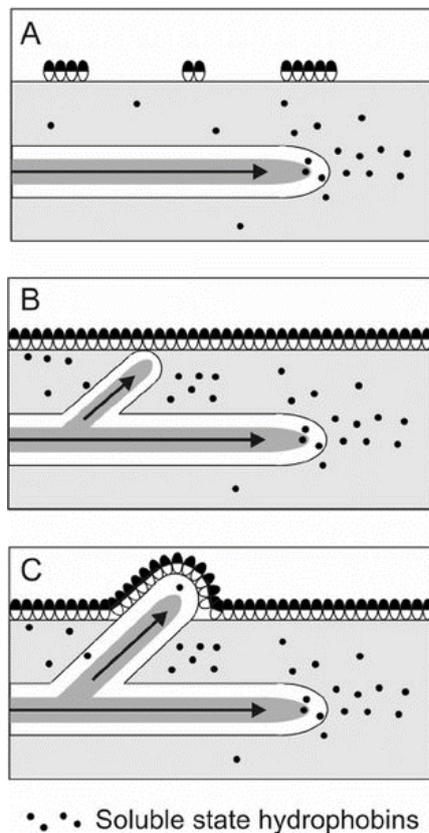


Abbildung 8 - A: Hydrophobine werden von Pilzen sekretiert, B: Die Hydrophobine lagern sich an der Wasser-Luft-Grenzfläche an, um die Oberflächenspannung zu senken, C: Der Pilz kann nun auch Sporen in die Luft ausbilden, da sich die Hydrophobine wie eine Schutzschicht an die Zellwand des Pilzes anlagern²⁰.

Hydrophobine sind etwa 7-10kDa große Proteine und weisen mehrere Cystein-Reste auf, die untereinander Disulfid-Brücken ausbilden und so die dreidimensionale Struktur des Proteins bestimmen und für dessen Stabilität sorgen^{20,21,46}.

Diese Proteine haben die Eigenschaft, sich sowohl an hydrophoben als auch hydrophilen Oberflächen anlagern oder zu einer amphiphilen Membran zusammenlagern zu können, da sie selbst amphiphile (sowohl lipo- als auch hydrophile) Eigenschaften aufweisen und damit die Fähigkeit besitzen, die Hydrophobie bzw. Hydrophilie des Materials, an dem sie sich anlagern, umzukehren^{44,47,48}. Ein Beispiel hierfür ist die Beschichtung von Teflon mit Hydrophobinen, welches danach noch hydrophobere Eigenschaften aufweist als Teflon selbst⁴⁵.

Die bisher entdeckten Hydrophobine werden in zwei Klassen eingeteilt (Klasse I und Klasse II). Die Aufteilung erfolgt aufgrund struktureller Unterschiede und der Löslichkeit des jeweiligen Hydrophobins. Jene, die Klasse I zugeordnet werden, können ausschließlich mit starken Säuren (Trifluoressigsäure, Ameisensäure), die zu Klasse II zählenden auch mit organischen Lösungsmitteln oder anderen denaturierenden Substanzen (SDS – Natriumdodecylsulfat) gelöst werden^{20,45,46}.

In geringer Konzentration – 1.0 - 4.5 µg/ml – liegen Hydrophobine in wässriger Lösung als Monomere vor und sind im Medium verteilt bzw. lagern sich an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Gefäß/Luft an. Übersteigt die Konzentration die kritische Mizellkonzentration (0.5-10.0 mg/ml), lagern sich die Monomere zu Oligomeren, bevorzugt Tetrameren, zusammen^{20,45,49}. In **Abbildung 9** ist schematisch dargestellt, wie und an welchen Grenzflächen sich die Monomere zusammenlagern.

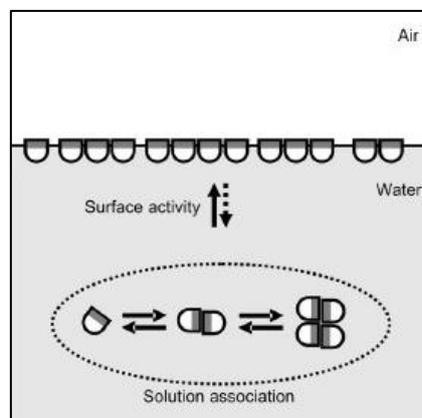


Abbildung 9 - Assoziation von Monomeren zu Tetrameren in wässriger Lösung - Dieses Phänomen tritt auf, wenn die kritische Mizellkonzentration in der Lösung überschritten wird. Hydrophobine lagern sich zusammen und an Grenzflächen wie Flüssigkeit-Luft an.⁴⁹

Einsatzgebiete von Hydrophobin

Noch gibt es keinen kommerziellen Einsatz von Hydrophobinen, aufgrund ihrer starken Oberflächen-Aktivität wird er aber in verschiedenen Bereichen vorgeschlagen: in der Lebensmittel-Branche könnten sie als Schaumstabilisatoren eingesetzt werden, in der Kosmetik zur Stabilisation von Öl-in-Wasser-Emulsionen und auch im medizinischen Bereich (Drug Delivery, Oberflächenmodifikationen etc.) könnten diese amphiphilen Proteine bald eine Verwendung finden^{20,45,47}.

Da diese Proteine sowohl die Lipophilie als auch die Hydrophilie von Oberflächen verändern können, wäre ein Einsatz als Stabilisator bei der Herstellung von Nanopartikelsuspensionen vorstellbar, womit, wie bei Coating mit humanem Serumalbumin eine höhere Verweilzeit im Körper erreicht werden könnte²⁵.

Material & Methoden

Kultivierung von *Pichia pastoris* im Bioreaktor

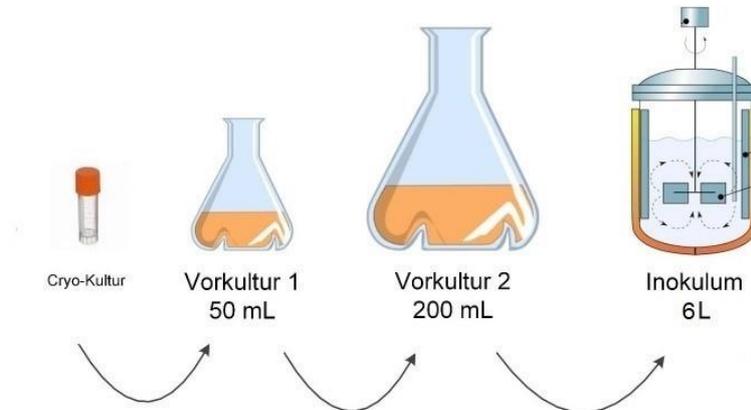


Abbildung 10 - schematische Darstellung des Upstream Prozesses – Die Cryo-Kultur wird in BMGY-Medium (Vorkultur 1&2) vorbereitet, danach als Inokulum zum neuen Nährmedium (Hellwig) in den Bioreaktor gegeben. – **Quelle:** Dr. Lukas Neutsch, ZHAW

Versuchsaufbau Reaktorkultivierung von *P. pastoris*

Der Bioreaktor wird entleert und mit Wasser gewaschen, bevor die benötigten Sonden angeschlossen werden. Die pH-Sonde muss vor dem Einsetzen mit einer Pufferlösung (pH 4.01 und pH 7.0) kalibriert werden - alle Kalibrationen erfolgen über das ABS (Advanced Biocontrol System). Die pO_2 -Sonde wird ebenfalls an einem der Eingänge montiert, aber erst nach der Inokulation kalibriert. Für die Messung der optischen Dichte während des gesamten Prozesses kann eine online OD-Sonde (Dencytee, Hamilton AG, Bonaduz) eingesetzt werden, um so die Zelldichte zu kontrollieren.

Anschließend wird der Drucktest nach SOP (standard operating procedures) durchgeführt. Verläuft dieser positiv, kann die Sterilisation gestartet werden. Hat der Prozess die Sterilisationstemperatur von 120°C erreicht, werden Zu- und Abluftfilter für 2min geöffnet, um die Filter mit dem durchströmenden Wasserdampf zu reinigen. Die Filter werden wieder geschlossen und das ABS beendet die Sterilisation selbstständig.

Vorbereitung der benötigten Medien

Das benötigte Medium für das Wachstum der Hefezellen (Hellwig et al., 2001) wird nach Anleitung (siehe **Anhang**) hergestellt und in einer, für die Menge Medium passenden Ballonflasche gelagert. Zu beachten ist hier, dass die Säure und das Wasser erst nach Mischen der restlichen Zutaten beigegeben werden, um eine exotherme Reaktion von Phosphorsäure mit der im Medium enthaltenen Kalilauge zu vermeiden.

Die Stocklösungen für die Fertigstellung des Hellwig Mediums werden, falls nicht vorrätig, nach Anleitung vorbereitet (siehe **Anhang**).

Weiters werden drei Glasflaschen, eine davon mit Phosphorsäure (8.5%ige H_2PO_4) gefüllt, die anderen beiden leer (eine für 12.5%iges NH_4^+ (Base) und eine für das Inokulum), für den Sterilisationsprozess im Autoklav vorbereitet. Eine kleine Flasche mit Poly-Propylenglykol (Anti-Schaummittel) wird ebenfalls für die Sterilisation vorbereitet.

Wichtig für alle Flaschen ist (i) die korrekte und sichere Befestigung der Schläuche mit Kabelbindern, (ii) die Kontrolle des am Deckel angebrachten Filters auf Schmutz und Beschädigungen, (iii) ein intakter Dichtungsring, (iv) der Schwalbenschwanz-Schnitt im Schlauch, der sich in der Flasche befindet, (v) eine Klammer hinter der Nadel und (vi) die korrekte Beschriftung jeder Medium-Flasche. Weiters ist zu beachten, dass an den Flaschen für Säure, Base und Anti-Schaum ein Quetschschlauch eingefügt wird, der später an den Quetschpumpen befestigt werden muss. Die vorbereiteten Flaschen werden anschließend im Autoklav sterilisiert.

Nach erfolgter Sterilisation wird der Deckel der leeren Flasche für die Base unter dem Abzug auf eine bereitgestellte Flasche mit 12.5%igem NH_4^+ gesetzt.

Säure-, Base- und Anti-Schaum-Flaschen werden auf die mit dem ABS verbundenen Waagen gestellt und an den passenden Pumpen befestigt. Die Nadeln werden vor dem Stechen durch die Septen im Deckel des Bioreaktors abgeflammt, um Kontaminationen zu vermeiden, die Klammern können danach von den Schläuchen entfernt werden. Das Medium in der Ballonflasche wird nach demselben Prinzip ebenfalls am Bioreaktor angebracht und die Klammer langsam, während gleichzeitiger Druckluftzufuhr über den Filter, geöffnet, um das Medium in den Reaktor überzuführen. Die Klammer wird wieder am Schlauch angebracht, sobald sich das Medium vollständig im Reaktor befindet.

Die Schläuche von Säure, Base und Anti-Schaum werden bis knapp vor dessen Eintritt in den Bioreaktor mit der jeweiligen Flüssigkeit gefüllt, bevor die Fermentation gestartet wird.

Der Fermentationsprozess kann nun nach Eingabe bestimmter Parameter (siehe **Einstellung der passenden Parameter an Bioreaktor-Steuerung und Prozessleitsystem**) über das ABS gestartet werden. Danach muss der Prozess am Computer und am Arc View ebenfalls gestartet werden.

Das vorbereitete Inokulum (siehe **Herstellung des Inokulums – Upstream Process**) sollte möglichst zeitnah zum Prozessstart unter dem Laminar Air Flow fertiggestellt werden. PTM1 und Biotin werden im Wasserbad auf 30°C erwärmt, um die Hefezellen keiner allzu starken Temperaturänderung auszusetzen. Die benötigte Menge der beiden Stocklösungen wird der Anleitung für die Bereitstellung des Hellwig Mediums entnommen (hier je 26ml für 600ml Inokulum). Die Stocklösungen werden in der zuvor autoklavierten Inokulum-Flasche vorgelegt und die Vorkultur hinzugefügt. Das Inokulum wird direkt nach Fertigstellung am Reaktor angebracht, durch Druckluftzufuhr übergeführt und die Inokulation in Lucillus bestätigt. Im Anschluss daran wird gleich die erste Probe entnommen (siehe **Probennahme, Bestimmung des CDW, OD600 sowie Metabolite (HPLC)**).

Herstellung des Inokulums – Upstream Process

Die Vorkultur und das Inokulum werden unter dem Laminar Air Flow vorbereitet, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Eine schematische Darstellung des Upstream-Prozesses findet sich auf **Abbildung 10**. BMGY-Medium (siehe **Anhang**) wird im Wasserbad auf 30°C erwärmt. Drei 500ml Schüttelkolben werden vorbereitet und die Kryokultur der Hefezellen so lange mit den Händen erwärmt, bis sie flüssig ist.

Pro Schüttelkolben werden 100ml BMGY vorgelegt und mit einem Aliquot der Kryokultur beimpft. Die Kolben werden bei 30°C und 150rpm über Nacht inkubiert.

Am darauffolgenden Tag werden vier 1000ml Schüttelkolben im Laminar Air Flow vorbereitet. BMGY wird wieder auf die passende Temperatur erwärmt und pro Kolben 160ml vorgelegt. Aus der Vorkultur werden in jeden Kolben 40ml pipettiert und über Nacht ein weiteres Mal inkubiert.

Einstellung der passenden Parameter an Bioreaktor-Steuerung und Prozessleitsystem

Am Computer wird in der Prozessleit-Software „Lucullus“ der in Betrieb genommene Reaktor ausgewählt und ein neues Projekt gestartet. Im nun aufscheinenden Fenster können Operation und Prozessname (PIP_OOO) eingegeben und bestätigt werden. Die benötigten Parameter für Temperatur (30°C), pH-Wert (6.0), Rührgeschwindigkeit (1200rpm), Begasung (18NL/min) und Druck (0.5bar) werden als „Setpoints“ eingetragen, wie in **Abbildung 11** sichtbar.

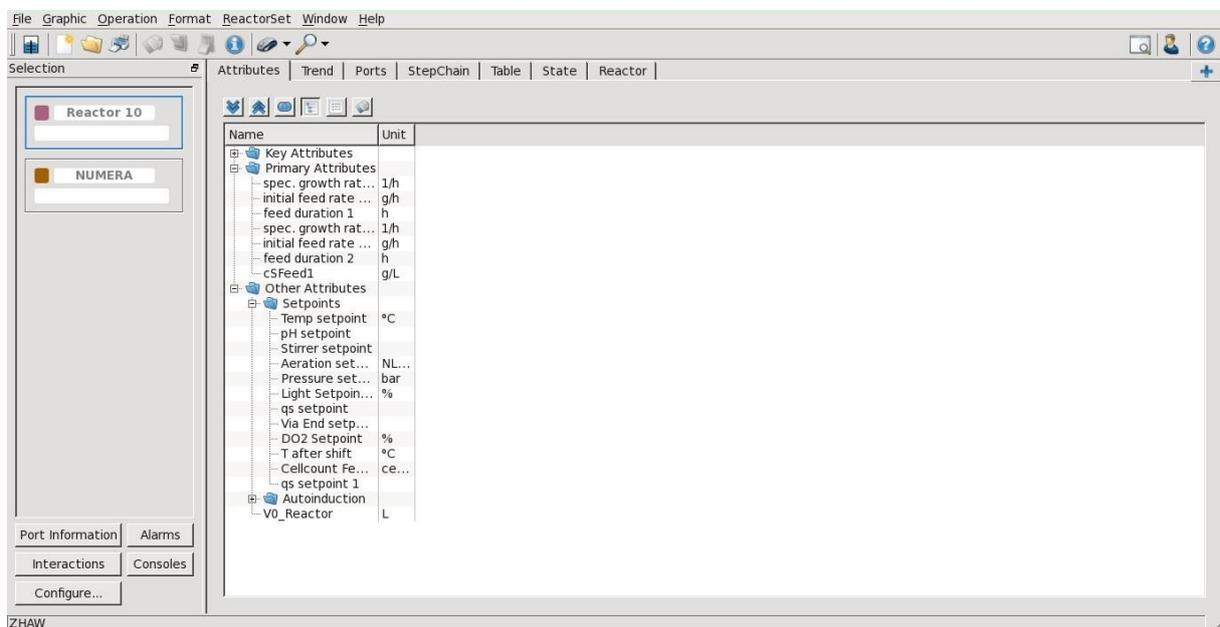


Abbildung 11 - Softwareprogramm "Lucullus" - Eingabefenster für "Setpoints" im Batch und "Primary Attributes" im Fedbatch - Hier können die benötigten Kennzahlen für Temperatur, pH, Rührerdrehzahl, Belüftung und Druck eingetragen werden, die für eine erfolgreiche Fermentation entscheidend sind.

Nachdem am ABS die Fermentation gestartet wurde, muss das Prozessleitsystem ebenfalls dazugeschaltet werden. Nach der Inokulation am Reaktor wird dieser Schritt in der „StepChain“ bestätigt und das Programm wechselt in den „Batch“. Die zuvor eingegebenen Parameter sollten am ABS ein weiteres Mal überprüft werden und können falls nötig manuell neu eingestellt werden, da in manchen Fällen die Informationsweitergabe zwischen Software und ABS nicht richtig funktioniert.

Probennahme, Bestimmung des CDW, OD₆₀₀ sowie Metabolite (HPLC)

Direkt nach der Inokulation wird die erste Probe gezogen (= Sample 000/Startsample). Mittels einer Spritze und Nadel wird, nach Abspritzen mit 70% Ethanol des Probennahme-Eingangs am Reaktor, das Septum durchstoßen und ein Aliquot der Biomasse entnommen. Die Suspension wird in einem Falcon Tube bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Je zwei Eppendorf-Gefäße für die Doppelbestimmung von Pellet und Überstand und zwei auf konstantes Gewicht getrocknete Eppendorf-Gefäße für die Bestimmung des CDW (cell dry weight) werden, nach Eintragen deren Leergewichts in eine Tabelle, vorbereitet.

In jedes Gefäß, außer in jenes für den Überstand, werden 2ml der Suspension aus dem Reaktor pipettiert. Die vier Gefäße werden 5min bei 4°C und 14000rpm zentrifugiert. Danach werden die Überstände aus den Pellet-Gefäßen in die mit „Überstand“ beschrifteten übergeführt. Im Falle einer Offline-HPLC-Messung wird 1ml des Überstands der CDW-Gefäße durch einen Sterilfilter in ein HPLC-Vial gedrückt und der Rest verworfen. Die CDW-Gefäße werden im Trockenschrank bei 105°C, die verbleibende Suspension, die Pellet- und Überstand-Gefäße bei 4°C gelagert. Das HPLC-Vial wird bei -20°C aufbewahrt.

Für die doppelte Überprüfung des Wachstums während des Prozesses wird zusätzlich zur CDW auch die optische Dichte bei 600nm manuell gemessen (OD_{offline}). Hierfür wird ein Teil der Suspension mit Puffer auf eine optimale Verdünnungsstufe gebracht (Messwerte sollten zwischen 0.2-0.8 liegen) und die Probe im UV/Vis-Spektrophotometer bei 600nm vermessen. Jede gezogene Probe, sowie die OD_{offline} , müssen am Computer vermerkt werden. Diese eingetragenen Werte werden von der Software dann automatisch in die mit dem Prozess mitlaufende Grafik eingefügt.

Probennahme mit Numera und HPLC-Messung

Wenn möglich, wird das automatisierte Probenahmesystem „Numera“ zum selbsttätigen Probenziehen und nachfolgender HPLC-Messung hinzugezogen. Die Steuerung dieses Geräts funktioniert ebenfalls über das Lucullus-Programm am Computer. Danach kann man über dieselbe Art wie bei der manuellen Probenziehung ein Sample hinzufügen. Unter „Sample Management“ wird der Verdünnungsgrad, der abhängig von der Zelldichte der gezogenen Probe ist (max. bis Verdünnung 8 möglich), eingegeben.

Für automatisiertes Probenziehen über einen gewissen Zeitraum, können Zeitspanne und Abstand, in welchem das Gerät „Numera“ Proben ziehen soll, definiert werden.

Prozessstrategien für Batch- und Fed-Batch-Kultivierungen

Der Teil einer Kultivierung, in dem sich die Zellen im Medium vermehren, wird Batch genannt. Je nach Bedingungen – richtige Temperatur, pH-Wert, Belüftung – können die Zellen mit maximaler Wachstumsgeschwindigkeit gezüchtet werden. Nach einer gewissen Zeitspanne, welche je nach Stamm der Zellen variieren kann, erreichen die Zellen die Plateauphase, sie vermehren sich also nicht mehr weiter.

Um die Zellzahl, Zelldichte und Produktbildung zu forcieren, können Feed-Lösungen an den Reaktor angeschlossen werden. Für die Erhöhung der Zellzahl/-dichte wird eine weitere Flasche Medium (mit derselben Kohlenstoff-/Energiequelle, mit der die Fermentation begonnen wurde) angebracht, wodurch die Organismen wieder mehr Nährstoffe zur Verfügung haben. Für Inangsetzung der Produktbildung wird eine Feed-Lösung mit geänderter Kohlenstoffquelle am Reaktor angeschlossen, im Falle der hier durchgeführten Kultivierung stellen Glycerol in der Batch-Phase und Methanol in der Fed-Batch-Phase die C-Quellen dar.

Bevor ein Fed-Batch gestartet werden kann, müssen die Zellen ihren Metabolismus auf die neue C-Quelle umstellen. Dies erfolgt mittels eines Adaptionpulses, welcher manuell über eine Spritze und einen Sterilfilter in den Reaktor eingespritzt wird – meist wird hier ein 0.5%iger Puls

gegeben. Nach erfolgtem Adaptionpuls sollte erneut das Erreichen der Plateauphase abgewartet werden, bevor die Zufuhr der Feed-Lösung begonnen wird.

In die Software „Lucullus“ werden die nun benötigten Parameter – spezifische Wachstumsrate, initiale Feed-Rate (F_0) und Dauer der Feed-Zufuhr (siehe **Abbildung 11**) – eingetragen und in der StepChain der nächste Schritt (Fed-Batch) eingeleitet. Der Feed wird nun über eine Quetschpumpe in den Reaktor geführt.

Die Einstellungen des Feed müssen so gewählt werden, dass bei der gewählten spezifischen Wachstumsgeschwindigkeit (μ_{set}) das Substrat vollständig von den Zellen verbraucht werden kann und nicht akkumuliert, da sonst die Gefahr besteht, dass die Zellen aufgrund der Toxizität von Methanol absterben und die Kultivierung abgebrochen werden muss.

Ende der Kultivierung

Nach erfolgreichem Batch/Fed-Batch wird die Kultivierung abgebrochen. Dafür wird am Computer auf der StepChain der nächste Schritt eingeleitet – der Shutdown.

Ein Teil der Biomasse wird abgefüllt (Harvest) und bis zur weiteren Verarbeitung kühl gelagert (4-8°C), danach kann der Rest der Biomasse verworfen werden. Alle angeschlossenen Schläuche werden abgeklemmt und abmontiert, sowie die Sonden entfernt. Der Bioreaktor wird mit Wasser gespült und alle Öffnungen mit Ethanol geputzt. Die verwendeten Septen werden durch neue ersetzt. Danach werden die Abflussventile geschlossen und der Bioreaktor mit Wasser und etwas KOH befüllt, um ein Wachstum von Mikroorganismen im Kessel zu vermeiden. Der Rührer wird auf 800rpm und die Temperatur auf 70°C eingestellt und der Reaktor bei diesen Einstellungen 1h laufen gelassen. Nach dieser Stunde wird die Temperatur abgestellt und der Rührer auf 150rpm heruntergefahren. Währenddessen können die Flaschen und Schläuche der Peripherien gereinigt und versorgt werden.

Isolierung & Aufreinigung des Fusionsproteins

Da noch keine funktionalen Isolierungs- und Aufreinigung-Verfahren etabliert waren, mussten diese erst entwickelt werden. Es wurden deshalb verschiedene Versuche durchgeführt, um die Hydrophobine zu isolieren und aufzureinigen. Einige der Versuche wurden mit der Suspension der Biomasse direkt durchgeführt, andere mit dem Überstand der abzentrifugierten Biomasse. Der größte Teil der Versuchsreihen wurde mit Kultivierungen PIP_506 & PIP_514 ausgeführt.

Lyticase

Der Versuch der Zerstörung der Zellen mittels Lyticase wurde in Anlehnung an das Protokoll von Thermo Fisher mit Kultivierung PIP_514 durchgeführt⁵⁰.

Zusammengefasst wurden 13ml Biomasse bei 14 500rpm für 5min abzentrifugiert und das dadurch erhaltene Pellet (etwa 2.5ml) mit 12.5ml Lyticase versetzt und homogenisiert. Danach wurde die Suspension für 20min bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert, bevor sie bei 14 500rpm für weitere 10min wieder abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde am Tecan auf dessen Fluoreszenzintensität vermessen und zu jener beim Harvest-Überstand gemessenen Fluoreszenz hinzugerechnet, da dieser vor Lyticase-Zugabe entfernt wird.

Kugelmühle

Für jeden Versuch, die Zellwände der kultivierten *P. pastoris*-Zellen mittels der Kugelmühle zu zerstören und dadurch eine höhere Proteinkonzentration im Überstand zu erreichen, wurden jeweils Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

Bei Versuch 1 wurde zu jeder Suspension eine 15mm Kugel gesetzt und die Probe 10 Minuten bei 30Hz geschüttelt. Für Versuch 2 wurden die Proben mit je zehn 4mm Kugeln versetzt und wieder 10 Minuten bei 30Hz behandelt.

Die Proben wurden im Anschluss am Lichtmikroskop auf ihren Zerstörungsgrad untersucht. Für die Durchführung des dritten Versuchs diente Bzducha et al. als Vorlage⁵¹. Anstatt der von Bzducha vorgegebenen fünf Zyklen an der Kugelmühle wurden bei diesem Versuch nur drei durchgeführt und im Anschluss unter dem Lichtmikroskop auf den Grad der Zerstörung untersucht.

Alle weiteren Versuche wurden mit 50%(v/v) 0.5mm Glaskugeln durchgeführt, 10min mit einer Frequenz von 30Hz behandelt⁵² und mittels tiefgekühlter Box in die Kugelmühle eingespannt. Für den letzten Versuch wurden zwölf Eppendorf-Gefäße mit 1ml 0.5mm Glaskugeln und 1ml Suspension der Kultivierung PIP_514 befüllt und 10min mit einer Frequenz von 30Hz behandelt. Danach wurden die Proben bei 14 000rpm für 5min abzentrifugiert und der Überstand am Tecan auf seine Fluoreszenzintensität untersucht. Als Referenz wurden zwei 2ml Eppendorf-Gefäße mit Harvest Biomasse bei denselben Bedingungen abzentrifugiert und vermessen. Sowohl die behandelte Probe als auch die Referenz wurden am Fluoreszenzmikroskop auf die Fluoreszenzintensität der Zellen in der Biomasse untersucht, sowie der Zerstörungsgrad der Zellwände unter dem Mikroskop verglichen.

Behandlung mit Ultraschall

Um die Zellwände mittels Ultraschall aufzubrechen wurden 2g Biomasse (PIP_503) mit einer Sonotrode bei 20kHz für 3min behandelt. Für die Sicherstellung der Zerstörung der Zellwände wurde dieselbe Probe mit NaCl auf 5ml aufgefüllt und ein weiteres Mal 30 Minuten mit einer Frequenz von 20kHz behandelt.

Danach wurden die Proben am Lichtmikroskop auf den Grad der Zerstörung untersucht.

Für den Versuch mit Kultivierung PIP_514 wurden drei Proben mit je 10ml Biomassen-Suspension mit dem Ultraschallstab für jeweils 5min behandelt. Die erste Probe (1) wurde mit Amplitude 100% und 10W behandelt, Proben (2) und (3) mit Amplitude 100% und 75W. Zu Probe (3) wurde vor Vermessung der Fluoreszenz das abzentrifugierte Pellet mit Lyticase behandelt und ein weiteres Mal abzentrifugiert. Anschließend wurden die Proben 5min bei 14500rpm abzentrifugiert und die Fluoreszenzwerte des Überstands von Probe (3) mit dem des Überstands von 10ml abzentrifugierter Harvest Biomasse verglichen. Die oben angeführten Versuche wurden mit einer Sonotrode mit einer Stärke von 160W durchgeführt, wobei nach dem Versuch mit Kultivierung PIP_506 der Ultraschallstab aufgrund starker Abnutzungserscheinungen ausgetauscht wurde.

Um zu überprüfen, ob mit einer stärkeren Sonotrode ein anderes Ergebnis erzielt werden kann, wurden drei weitere Versuche mit einem Ultraschallstab durchgeführt, der die Proben mit 1000W behandeln konnte. Die verschiedenen Versuche sind in **Tabelle 3** angeführt.

Tabelle 3 – Behandlung mit Ultraschall – Behandlung der Suspension von Kultivierung PIP_503 & PIP_514 mit einer Sonotrode – Die erreichte Endtemperatur wurde vermerkt, um festzustellen, ob ein Zusammenhang mit der Zerstörung der Zellen und der Temperatur besteht.

Kultivierung	Versuch	Zeitintervalle	erreichte Endtemperatur	Watt [W]
PIP_503	0	3min	-	160W
PIP_514	1	5min	-	
	2		-	
	3		-	
PIP_514	4	1min + 30sec	40°C	1000W
	5	1min + 10sec + 10sec	40°C	
	6	1min + 1min + 1min	60°C	

Ultrafiltration

Zur Abtrennung der Hydrophobine von anderen nach Zentrifugation der Biomasse noch verbliebenen Bestandteilen wurden 4ml des Harvest-Überstands (PIP_506) in 50 000 MWCO (molecular weight cut off filter) Zentrifugen-Tubes 5x5min bei 14 500rpm zentrifugiert. Ein weiterer Versuch wurde in Anlehnung an Przylucka et al. durchgeführt⁵³. Hierfür wurden 4ml Harvest-Überstand (PIP_506) zuerst durch einen 22µm Filter direkt in ein 50 000 MWCO-Tube filtriert und danach 5x5min bei 14 500rpm zentrifugiert. Das Permeat wurde drei Mal mit einer Mischung aus 1mM Glutathion (reduziert) und 0.1mM Glutathion (oxidiert) gewaschen und ein weiteres Mal 5min bei 14 500rpm zentrifugiert. Das Retentat wurde mit 3ml 100mM Kalium-Puffer aus dem Filter gelöst. Die Permeate und das Retentat wurden am Tecan auf ihre Fluoreszenz untersucht, ein Aliquot des Harvest Überstands diente als Referenz.

His Mag Sepharose™ Ni Säule

Die Elution über die Nickel-Säule wurde nach Protokoll des Herstellers (GE Healthcare) mit Kultivierung PIP_506 durchgeführt. Der *binding buffer* enthielt 60mM Imidazol für die erste und 20mM Imidazol für die zweite Elution.

ATPS – Aqueous Two-Phase System

Die Aufreinigung der Proben wurde mittels eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems mit nicht-ionischen Tensiden in Anlehnung an die Vorschrift von Joensuu et al. durchgeführt⁵⁴.

Die Versuche wurden mit Kultivierung PIP_506 im 5ml-Maßstab und mit unterschiedlich behandelten Samples (Harvest-Überstand, Harvest-Überstand mit Sonotrode behandelt, Harvest-Überstand mit Kugelmühle bearbeitet) durchgeführt.

Mit dem ersten Versuch wurde die Abtrennleistung von aufsteigenden Triton X-114-Konzentrationen via Doppelbestimmung getestet (2.5%, 5%, 10%).

Im zweiten Versuch wurde geprüft, ob durch wiederholte Extraktion der im ersten Schritt entstehenden Wasserphase mit 10% Triton X-114 eine höhere Hydrophobin-Konzentration erreicht werden kann. Diese aus dem ersten Schritt resultierende Wasserphase wurde ein weiteres Mal mit dem für die erhaltene Menge neu berechneten notwendigen Prozentsatz an Tensid versetzt und die Probe danach genauso weiterverarbeitet, wie bei Versuch 1.

Der dritte Versuch wurde mit zwei 50ml-Gefäßen durchgeführt, wobei eines der beiden mit 10% Triton X-114, das andere mit 5% Triton X-114 versetzt wurde. Eine genaue Darstellung des Versuchsablaufs ist in **Abbildung 13** zu finden. Nach jedem Versuch wurden das Ausgangsmaterial (Harvest Überstand), die nach Triton X-114-Zugabe entstehende Wasserphase und die Wasserphase nach Isobutanol-Zugabe am Tecan auf ihre Fluoreszenz untersucht und das aufgereinigte Hydrophobin mittels einer SDS-PAGE sichtbar gemacht. Eine vereinfachte Darstellung der Vorgehensweise für das ATPS ist in **Abbildung 12** zu sehen.

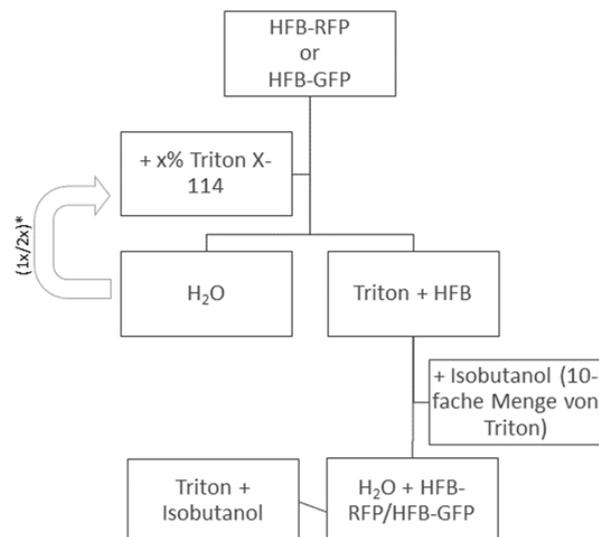
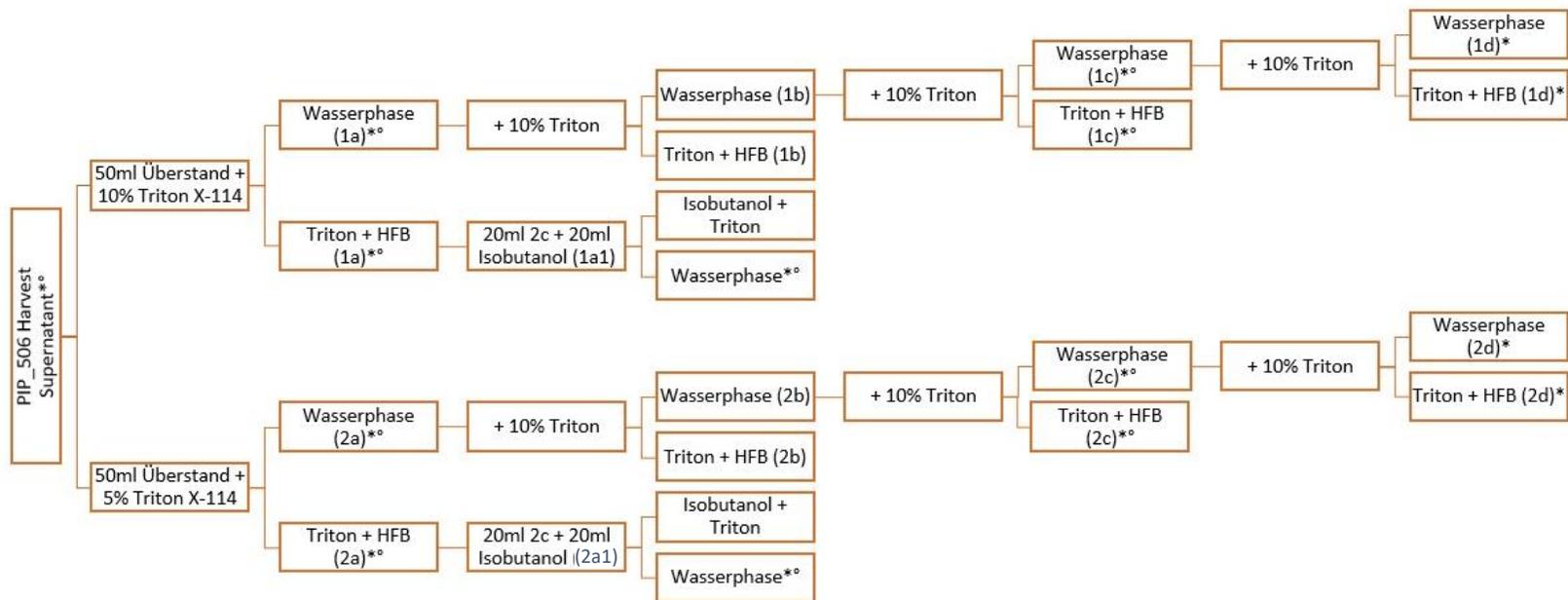


Abbildung 12 - schematische Darstellung der Aufreinigung der Proben mittels ATPS – Die durch die Zugabe von Triton-X 114 erhaltene Wasserphase wurde für einige Versuche erneut mit der passenden Menge an Tensid versetzt und parallel zur ersten Probe weiterverarbeitet (*). Nach Triton-X 114-Zugabe bzw. Isobutanol-Zugabe bilden sich jeweils 2 Phasen, Hydrophobin befindet sich in jedem dieser Schritte in der unteren der beiden Phasen. Für die Versuche wurde die obere Phase vorsichtig abpipettiert, um mit der unteren, Hydrophobin-haltigen Phase weiterarbeiten zu können.



*am TECAN vermessen

**auf die SDS-PAGE aufgetragen

Wasserphase nach Isobutanol-Zugabe = aufgereinigtes HFB

Abbildung 13 - Versuchsaufbau der Aufreinigung von PIP_506 mittels APTS – Eines der mit 50ml Harvest Überstand gefüllten Gefäße wurde mit 10%, das andere mit 5% Triton X-114 versetzt. Im zweiten und dritten Schritt wurden bei beiden Versuchen 10% Triton zugegeben. Die jeweils entstehenden Phasen wurden sowohl auf eine SDS-PAGE aufgetragen als auch ihre Fluoreszenzintensität überprüft.

Aufreinigung mittels Size-Exclusion Chromatography – Äkta

Zur Isolierung von Hydrophobin wurde jeweils der Überstand von Kultivierung PIP_506 (HFB-RFP) und PIP_514 (HFB-GFP) mittels Größen-Ausschluss-Chromatographie über eine Säule (HiLoad Superdex 75 pg prep. Size exclusion chromatography Säule – Flussrate 1-1.3ml/min) aufgereinigt (Aufbau siehe **Abbildung 14**). Als Vorlage für diese Versuchsreihe diente die Arbeit zur Aufreinigung von Hydrophobin SC3 von Wang et al.⁵⁵.

Zu Beginn wurde der zur Aufreinigung benötigte Puffer hergestellt (50mM Na-Acetat-Puffer, pH 5.0, Herstellung s. Anhang) und die Säule mit eben diesem Puffer gespült.

Die für die Aufreinigung notwendigen Parameter wurden im Software-Programm (Unicorn 6.4/7.1) vorbereitet und für spätere Aufreinigungen als Methode gespeichert. Für mit rotem Fluoreszenzprotein markiertes Hydrophobin wurden die Detektionswellenlängen 586nm (HFB-RFP) und 243nm (allgemein für Proteine) gewählt, für Kultivierung PIP_514 wurden 512nm (grünes Fluoreszenzprotein) und 260nm (für Proteine allgemein) eingestellt.

Die zu isolierende Probe wurde vor Injektion mit einem 0.22µm Filter vorgereinigt, dann manuell in den Injektionsschlauch eingespritzt und danach die Methode gestartet. Die Fraktionen wurden in 2ml Aliquoten gesammelt und nach Ende der Isolierung auf ihre Fluoreszenzintensität und Proteinkonzentration untersucht.

Die ungefähre Menge an gewonnenem Protein konnte nach Lyophilisation der Äkta-Fraktionen durch Wiegen der zuvor tarierten Probenbehältnisse ermittelt werden.



Abbildung 14 – Gerät für die die Aufreinigung mittels Size-Exclusion Chromatography: Äkta pure – **Quelle:** <https://www.gelifesciences.com/en/au/shop/chromatography/chromatography-systems/akta-pure-p-05844>

Mikro-/Nanopartikel

Herstellung der Mikropartikel

Für die Versuche mit Mikropartikeln wurden diese nach einer bereits erprobten Vorschrift hergestellt⁵⁶. Es wurden zwei Chargen Mikropartikel (MP) via Solvent Evaporation Technique (Lösungsmittel-Abdampf-Technik) hergestellt, eine Charge fluoreszenzmarkiert und eine ohne farbige Markierung.

Dafür wurden 200mg Poly(lactid-co-glycolid) (50:50 Resomer) in einem Becherglas in 1.215ml Ethylacetat (EtOAc) und 125µl Bodipy®-Lösung (1mg/ml Bodipy®493/503 in Ethylacetat) bzw. für nicht-fluoreszierende MP 125µl Bodipy®-Lösung durch dieselbe Menge EtOAc ersetzt und gelöst. Diese Lösung wurde vor der weiteren Verarbeitung auf 4°C gekühlt.

4ml (Aqua dest. + 1% Pluronic® F-68) und 50ml (Aqua dest. + 0.25% Pluronic® F-68) einer wässrigen Phase wurden in einem Becherglas bzw. in einer flachen Schale vorbereitet. Die PLGA-Lösung wurde ohne Nachtropfen in die 4ml Wasserphase übergeführt und für 10 Sekunden bei 10 Watt und 10% Amplitude mit der Sonotrode behandelt. Danach wurde die Suspension sofort in die 50ml Wasserphase übergeführt und 1h am Magnetrührer stehen gelassen. Um den verbliebenen Rest Lösungsmittel zu entfernen wurde die Partikel-Suspension in einen Rundkolben übergeführt und bei reduziertem Druck eine weitere Stunde abgedampft. Die Hälfte der erhaltenen Mikropartikel wurde drei Mal mit einer Lösung aus 20mM HEPES/NaOH + 0.1% Pluronic® F-68-Lösung (pH = 7.4) gewaschen, um die Suspension von eventuell noch frei vorliegenden Polymeren und sonstigen Komponenten zu befreien. Die andere Hälfte der Suspension wurde mit einer Waschlösung aus 20mM HEPES/NaOH (pH = 7.4) ohne Pluronic® F-68 gereinigt. Zwischen jedem Waschschrift wurde die Suspension bei 4000rpm und 20°C je 10min zentrifugiert.

Die Mikropartikel wiesen allerdings eine Eigenfluoreszenz auf, was die Fluoreszenzbestimmung von mit HFB-GFP-ummantelten Partikeln erschwerte und die Werte verfälschte. Deshalb wurde für spätere Versuche entschieden, PLGA 503H zu verwenden (siehe **Mikro-/Nanopartikel**). Die Eigenfluoreszenz der Partikel ist in **Abbildung 15** zu sehen.

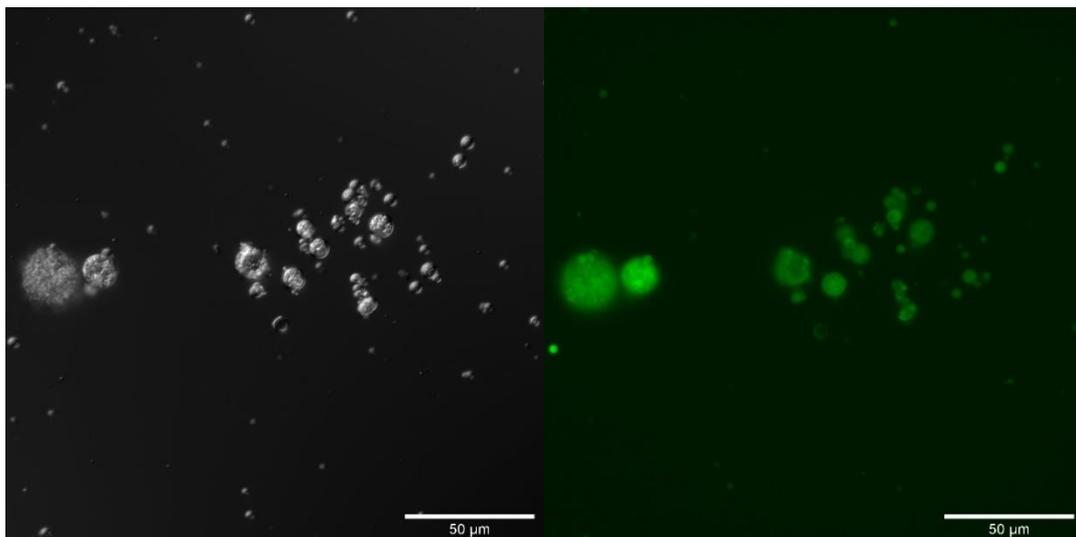


Abbildung 15 – fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PLGA-Mikropartikeln – links: DIC-Kanal – rechts: FITC-Kanal – Da die Partikel in diesem Kanal eine Eigenfluoreszenz aufweisen, lässt sich für mit HFB-GFP-ummantelte MP keine Aussage darüber treffen, ob das Coating funktioniert hat oder nicht. Die PLGA-Partikel wurden in HEPES/NaOH-Lösung ohne Pluronic gelagert.

Herstellung der Nanopartikel

Für die Herstellung von Nanopartikeln wurden 400mg PLGA 503H in 2.2g EtOAc gelöst und zwei wässrige Phasen vorbereitet: Aqueous Phase (1), bestehend aus 6ml Aqua dest. und 3% Pluronic® F-68 und Aqueous Phase (2) aus 100ml Aqua dest. + 0.1% Pluronic® F-68. An der Sonotrode wurden die gewünschten Einstellungen gewählt: 25W, 25% Amplitude, 10sec Laufzeit.

Nach vollständigem Lösen wurde die PLGA-EtOAc-Lösung in einem Schwung zu Aqu. Phase (1) gegossen und die beiden Lösungen sofort mit dem Ultraschallstab dispergiert. Aqu. Phase (2) wurde am Magnetprüher mit passender Rührzahl vorbereitet, bevor die Partikelsuspension in einem Schwung hinzugefügt wurde. Die Suspension wurde in weiterer Folge genauso weiterverarbeitet, wie die der Mikropartikel. Die Waschstschritte wurden mit HEPES/NaOH (pH = 7.4) ohne Pluronic® F-68 durchgeführt und ebenfalls in dieser Lösung für weitere Versuche aufbewahrt. Das Ergebnis der Partikel-Herstellung ist auf **Abbildung 16** zu erkennen.

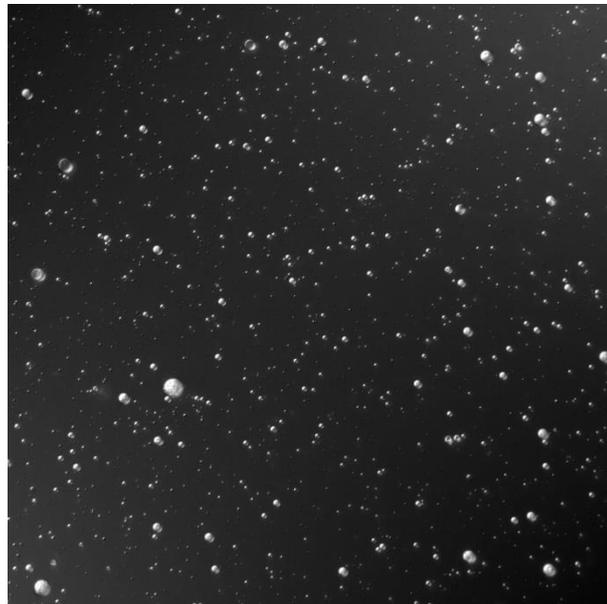


Abbildung 16 - mikroskopische Aufnahme von einer Nanopartikel-Suspension – DIC-Kanal, gemessene Partikelgrößen: 2.26 μ m, 1.73 μ m und 0.73 μ m, wobei der letzte Wert den Großteil der Partikel darstellt (der Maßstab für diese Aufnahme konnte nicht eingefügt werden, da das Bild im falschen Format abgespeichert wurde)

Beladung der Partikel

Die Beladung der Partikel mit fluoreszenzmarkieren HFBs wurde in einer separaten Semesterarbeit (Abdullah 2019, ZHAW) untersucht.

Analytik des Fusionsproteins

Bestimmung der optimalen Mess-Wellenlängen der Fluoreszenzmarker

Zur Bestimmung der Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenzmarker wurden für jeden Prozess (RFP oder GFP) ein 3D-, ein Exzitations- und ein Emissions-Scan durchgeführt. Für den 3D-Scan wurde der Wellenlängenbereich sehr breit gewählt (meist 300-800nm), bevor der Bereich anhand des erhaltenen Graphen eingeschränkt werden konnte, um die vielen sich überlappenden Werte aus der Grafik auszuschließen (siehe **Messwellenlängen der Fluoreszenzmarker** für die visuelle Darstellung der Daten). Für den Exzitations-Scan wurde eine aus dem Graphen des 3D-Scans ermittelte Wellenlänge für die Emission eingetragen, für die Anregungswellenlängen ein angemessener Rahmen gewählt. Um einen Emissions-Scan durchzuführen, wird das Prinzip des Exzitations-Scans umgekehrt.

Verwendete Fluoreszenz-Werte

Die für die einzelnen Kultivierungen verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen sind in **Tabelle 4** dargestellt.

***Tabelle 4 - verwendete Wellenlängen zur Fluoreszenzmessung in der Analytik** – Die hier angegebenen Wellenlängen wurden über 3D-Scans ermittelt und für die Auswertung der Versuche mit der jeweiligen Kultivierung verwendet. ¹Die eingestellten Wellenlängen waren für PIP_503 nicht optimal gewählt, dieser Fehler wurde aber erst später offensichtlich.*

	RFP		GFP	
	Anregung [nm]	Emmission [nm]	Anregung [nm]	Emmission [nm]
PIP_503	485 ¹	535 ¹	-	-
PIP_504	-	-	410	530
PIP_506	588	613	-	-
PIP_508	-	-	445	530
PIP_510	588	613	445	530
PIP_511	588	613	-	-
PIP_512	588	613	445	530
PIP_513	-	-	445	530
PIP_514	-	-	408	512

Analyse mit dem Lichtmikroskop

Für die Analyse der Zellzerstörung mittels Kugelmühle und Sonotrode wurde vor Inbetriebnahme des Fluoreszenzmikroskops das Lichtmikroskop verwendet. Nach der jeweiligen Behandlung durch Kugelmühle oder Sonotrode wurden die Proben auf sichtbare Schäden in der Zellwand und auf den Zerstörungsgrad überprüft.

Die Proben wurden nicht fixiert, sondern in wässriger Lösung mit einem 100X Objektiv untersucht.

Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop

Vor der Aufnahme der Bilder mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Proben mit DAPI und im Falle von GFP-markierten Proben zusätzlich mit aWGA nach Vorlage von Sabrina Tevere eingefärbt⁴³.

SDS-PAGE

Zur Auftrennung und Sichtbarmachung der Proteine wurde eine SDS-PAGE mit 10%-igen Gelen durchgeführt. Die Gele wurden in mehrfacher Ausführung vorbereitet und bis zur Verwendung kühl und feucht gelagert. In **Tabelle 5 & Tabelle 6** sind die verwendeten Bestandteile und Mengen angeführt.

Tabelle 5 - Bestandteile der SDS-PAGE Gele - Trenngel

TRENNGEL		
	1 Gel	2 Gele
UHQ-H ₂ O	4ml	8ml
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2.5ml	5ml
30% Acrylamid-Bis	3.3ml	6.6ml
20% SDS	100µl	200µl
VORTEX		
TEMED	33µl	66µl
25% APS	17µl	34µl

Tabelle 6 - Bestandteile der SDS-PAGE Gele - Sammelgel

SAMMELGEL		
	1 Gel	2 Gele
UHQ-H ₂ O	2.425ml	4.85ml
0.5M Tris-HCl pH 6.8	0.94ml	1.88ml
30% Acrylamid-Bis	0.625ml	1.25ml
20% SDS	10µl	20µl
VORTEX		
TEMED	7.5µl	15µl
25% APS	6µl	12µl

Nach Entfernung der Käbme und Einspannen der Gele in die Apparatur wurde ein Thermo Scientific Pierce Tris-Glycin Running Buffer (10-fach konzentriert, pH 8.5), welcher für die Durchführung mit UHQ Wasser 1:9 verdünnt wurde, hinzugefügt.

4µl Referenz wurden jeweils in die erste und bei einem der beiden Gele in die vorletzte, beim anderen in die letzte Tasche des Gels und pro Probe 20µl in die Taschen dazwischen pipettiert. Die Probenmenge ergab sich aus 15µl Probe + 5µl Puffer ohne DTT (nicht reduzierte Proben) bzw. 5µl Puffer mit 20% DTT (reduzierte Proben).

Durch Anlegen von Strom (genauere Angaben: siehe Resultate der jeweiligen SDS-PAGE) wurde die SDS-PAGE so lange laufen gelassen, bis die Front weit genug fortgeschritten war. Danach wurden die Gele mit 20ml Coomassie Brilliant Blue bzw. mittels Silberfärbung⁵⁷ behandelt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen, bevor sie entfärbt, gewaschen und zur weiteren Analyse eingeschweißt aufbewahrt wurden.

Bestimmung der Proteinmenge mittels Pierce-Assay

Diese Versuchsreihe wurde nach Vorschrift von Thermo Fisher in einer 96-well-Platte durchgeführt⁵⁸. Die BSA-Standards, sowie das Pierce Reagens wurden von Thermo Fisher bezogen. Die Standards wurden bei jeder Kultivierungsreihe neu mitgemessen.

Messung der Partikelgröße von PIP_514 mittels Flow Cytometer (FCM)

Nach Behandlung des Harvest von Kultivierung PIP_514 mittels der 1000W Sonotrode wurde die Zellsuspension einmal ungewaschen und einmal nach einem Waschschrift mit PBS (5min, 10 000rpm) mittels Flow Cytometer vermessen. Als Vergleich diene jeweils die Harvest-Suspension ohne Ultraschall-Behandlung. Der Versuch wurde mit dem CytoSense Flow Cytometer und Ultrareinem Wasser (Verdünnung 1:10.000) durchgeführt. Die für die Messung verwendeten Parameter sind in **Tabelle 7** angeführt.

Tabelle 7 - FCM-Parameter – Übersicht der Einstellungen des Flow Cytometers zur Messung der Partikelgröße von Harvest und mit Ultraschall behandeltem Harvest – SWS: sideward scatter – PMT: photo multiplier

Probe	Konzentration	Analysen-Volumen	Pump-Geschwindigkeit	Trigger Level (SWS: 60)	PMT-Levels
Harvest	2.5E3 p/μl	36μl	1.1μl/sec	50mV	FL Yellow: 85 FL Orange: 90 FL Red: 85 FL Green: 85
Harvest washed	2.3E3 p/μl	32μl			
Sonotrode	3.6E3 p/μl				
Sonotrode washed	3.3E3 p/μl				

Zellbindungs- und Internalisierungsversuche

Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften, die Hydrophobine aufweisen, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass diese mit Fluoreszenz-Tag fusionierten Proteine in der Lage sein könnten, an Zellen zu binden oder auch in die Zelle internalisiert zu werden. Ob diese Bindung spezifisch oder unabhängig von der Art der Zellen erfolgt, wäre für eine zukünftige Anwendung im zielgerichteten Drug Delivery essenziell zu wissen. Zur Klärung dieser Frage wurden mehrere Versuche gestartet, die in den folgenden Unterkapiteln näher beschrieben sind.

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Zelllinien verwendet: Caco-2 (Colon-Karzinomzellen) und SvHuc (mit Simian-Virus infizierte humane Uroepithelzellen).

Die Subkultivierung der Zellen und anschließende Züchtung der Monolayer wurde von Diplomstudenten der Pharmazeutischen Technologie (Universität Wien) durchgeführt. Kurz gefasst wurden immortalisierte humane Uroepithelzellen (SvHuc) und Caco-2-Zellen für die Subkultur aus einer Flasche mit bereits bestehender Gewebekultur steril entnommen und nach einem Wasch- und einem Zentrifugationsschritt in passenden Wachstumsmedien bei 37°C und 5% CO₂/95% Luftatmosphäre) inkubiert. Ham's Nutrient Mixture (Gibco Life Technologies, CA, USA) wurde als Medium für SvHuc-Zellen, RPMI für Caco-2-Zellen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in 75cm²-Gewebekulturflaschen, in denen 10ml Medium mit 50µl Zellsuspension versetzt wurden.

Für die Züchtung der Zellrasen in 96-well-Mikrotiterplatten wurden in jedes Well 160µl der auf eine bestimmte Zellzahl eingestellten Zellsuspension pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend 96-120h bei 37°C (5% CO₂/95% Luftatmosphäre) inkubiert, um einen konfluenten (größtenteils lückenlosen) Monolayer am Mikrotiterplatten-Boden zu erhalten.

Die Passagennummern der für diese Arbeit verwendeten Zellen wurden nicht dokumentiert.

Caco-2-Einzelzellen und -Monolayer

Die Einzelzellsuspension der Caco-Zellen wurde auf eine Konzentration von 4.000.000 Zellen/ml eingestellt, um im FCM (Fluoreszenz-Cytometer) ein gutes Messergebnis mit ausreichender Event-Zahl aber ohne Doppel-Erfassung von Zellen erzielen zu können. Für die Zellbindungs- und Internalisierungs-Versuche wurden mit Äkta aufgereinigte, lyophilisierte, in PBS-resuspendierte Hydrophobin-Proben der Kultivierung PIP_517 (RFP-markiert, Kultivierung wurde von Alex Hämmerli durchgeführt) verwendet. Die Probe wurde auf mehrere Aliquote Zellsuspension aufgeteilt (60µl Zellsuspension + 60µl gelöstes HFB), eine Hälfte der Probenröhrchen bei 4°C und die andere bei 37°C inkubiert und nach 60, 150 und 210 Minuten am FACS vermessen.

Zur Überprüfung der Bindung/Internalisierung am Monolayer wurde lyophilisiertes, in 3.5ml PBS gelöstes, mit rotem Fluoreszenzprotein gekoppeltes Hydrophobin verwendet. Es wurden zwei konfluente Monolayer-Platten nach Inkubation bei 4°C vermessen (t = 30, 60, 90, 120, 150 Minuten). Platte 1 enthält eine Positiv-Kontrolle (fWGA), Platte 2 eine Negativ-Kontrolle (fBSA). In Spalte 6 wurde Hydrophobin ohne Zellen als Referenz vermessen. Der Versuchsaufbau ist in **Tabelle 9** und **Tabelle 10** dargestellt. Die jeweiligen Reihen wurden direkt nach der Inkubation und zwei Mal nach je einem Waschschrift mit PBS (2x 60µl PBS) vermessen.

Die Wellenlängen für die Messung der Fluoreszenz sind in **Tabelle 8** aufgelistet.

Sowohl für die Einzelzellsuspensions-Messungen als auch die der Monolayer wurde fWGA (wheat germ agglutinin, ein fluoreszierendes Lectin) als Positiv-Kontrolle (bindet an Caco-2/SvHuc-Zellen) und fBSA (fluoreszierendes bovines Serumalbumin) als Negativ-Kontrolle (bindet nicht an Zellen) eingesetzt. Die Konzentration der beiden Kontrollen wurde auf 125pmol/ml eingestellt.

Tabelle 8 - Wellenlängen für die Messung der Fluoreszenzwerte des Caco-2-Monolayers

Protein	Exzitations-/Emissions-Wellenlänge [nm]	Gain
HFB-RFP	588/620	100
fWGA	498/518	50
fBSA		

Tabelle 9 - Versuchsanordnung für Caco-2-Monolayer – Jeweils die ersten drei Wells wurden mit Hydrophobin, die nächsten drei mit der Positiv-Kontrolle fWGA und die letzten beiden mit PBS (als Referenz ohne Fluoreszenz) befüllt und nach den jeweiligen Inkubationszeiten vermessen.

Platte 1, 4°C	Zeit [min]					150 (ohne Zellen)
	30	60	90	120	150	
	1	2	3	4	5	6
A	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP
B	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP
C	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP
D	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
E	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
F	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
G	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz
H	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz

Tabelle 10 - Versuchsanordnung für Caco-2-Monolayer – Jeweils die ersten drei Wells wurden mit Hydrophobin, die nächsten drei mit der Negativ-Kontrolle fBSA und die letzten beiden mit PBS (als Referenz ohne Fluoreszenz) befüllt und nach den jeweiligen Inkubationszeiten vermessen.

Platte 2, 4°C	Zeit [min]					150 (ohne Zellen)
	30	60	90	120	150	
	1	2	3	4	5	6
A	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP
B	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP
C	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-RFP
D	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
E	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
F	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
G	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz
H	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz	Referenz

SvHuc-Einzelzellen und -Monolayer

Mit der Einzellsuspension der SvHuc-Zellen wurde genauso verfahren, wie mit den Caco-2-Zellen (siehe **Caco-2-Einzelzellen und -Monolayer**). Die Messungen wurden für diesen Versuch nach 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten mit dem FCM durchgeführt.

Der Versuch am SvHuc-Monolayer wurde mit Äkta-aufgereinigtem, lyophilisiertem, in PBS resuspendiertem Hydrophobin aus den Kultivierungen PIP_514 (GFP-markiert) und PIP_517 (RFP-markiert) auf zwei verschiedenen Platten durchgeführt, die bei 4°C bzw. 37°C inkubiert wurden. Der Versuchsaufbau ist **Tabelle 12** und **Tabelle 13** zu entnehmen. Die Fluoreszenz-Messungen wurden direkt nach der Inkubation und jeweils nach einem Waschschrift (2x 60µl PBS/well) durchgeführt, die angewendeten Wellenlängen sind in **Tabelle 11** ersichtlich. Die Messung erfolgte mit Referenz-Werten (Wells mit PBS, ohne Hydrophobin) und ohne Positiv-/Negativ-Kontrolle.

Tabelle 11 - Wellenlängen für die Messung der Fluoreszenzwerte des SvHuc-Monolayers

Protein	Exzitations-/Emissions-Wellenlänge [nm]	Gain
HFB-RFP	588/620	80
HFB-GFP	408/511	

Tabelle 12 - Versuchsanordnung für SvHuc-Monolayer – Sechs Messungen wurden pro Zeitpunkt für RFP- und GFP-markiertes Hydrophobin durchgeführt, als Referenz dienten zwei Werte, bei denen PBS auf den Zellen statt Hydrophobin vermessen wurde.

Platte 1, 4°C	Zeit [min]	60	120	60	120
		1	3	4	6
A		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
B		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
C		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
D		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
E		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
F		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
G		Referenz	Referenz	Referenz	Referenz
H		Referenz	Referenz	Referenz	Referenz

Tabelle 13 - Versuchsanordnung für SvHuc-Monolayer - Sechs Messungen wurden pro Zeitpunkt für RFP- und GFP-markiertes Hydrophobin durchgeführt, als Referenz dienten zwei Werte, bei denen PBS auf den Zellen statt Hydrophobin vermessen wurde.

Platte 2, 37°C	Zeit [min]	60	120	60	120
		1	3	4	6
A		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
B		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
C		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
D		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
E		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
F		HFB-RFP	HFB-RFP	HFB-GFP	HFB-GFP
G		Referenz	Referenz	Referenz	Referenz
H		Referenz	Referenz	Referenz	Referenz

Resultate und Diskussion

Resultate Kultivierungen

Tabelle 14 - Tabelle nach Vorlage Looser et al.³⁵ - Berechnungen der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit, des Yields (Ausbeute) und des Substratverbrauchs aller durchgeführten Kultivierungen für die Substrate Methanol und Glycerol und die aus jeder Kultivierung resultierenden Produkte – durchführende Personen: teveresab: Sabrina Tevere⁴³, uebelkat: Katharina Übelhör, BA students: ZHAW Studenten im Rahmen des Semester-Praktikums

	Methanol			Glycerol			Produkt	Date, Operator
	μ_{max} [h^{-1}]	$Y_{x/s}$ [g/g]	m_s [g/g/h]	μ_{max} [h^{-1}]	$Y_{x/s}$ [g/g]	m_s [g/g/h]		
Mut ⁺	0,017-0,146	0,132-0,250	NA	0,152-0,236	0,301-0,648	NA	GFP (PIP_491-498, 502)	August 2018/teveresab
Mut ^S	NA	NA	NA	0,060-0,282	0,496-0,838	NA	HFB (w/o fluorescence marker, PIP_499-501)	August 2018/teveresab
	0,015 ^A	0,510 ^A	0,028	0,170	0,520	0,120	HFB-RFP (PIP_503) ¹	September 2018/uebelkat
	0,014	0,240	0,025	0,177	0,500	0,124	HFB-GFP (PIP_504)	September 2018/uebelkat
	0,011	0,318	0,033	0,144	0,550	0,093	HFB-RFP (PIP_506) ^{2, 3, 4}	Oktober 2018/uebelkat
	0,012	0,327	0,040	0,160	0,550	0,093	HFB-GFP (PIP_508)	Oktober 2018/uebelkat
	0,020	NA	NA	0,300	0,587	NA	HFB w/o fluorescence marker (PIP_510_1)	November 2018/BA Studenten
	0,007	NA	0,026	0,051	0,640	NA	HFB-RFP (PIP_511_1)	November 2018/BA Studenten
	0,027	NA	NA	0,100	0,078	NA	HFB w/o fluorescence marker (PIP_512)	Dezember 2018/BA Studenten
	0,023	0,530	NA	Für diese Kultivierung wurde Glucose verwendet, daher gibt es keine Daten zu μ_{max} (Glycerol).			HFB-GFP (PIP_513)	Dezember 2018/BA Studenten
	NA	NA	NA	0,152	0,520	0,096	HFB-GFP (PIP_514_1) ^{1, 5, 6, 7}	Jänner 2019/uebelkat

^A calculated from OD_{offline} (optical density) instead of cell dry weight (CDW), divided by 2, NA – not available

Versuche: ¹ Behandlung mit Ultraschall, ² Ultrafiltration, ³ His Mag Sepharose Ni Säule, ⁴ ATPS, ⁵ Lyticase, ⁶ Kugelmühle, ⁷ Einzelzellsuspension und Monolayer

Resultate Kultivierung PIP_503

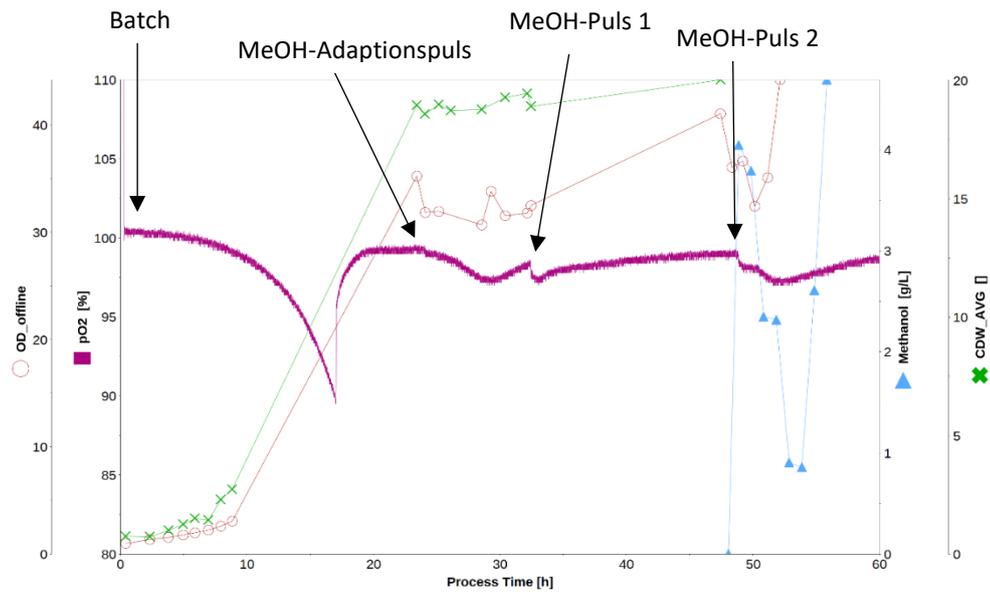


Abbildung 17 - Resultat der Kultivierung PIP_503 (RFP-markiert) – effektive Laufzeit des Prozesses: 60h, Wachstum mit Glycerol (Batch). Der Methanol-Adaptionspuls (0.5%) und zwei weitere Methanol-Pulse (0.5%) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Diese Kultivierung diente zur Charakterisierung der *P. pastoris*-Stämme, das sehr langsame Wachstum weist auf *Mut^S* hin. Nach dem dritten MeOH-Puls akkumuliert MeOH, woraufhin die Kultivierung abgebrochen wurde.

Resultate Kultivierung PIP_504

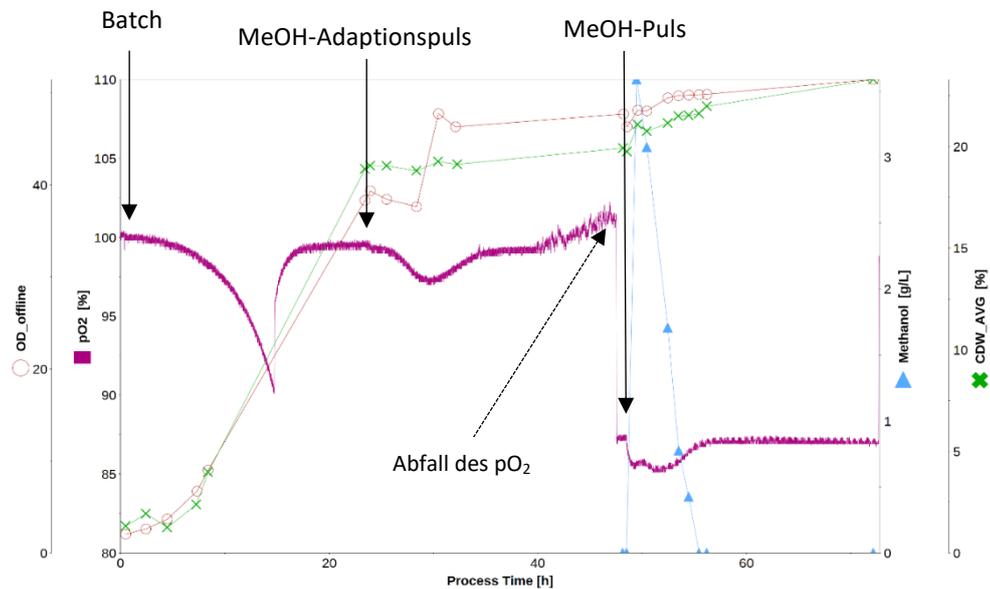


Abbildung 18 - Resultat der Kultivierung PIP_504 (GFP-markiert) – effektive Laufzeit des Prozesses: 67h - Wachstum mit Glycerol (Batch), der Methanol-Adaptionspuls (0.5%) und ein weiterer Methanol-Puls (0.5%) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Diese Kultivierung diente zur Charakterisierung der *P. pastoris*-Stämme, das sehr langsame Wachstum weist auf *Mut^S* hin. Aufgrund des verstopften Abluftfilters, wurde dieser entfernt, was wiederum einen Abfall des pO_2 verursachte (mit gestricheltem Pfeil gekennzeichnet).

Resultate Kultivierung PIP_506

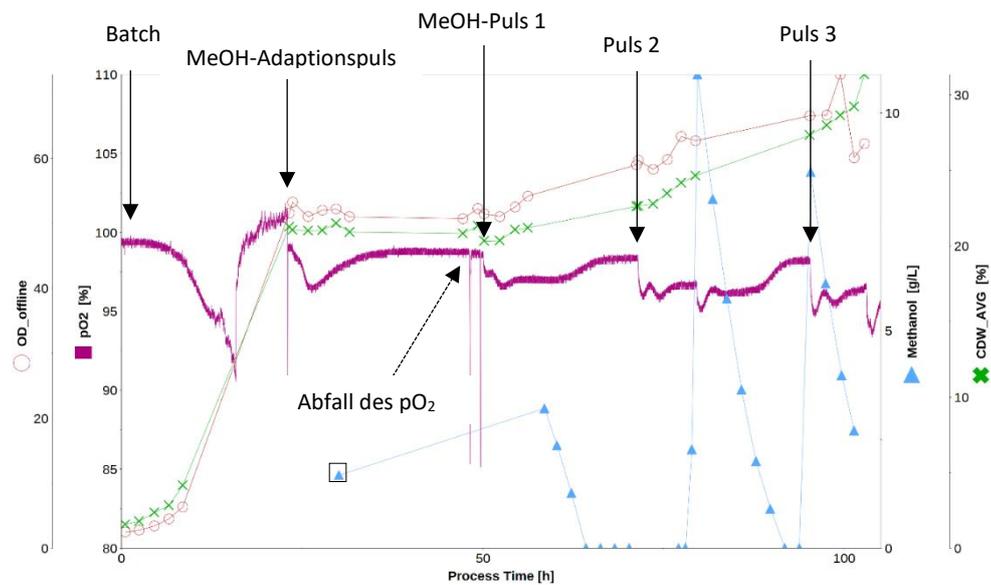


Abbildung 19 - Resultat der Kultivierung PIP_506 (RFP-markiert) - effektive Laufzeit: 115h – Ein Methanol-Feed war aufgrund eines Kommunikationsproblems der Software mit den Feed-Waagen nicht möglich, deshalb wurden Pulse gesetzt. Adaptionspuls: 0.5%, Puls 1: 1%, Puls 2: 1%, Puls 3: ca. 2% - Um die Kommunikation zwischen Software und den Waagen wieder herzustellen wurde an diesem Zeitpunkt das ABS kurzzeitig ausgeschaltet (mit gestricheltem Pfeil markiert). Die mit □ markierte MeOH-Messung ist zu vernachlässigen, da diese bei einem Test in die Grafik eingefügt wurde.

Resultate Kultivierung PIP_508

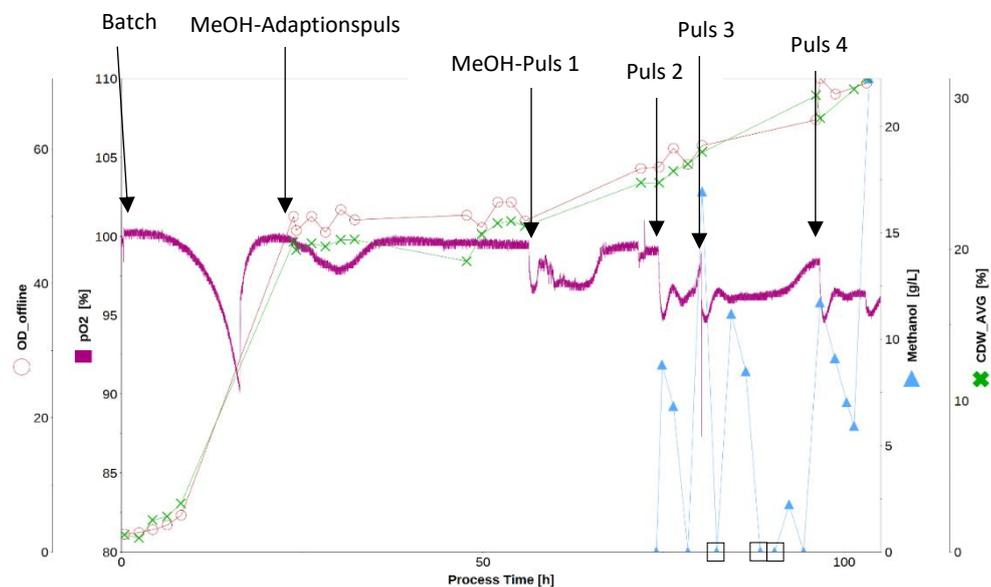


Abbildung 20 - Resultat der Kultivierung PIP_508 (GFP-markiert) – effektive Laufzeit des Prozesses: 123h – Ein Methanol-Feed war nicht möglich, da ein Kommunikationsfehler der Software mit den Feed-Waagen auftrat. Der Feed wurde aus diesem Grund gepulst: Puls 1 = 1%, Puls 2 = 1.5%, Puls 3 = 1%, Puls 4 = 1.7% - Adaptionspuls: 0.5%. Fehlerhafte Numera-Messungen sind mit □ markiert.

Resultate Kultivierung PIP_510

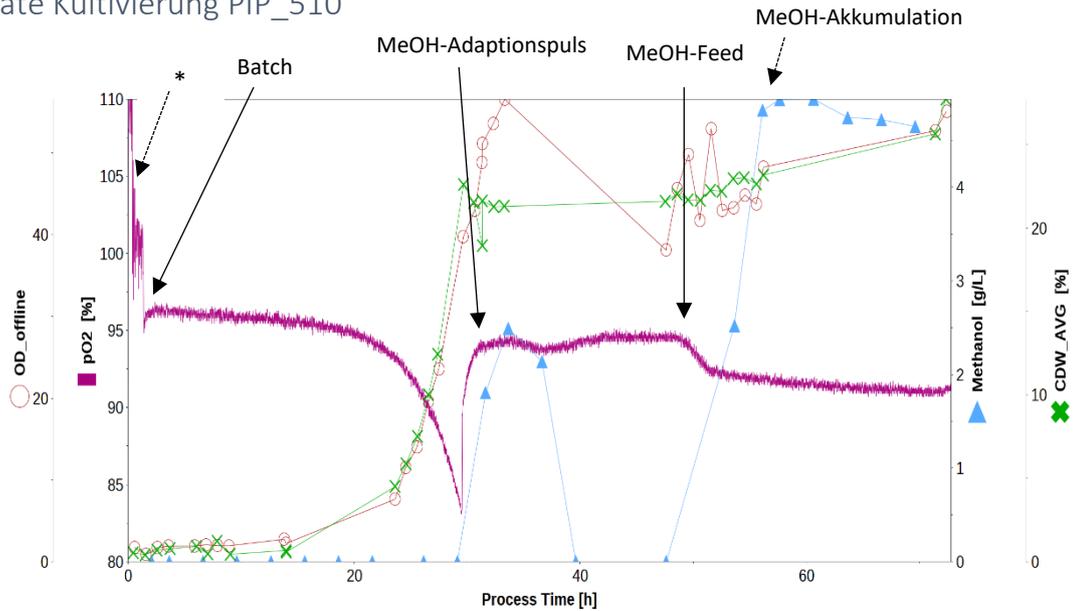


Abbildung 21 – Resultat der Kultivierung PIP_510 (ohne Fluoreszenzmarker) – effektive Laufzeit: 72h – *: Das ABS hat zu Beginn die Temperatur auf 70°C erhöht, woraufhin die Zellen abstarben, ein erneut hergestelltes Inokulum wurde über die toten Zellen inokuliert und die Kultivierung weitergeführt. Um die Substrat-Umstellung zu beschleunigen wurde ein 0.25%iger Methanol-Puls zugegeben. Während des Feeds kam es zur Akkumulation von MeOH, woraufhin die Kultivierung abgebrochen wurde.

Resultate Kultivierung PIP_511

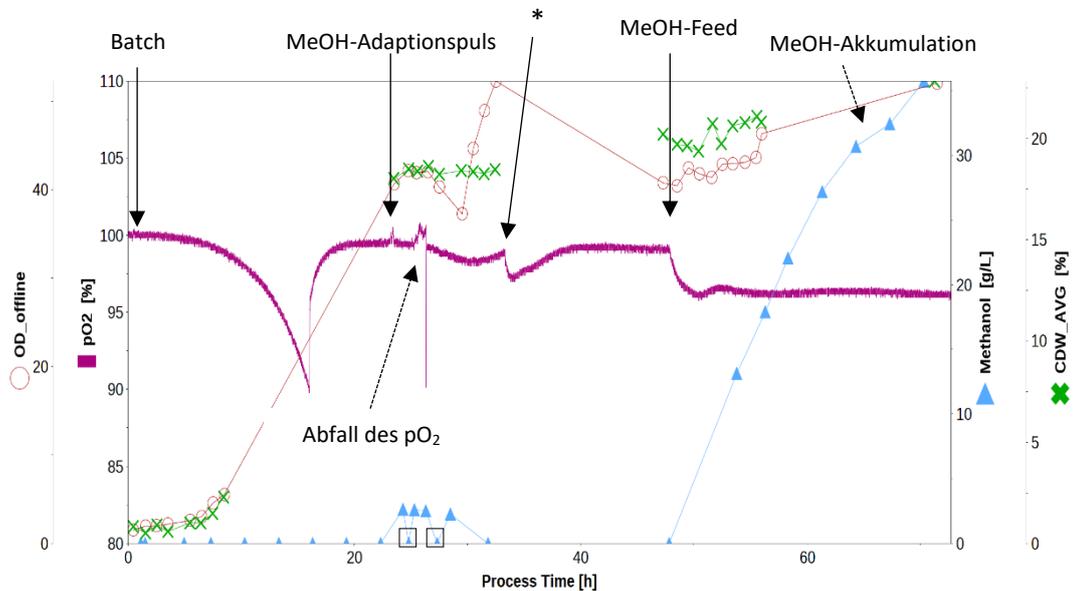


Abbildung 22 - Resultat der Kultivierung von PIP_511 (RFP-markiert) – effektive Laufzeit: 71h – *: Beim Anschließen des Schlauchs des Methanol-Feeds, gelang frühzeitig MeOH in den Reaktor. Um die Substrat-Umstellung zu beschleunigen wurde ein 0.25%iger Methanol-Puls zugegeben. Während des Feeds kam es zu einer starken Akkumulation von MeOH, die *P. pastoris*-Zellen starben aber nicht ab. Durch Entfernen des verstopften Abluft-Filters kam es zu einem kurzzeitigen pO₂-Abfall. Fehler bei der HPLC-Messung der Methanol-Konzentration sind mit □ markiert.

Resultate Kultivierung PIP_512

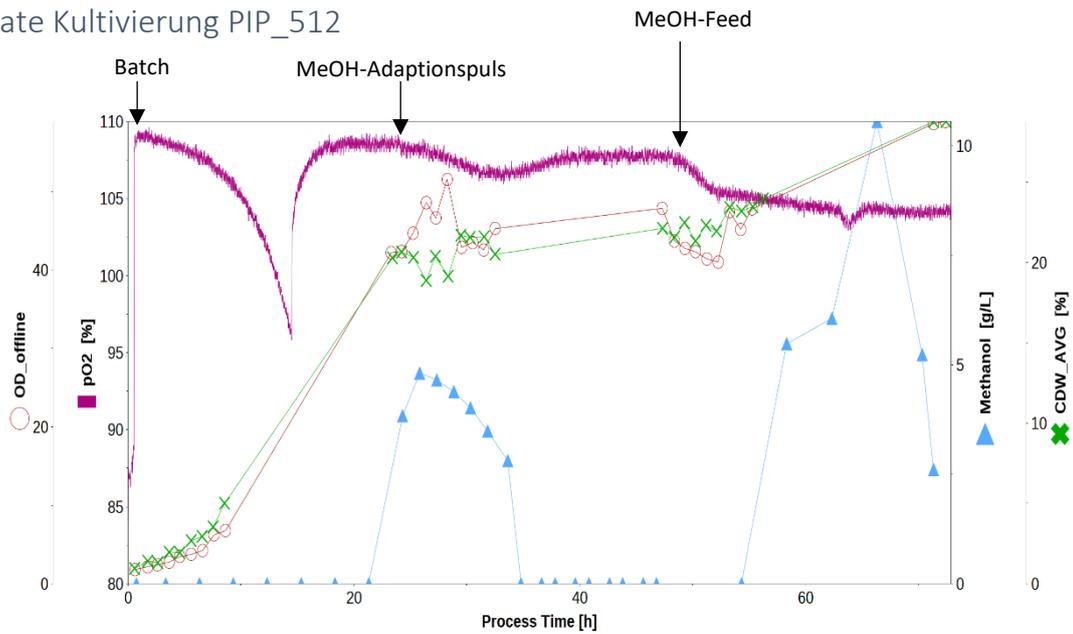


Abbildung 23 - Resultat der Kultivierung PIP_512 (ohne Fluoreszenzmarker) – effektive Laufzeit: 72h – Die pO_2 -Sonde wurde vor dem Start der Kultivierung nicht kalibriert, weshalb die pO_2 -Kurve höher liegt, als in anderen Grafiken. Die Regenerationszeit nach dem 0.5%igen MeOH-Adaptionspuls war deutlich länger, als im Vergleich zum parallel laufenden Prozess PIP_513 (13h).

Resultate Kultivierung PIP_513

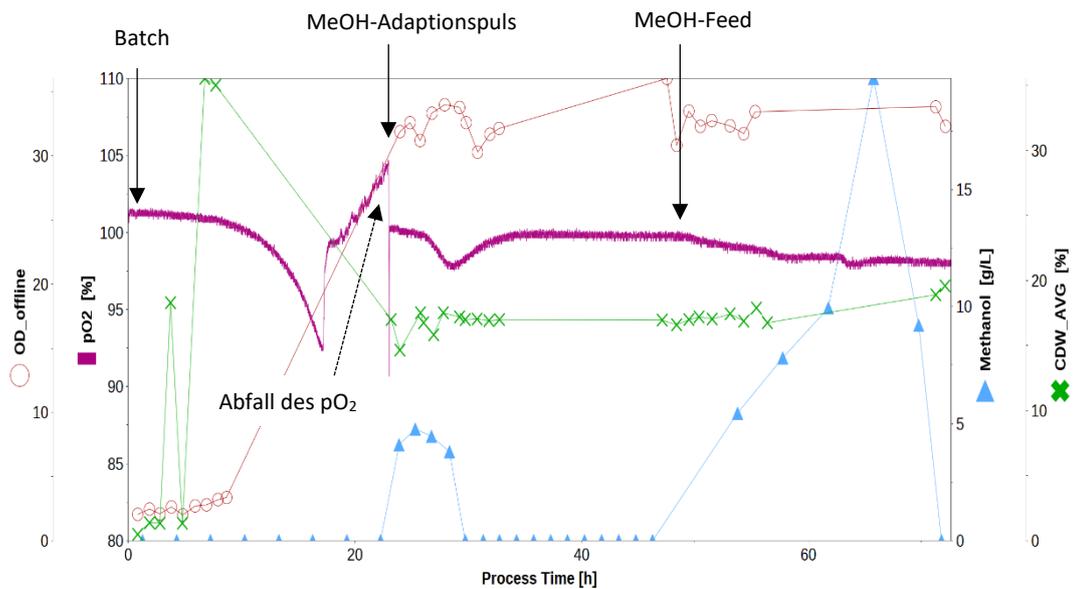


Abbildung 24 - Resultat der Kultivierung PIP_514 (RFP-markiert) – effektive Laufzeit: 72h – Anstatt Glycerol wurde in diesem Prozess Glucose zur Durchführung des Batches verwendet. Durch Entfernen des verstopften Abluft-Filters kam es zu einem kurzzeitigen pO_2 -Abfall. Die Regenerationszeit nach dem 0.5%igen MeOH-Adaptionspuls war deutlich kürzer, als im Vergleich zum parallel laufenden Prozess PIP_512 (6h).

Resultate Kultivierung PIP_514

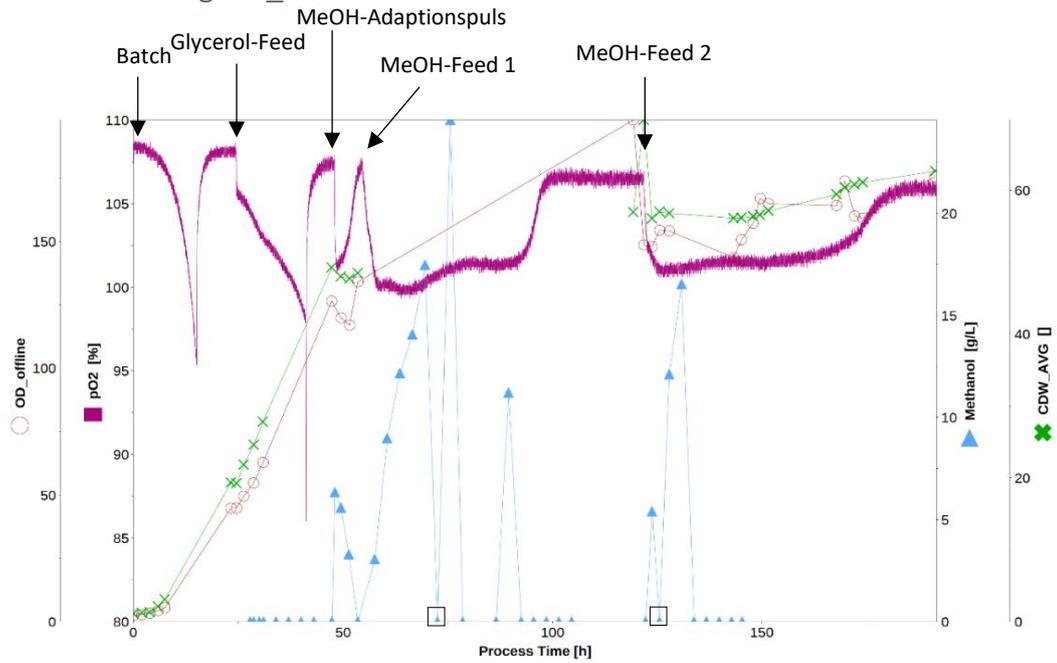


Abbildung 25 - Resultat der Kultivierung PIP_514_1 (GFP-markiert) – effektive Laufzeit: 200h – Zur Erhöhung der Zellzahl wurde vor dem ersten Adaptionpuls (0.5%) ein Glycerol-Feed zugegeben. Für die Zugabe von Methanol wurde je eine Feed-Flasche mit V=750ml am Reaktor angebracht. Die pO₂-Sonde wurde zu Beginn der Kultivierung nicht kalibriert, deshalb wurde der Prozess mit einem leichten Offset aufgezeichnet. Fehlerhafte Numera-Messungen sind mit □ gekennzeichnet.

Visuelle Resultate

Schon bevor Messungen mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt wurden, konnten durch visuelle Beobachtungen Rückschlüsse auf den Erfolg der Hydrophobin-Produktion gezogen werden. Ein Hinweis auf das Vorliegen von Hydrophobin im Harvest könnte die jeweils zum Fluoreszenzmarker passende Färbung der Biomasse sein, die bei mit RFP-markiertem HFB um einiges stärker sichtbar war, als bei GFP-markiertem. In **Abbildung 26** sind die Biomasse und der abzentrifugierte Überstand von Kultivierung PIP_506 zu sehen.

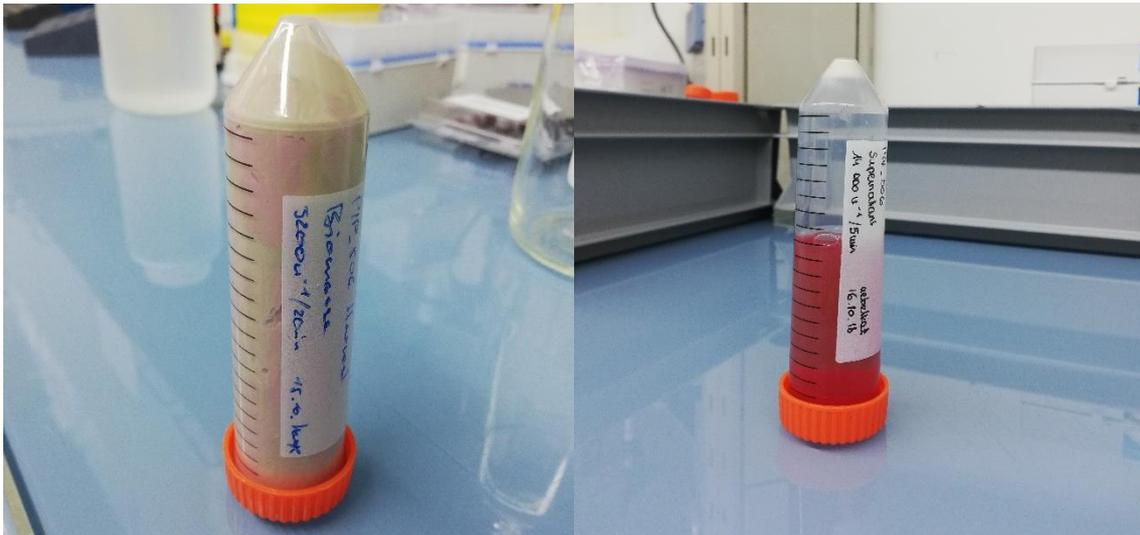


Abbildung 26 - Biomasse und abzentrifugierter Überstand von PIP_506 – im Überstand konnte eine deutliche Farbänderung von Beginn der Kultivierung zu deren Ende festgestellt werden – dies ist ein Hinweis auf das Vorliegen von sekretiertem RFP-markiertem HFB – ein Vergleichsbild von GFP-markiertem HFB und von Beginn der Kultivierung ist nicht vorhanden

Resultate Isolierung von Hydrophobin

Für die Fluoreszenzwerte gilt, dass die gemessenen Werte nicht als absolut anzusehen sind. Durch äußere Faktoren (Temperatur während der Messung, Aufbewahrungstemperatur/-zeit etc.) und Quenching (Fluoreszenzlöschung: Moleküle übertragen gegenseitig Energie, was zu geringeren oder höheren Fluoreszenzwerten führen kann) können diese Werte beeinflusst werden.

Lyticase

Durch Zugabe von Lyticase zur Harvest Biomasse konnte eine höhere Fluoreszenz im Überstand erzielt werden, was bedeutet, dass mehr Hydrophobin aus den Zellen isoliert werden konnte. Unter dem Mikroskop konnte festgestellt werden, dass einige Zellen nach dem Verdau mit Lyticase morphologische Veränderungen aufwiesen und keine Fluoreszenz mehr zeigten. Einige Hefezellen konnten mit dieser Methode nicht zerstört werden und weisen deshalb in ihren Vakuolen noch Fluoreszenz auf, was darauf hinweist, dass das Hydrophobin nicht komplett von den Zellen getrennt werden konnte.

Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass die Probe nach der Behandlung einen weiteren Aufreinigungsschritt benötigt, um das Hydrophobin rein zu isolieren, da noch Zellbestandteile, andere Proteine und Lyticase-Reste in der Probe enthalten sind.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung sind in **Abbildung 27** bildlich dargestellt.

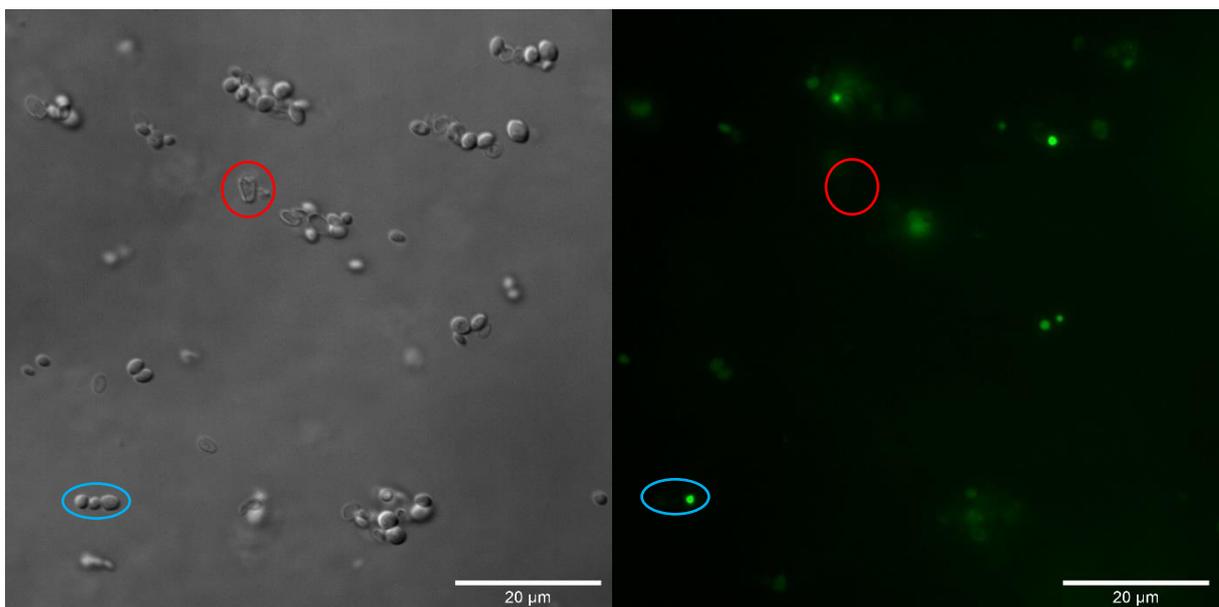


Abbildung 27 – *P. pastoris* (PIP_514) nach Behandlung mit Lyticase – Suspension – links (DIC-Kanal): Einige Zellen (rot umrandet, rund) zeigen morphologische Veränderungen im Vergleich zu intakten Hefezellen (blau, oval). rechts (FITC-Kanal): Durch Lyticase zerstörte Zellen zeigen keine Fluoreszenz mehr (rot), manche der noch intakten Hefezellen weisen noch Fluoreszenz auf (blau).

Kugelmühle

Vorversuche 1-3 zum Zellaufschluss wurden mit Kultivierung PIP_503 durchgeführt, die trotz Induktion mit Methanol keine Fluoreszenz aufwies. Die Untersuchungen mit dem Lichtmikroskop führten nicht zum erwünschten Ergebnis, da die Zellen weiterhin intakte Zellwände aufwiesen.

Durch die Behandlung der Zellen von Kultivierung PIP_514 mit der Kugelmühle konnte zwar eine erhöhte Fluoreszenz im Überstand erreicht werden, an den meisten Zellen konnten unter dem Mikroskop aber keine gravierenden Veränderungen festgestellt werden, nur sehr wenige Hefezellen wiesen eine veränderte Morphologie auf. Viele der Zellen enthielten trotz Behandlung mit der Kugelmühle noch fluoreszierende Bestandteile, es konnte also nicht die gesamte Fluoreszenz/die gesamte Menge an Hydrophobin aus den Zellen freigesetzt werden. Das Bild des DIC-Kanals kann vermutet werden, dass die sichtbar gewordenen Aggregate zwischen den Hefezellen zumindest teilweise zusammengelagertes Hydrophobin darstellen. Diese Vermutung wird durch das mikroskopische Bild im FITC-Kanal bekräftigt, da dieselbe Region eine grüne Fluoreszenz aufweist.

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung sind in **Abbildung 28** zu sehen.

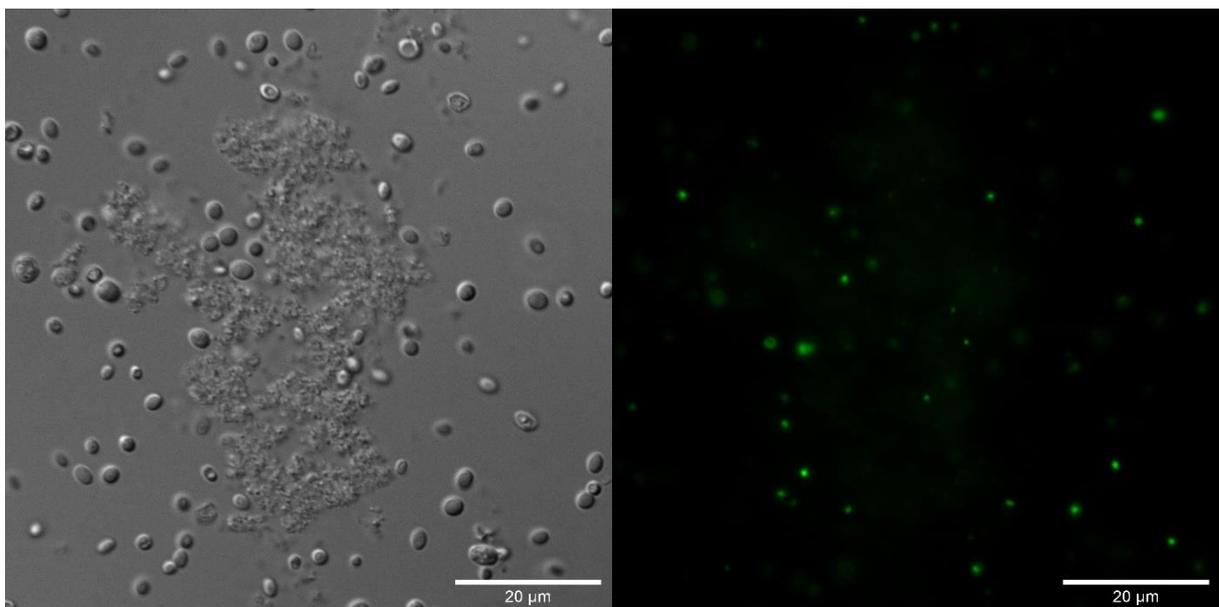


Abbildung 28 – *P. pastoris* (PIP_514) nach Behandlung in der Kugelmühle – Suspension – links (DIC-Kanal): Die meisten Hefezellen weisen eine noch intakte Zellwand auf, die Ansammlung von kleineren Molekülen stellt möglicherweise ein Aggregat von Hydrophobinen dar. **rechts (FITC-Kanal):** Die meisten Hefezellen weisen trotz der Behandlung eine Fluoreszenz auf und das Hydrophobin-Aggregat fluoresziert ebenfalls.

Behandlung mit Ultraschall

Trotz Zugabe von Methanol zu Kultivierung PIP_503 wurde bei dieser kaum Hydrophobin produziert. Somit kann die Zerstörung der Zellen nicht über die Fluoreszenz gemessen, sondern nur über Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop festgestellt werden.

Bevor weitere Versuche mit der Sonotrode durchgeführt wurden, wurde die Spitze aufgrund von Abnutzungsschäden ausgetauscht, was bedeutet, dass die Ergebnisse von Kultivierung PIP_503 nicht so aussagekräftig sind, wie die von PIP_514, da nicht erhoben wurde, in welchem Ausmaß die alte Spitze der Sonotrode noch Energie übertragen konnte.

Durch die Behandlung mit der Sonotrode mit 10W konnte eine Steigerung der Fluoreszenz im Überstand erreicht werden, auch nach Wechsel auf 75W änderte sich das Ergebnis nicht signifikant. Mit der Sonotrode mit 1000W konnte eine geringe Steigerung der Fluoreszenz erreicht werden.

Die Ergebnisse der Behandlung mittels 1000W Sonotrode sind in **Abbildung 29** zu sehen, die der 160W Sonotrode sind gemeinsam mit den gemessenen Werten der Kugelmühle und Lyticase in **Abbildung 30** zusammengefasst.

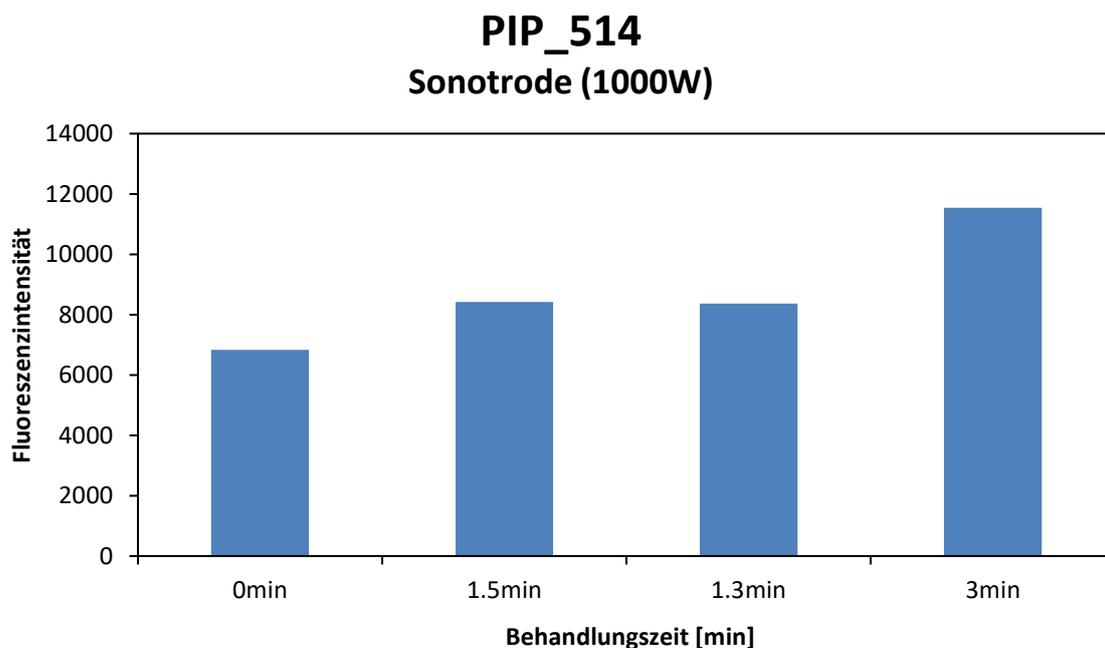


Abbildung 29 - Behandlung von PIP_514 Biomassen-Suspension mit einer 1000W Sonotrode – Von vier verschiedenen Proben wurde die Fluoreszenz des jeweiligen Überstands vermessen, nachdem sie mittels Sonotrode behandelt wurden. 0min = un behandelter Harvest-Überstand (Referenz) – Ex/Em = 408/512nm, Gain = 80, n=1

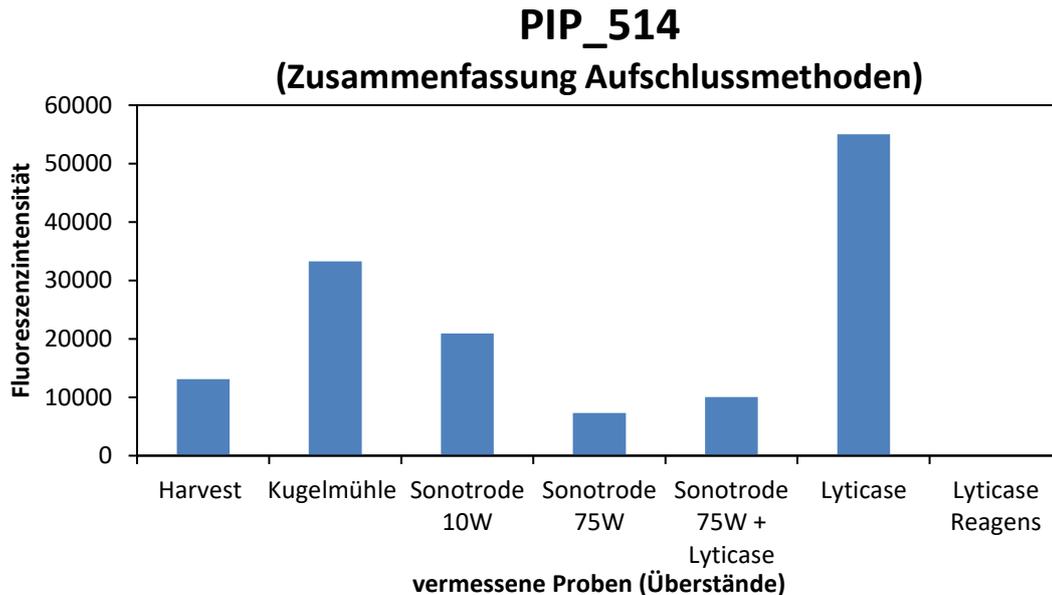


Abbildung 30 - Ergebnisse der Fluoreszenzmessung von Lyticase, Kugelmühle und Sonotrode – Für den Wert der Lyticase wurden der Wert von Harvest Überstand und dem nach der Behandlung des Pellets mit Lyticase und anschließender Zentrifugation gemessenen Lyticase-Werts (nicht im Diagramm enthalten) zusammengezählt. Bei allen anderen Proben wurde nur der Überstand nach der jeweiligen Behandlung und Zentrifugation vermessen. Ex/Em = 408/512nm, Gain = 80, n=1

Messung der Partikelgröße von PIP_514 mittels Flow Cytometer (FCM)

Wie in **Abbildung 31** zu erkennen, konnte durch die Behandlung der Biomasse von PIP_514 mittels Sonotrode die Zerstörung der Hefezellen erreicht werden. Sichtbar wird dieses Ergebnis anhand der Partikelrate, die durch die Verschiebung der Population auf der x-Achse und y-Achse und anhand der Partikel-Zählrate zu erkennen ist. Die Partikel-Zählrate betrug bei der Vermessung der Harvest-Biomasse 2.400 Partikel/ μl , bei der mit Sonotrode behandelten Suspension 3.450 Partikel/ μl . Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die Zerstörung der Hefezellen zum Teil erfolgreich war, einige Zellen sind trotz starker Energieeinwirkung noch intakt. Weiters konnte ein Anstieg des Hintergrundsignals bei den mit der Sonotrode behandelten Proben beobachtet werden.

Die Messung wurde ohne Gates durchgeführt und nur der direkte Zahlenwert abgelesen.

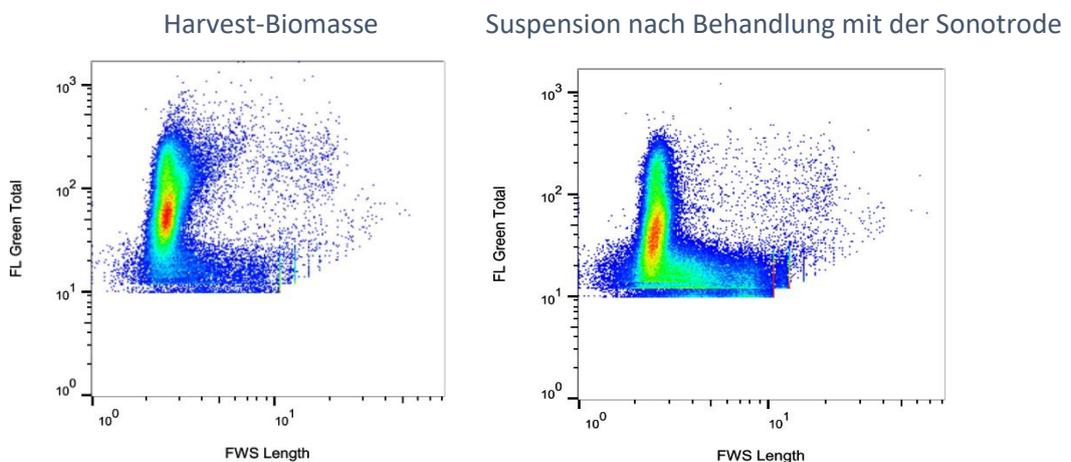


Abbildung 31 - Ergebnisse des FCM – Die Partikelrate hat sich nach unten verschoben, was auf kleinere Partikel und somit die erfolgreiche Zerstörung der Partikel hinweist.

Ultrafiltration

Mittels Ultrafiltration (50 000 MWCO) konnte eine erhöhte Fluoreszenzintensität des im Filter verbliebenen Überstands (Retentat) erreicht werden. Ein Teil der Hydrophobine scheint aber trotzdem den Filter zu passieren, da auch in den Permeaten eine Fluoreszenz festgestellt werden konnte. Die Aufreinigung scheint also mit diesem Verfahren zu funktionieren, man muss aber beachten, dass nur etwa 2ml an Flüssigkeit im Filter zurückbleiben, was darauf hinweist, dass die Fluoreszenz aufgrund einer Aufkonzentrierung ansteigt. In **Abbildung 32** ist die Farbe des Retentats deutlich erkennbar, die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung sind in **Abbildung 33** zusammengefasst.

Ein großes Problem dieser Aufreinigung ist, dass sie ein sehr zeitaufwändiges und teures Verfahren darstellt und für Prozesse mit einer großen Menge an Harvest Biomasse nicht geeignet ist.



Abbildung 32 – Retentat im 50 000 MWCO Filter nach Filtration von Überstand aus Kultivierung PIP_506 – Eine deutliche Färbung, korrespondierend zum Fluoreszenzmarker, ist zu erkennen.

PIP_506 Isolierung von Hydrophobin

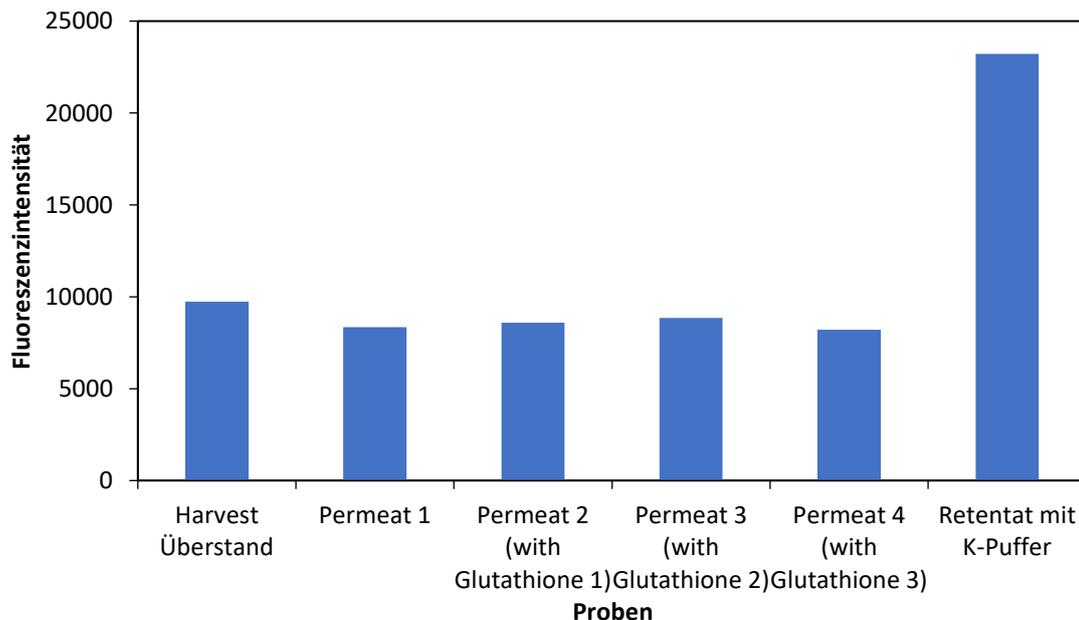


Abbildung 33 - Isolierung von HFB mittels Ultrafiltration – Die Proben wurden im Vergleich zum Harvest Überstand vermessen. Die hohen Fluoreszenzwerte entstehen hauptsächlich durch die Aufkonzentrierung der Probe. Ex/Em=588/612nm, Gain = 30, n=1

His Mag Sepharose™ Ni-Säule

Die Aufreinigung über die His Mag Sepharose™ Nickel-Säule lieferte keine aussagekräftigen Ergebnisse, ob das für dieses Projekt kultivierte HFB gar kein His-Tag aufweist oder das His-Tag nicht gebunden hat. An den Messergebnissen in **Abbildung 34** ist ersichtlich, dass in keinem der Schritte eine signifikante Fluoreszenz gemessen werden konnte.

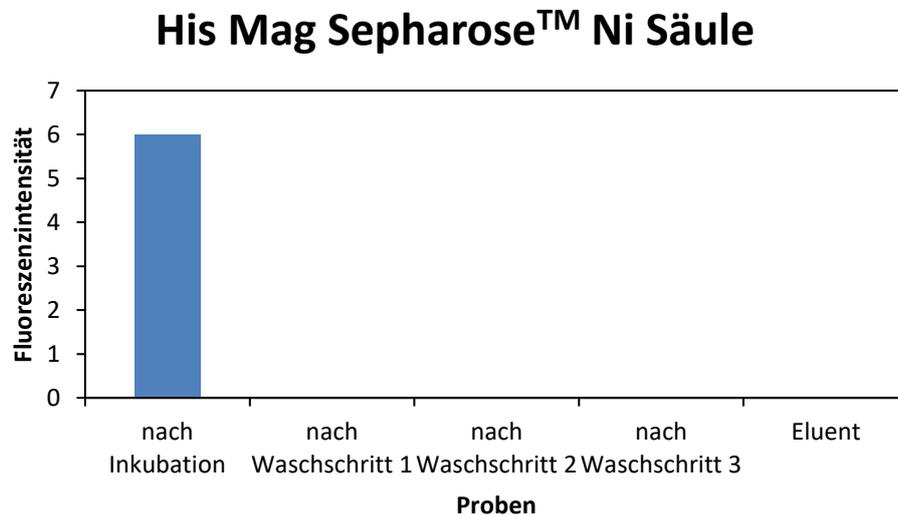


Abbildung 34 - Aufreinigung mittels His Mag Sepharose™ Ni-Säule - Es ist in diesem Diagramm deutlich zu erkennen, dass sowohl vor, als auch nach dem ersten Waschschrift keine signifikante Fluoreszenz gemessen werden konnte, was darauf hinweist, dass das kultivierte Hydrophobin entweder kein His-Tag aufweist, oder nicht an die Säule bindet. Als Referenz fehlt in dieser Grafik die Messung des Harvest Überstands. Ex/Em = 588/612nm, Gain = 50, n=1

ATPS – Aqueous Two Phase System

Die gemessenen Fluoreszenzwerte lassen die Interpretation zu, dass durch wiederholte Extraktion mittels ATPS (Aqueous Two Phase System) eine größere Menge an Hydrophobin aufgereinigt werden kann als durch eine einfache Extraktion. Allerdings darf man nicht vergessen, dass das Quenching (siehe **Visuelle Resultate**) auch hier eine große Rolle spielt und die Werte nicht als absolut gesehen werden dürfen. Die bei diesem Versuch gemessenen Werte sind in **Abbildung 35** ersichtlich.

Das ATPS stellt eine geeignete Methode zur Hydrophobin-Isolierung dar, bringt aber auch das Problem mit sich, dass bei jedem Aufreinigungsschritt Reste von Triton X-114 oder Isobutanol in den abgetrennten Phasen verbleiben, die das Ergebnis verfälschen können beziehungsweise eine zusätzliche andersartige Aufreinigung erfordern, wenn das Hydrophobin rein isoliert werden soll.

Mittels SDS-PAGE wurden die zuvor am Tecan vermessenen Phasen aufgetrennt und sichtbar gemacht, dass die Probe über das ATPS aufgereinigt werden konnte. Das Ergebnis der SDS-PAGE von Extraktion (1) ist in **Abbildung 36** sichtbar, das Gel von Extraktion (2) ist in der Arbeit nicht enthalten, da die Banden, aufgrund zu langer Lagerung der Gele in Entfärbelösung, nicht mehr zu erkennen waren.

PIP_506 ATPS - wiederholte Extraktion

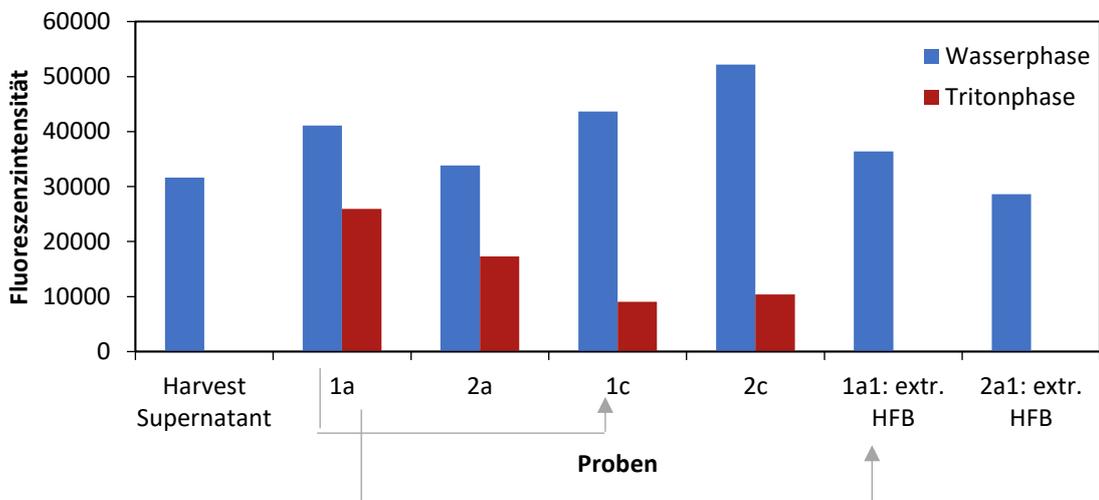


Abbildung 35 - wiederholte Extraktion mittels ATPS (PIP_506) – Es scheint, als ob mittels wiederholter Extraktion ein größerer Anteil an HFB extrahiert werden kann, als wenn die Zugabe von Triton nur einmal erfolgt. Da beim Harvest Supernatant noch kein Triton zugegeben wurde, ist auch kein Messwert für diese Phase vorhanden. Sowohl in jeder Wasserphase, als auch Tritonphase ist ein Teil HFB enthalten, weshalb alle Phasen eine Fluoreszenz aufweisen. Versuch 1 wurde von Beginn an mit 10% Triton versetzt, Versuch 2 im ersten Schritt mit 5%. Das extrahierte HFB befindet sich zum Schluss in der Wasserphase, weshalb für 1a1 und 2a1 keine Messwerte für die Tritonphase vorliegen. Die Pfeile bei Versuch 1 veranschaulichen, mit welcher Phase jeweils weitergearbeitet wurde, für Versuch 2 gilt dasselbe Prinzip. Fluoreszenzwerte für Schritt 1b und 2b fehlen, da keine Messungen durchgeführt wurden. Ex/Em = 588/612, Gain = 101, n=1

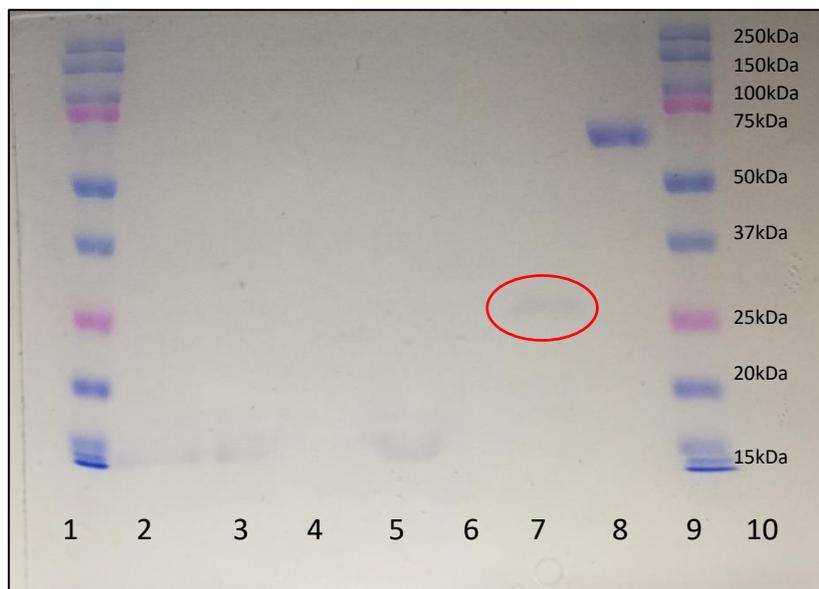


Abbildung 36 - SDS-PAGE: wiederholte Extraktion (1) – In Reihe 1 und 9 ist jeweils der Referenz-Marker sichtbar. Reihen 2-8 wurden wie folgt beladen: 2-Harvest Überstand, 3-Phase 1a (Wasser), 4-Phase 1a (Triton), 5-Phase 1c (Wasser), 6-Phase 1c (Triton), 7-Phase 1d (Wasser), 8-BSA-Standard – Das Gel wurde mit Coomassie-Brilliant Blue eingefärbt und mit einer Entfärbelösung aus 200ml Methanol, 50ml Essigsäure und 800ml Wasser wieder entfärbt. In Tasche 7 ist eine leichte Bande bei 26kDa zu sehen, die auf HFB mit Fluoreszenzmarker hinweisen könnte (roter Kreis). Einstellungen: 300V, 100mA, 45min

Aufreinigung mittels Size-Exclusion Chromatography – Äkta

Die Aufreinigung mittels Size-Exclusion Chromatografie (HiLoad Superdex 75 pg prep. Size exclusion chromatography Säule – Flussrate 1-1.3ml/min) erwies sich als effektivste Methode zur Isolierung von Hydrophobin. Das Scale-Up stellt zwar eine gewisse Hürde dar, da die maximale Probenmenge, die auf die Säule aufgebracht werden kann, 15ml beträgt, trotzdem lässt sich mit dieser Methode Hydrophobin sehr gut von den restlichen, ebenfalls im Überstand enthaltenen Bestandteilen, trennen.

Nach mehreren durchgeführten Prozessen lässt sich sehr gut abschätzen, nach wie vielen Säulenvolumina das gesuchte Protein aufgereinigt ist, und die Methode kann entsprechend angepasst werden. Lässt man zusätzlich ein Standard-Protein (z.B. BSA) mit bekannter Konzentration über die Säule laufen, kann auch auf die Größe des gesuchten Proteins zurückgeschlossen werden. Im Falle der Aufreinigung für PIP_506 und PIP_514 wurde kein Standard verwendet.

Zu beachten ist bei der Aufreinigung von PIP_514, dass für die Detektion in der Methode (in der Software für die Äkta) die falsche Detektionswellenlänge eingegeben wurde (512nm statt 408nm). Da die Fraktionssammlung ab einem bestimmten Zeitpunkt eingestellt war, fiel dieser Fehler nicht ins Gewicht. Für nachfolgende Aufreinigungen wurde die Detektionswellenlänge auf 408nm eingestellt. Die Detektion wurde bei den entsprechenden Wellenlängen (siehe **Verwendete Fluoreszenz-Werte**) durchgeführt. Die Ergebnisse der Aufreinigung durch die Äkta sind in **Abbildung 37** bis **Abbildung 40** dargestellt. Die SDS-Page nach Silberfärbung der Äkta-Fractionen ist in **Abbildung 41** ersichtlich, die ausgewogenen Proteinmengen der jeweiligen lyophilisierten Proben sind in zu sehen. **Tabelle 15** ist zu entnehmen, welche Fraktionen der Äkta-Aufreinigung für die Lyophilisation für die Bestimmung der Proteinmenge herangezogen wurden.

Tabelle 15 – Lyophilisation nach Aufreinigung mittels Äkta – Hier ist ersichtlich, welche Fraktionen lyophilisiert und danach zur Bestimmung der Proteinmenge herangezogen wurden. Die Proteinmenge ergibt sich aus dem Mittelwert zweier Lyophilisate, in manchen Fällen wurde allerdings nur ein Lyophilisat gewogen. Es wurden jeweils die Fraktionen ausgewählt, in denen sich die höchste Proteinkonzentration befand. Von PIP_517 gibt es keine korrespondierende Fraktions- und Fluoreszenzgrafik. Jene für PIP_514 sind in **Abbildung 39** und **Abbildung 40** zu finden. ¹Wenn zwei Fraktionsammel-Platten zum Einsatz kamen, sind die Fraktionen von Platte 2 mit 2.x nummeriert.

Kultivierung	Fraktionsnummern	Proteinmenge [mg/ml]	\bar{X} -Proteinmenge [mg/ml]	Probennummer in der Grafik
PIP_517 (RFP)	6-16	1,0908	1,0908	Abb. 42 – 1
	6-17	2,772	2,772	Abb. 42 – 2
	6-19	1,948	2,591	Abb. 42 – 3
	20-24	0,0643		
PIP_514 (GFP)	6-25	2,104	2,104	Abb. 43 – 1
	1-11	1,579	2,115	Abb. 43 – 2
	12-17	0,536		
PIP_517 (RFP)	10-20	2,121	2,977	Abb. 42 – 4
	21-25	0,856		
PIP_514 (GFP)	3-11	1,579	2,124	Abb. 43 – 3
	12-17	0,545		
	3-1	1,882	2,643	Abb. 43 – 4
	13-17	0,761		
PIP_517 (RFP)	6-14	1,548	2,207	Abb. 42 – 5
	15-19	0,660		
PIP_514 (GFP)	2-10	1,294	1,810	Abb. 43 – 5
	11-16	0,516		
PIP_517 (RFP)	33-40	0,957	1,366	Abb. 42 – 6
	2.1-2.6 ¹	0,409		
	29-38	1,787	2,709	Abb. 42 – 7
	38-2.4 ¹	0,922		
	20-32	1,485	2,030	Abb. 42 – 8
	33-38	0,545		

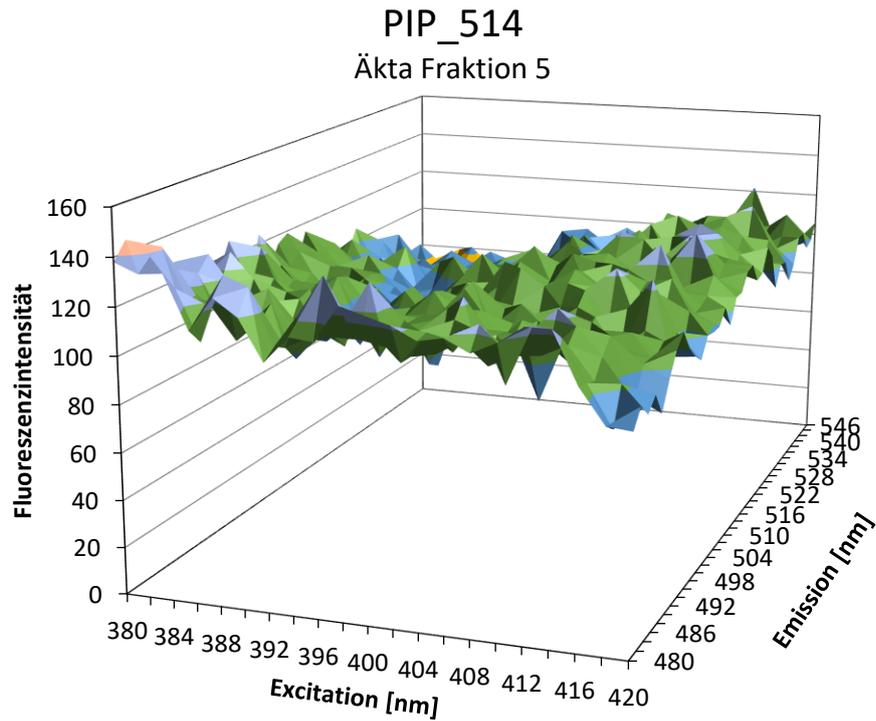


Abbildung 37 - Kultivierung PIP_514 – 3D-Scan von Fraktion 5 aus Aufreinigung mit Äkta – In dieser Fraktion konnte keine Fluoreszenz gemessen werden, es befindet sich also auch kein Hydrophobin in dieser Fraktion. Ex = 380-420nm, Em = 480-550nm, Gain = 80

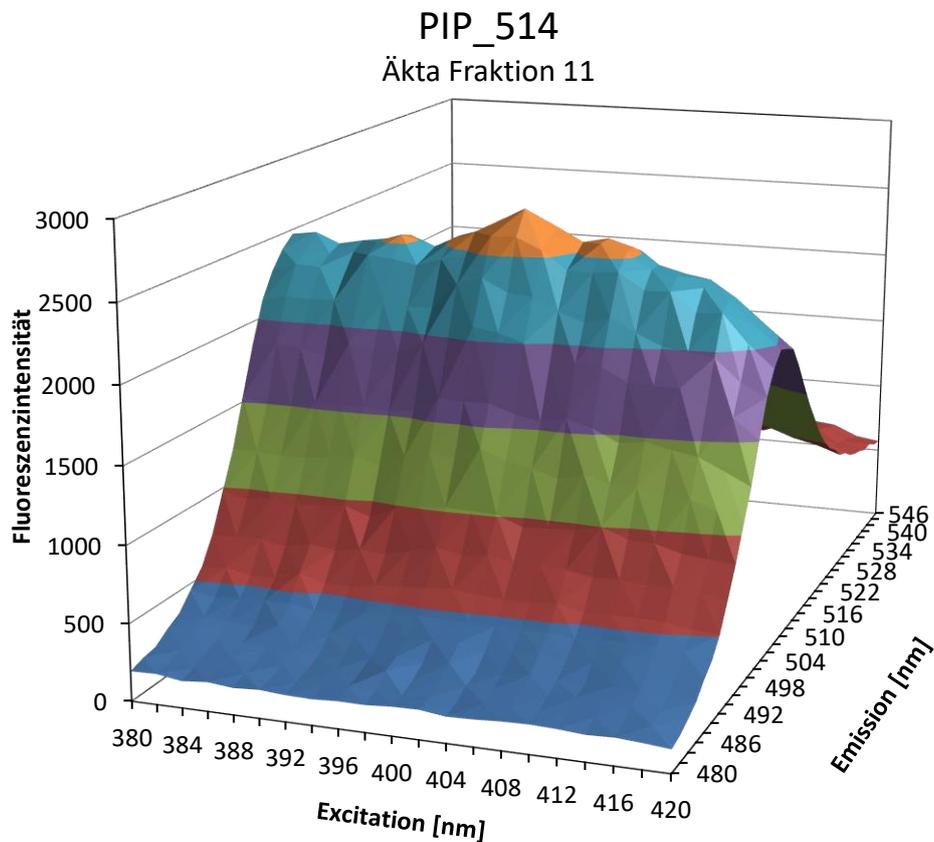


Abbildung 38 - Kultivierung PIP_514 – 3D-Scan von Fraktion 11 aus Aufreinigung mit Äkta – In dieser Fraktion ist der Peak deutlich zu sehen, der auf die Fluoreszenzmaxima dieser Probe bei Ex = 400nm und Em = 510nm hinweist (diese Werte können bei jeder Messung leicht variieren). Ex = 380-420nm, Em = 480-550nm, Gain = 80

PIP_514 Äkta - alle Fraktionen

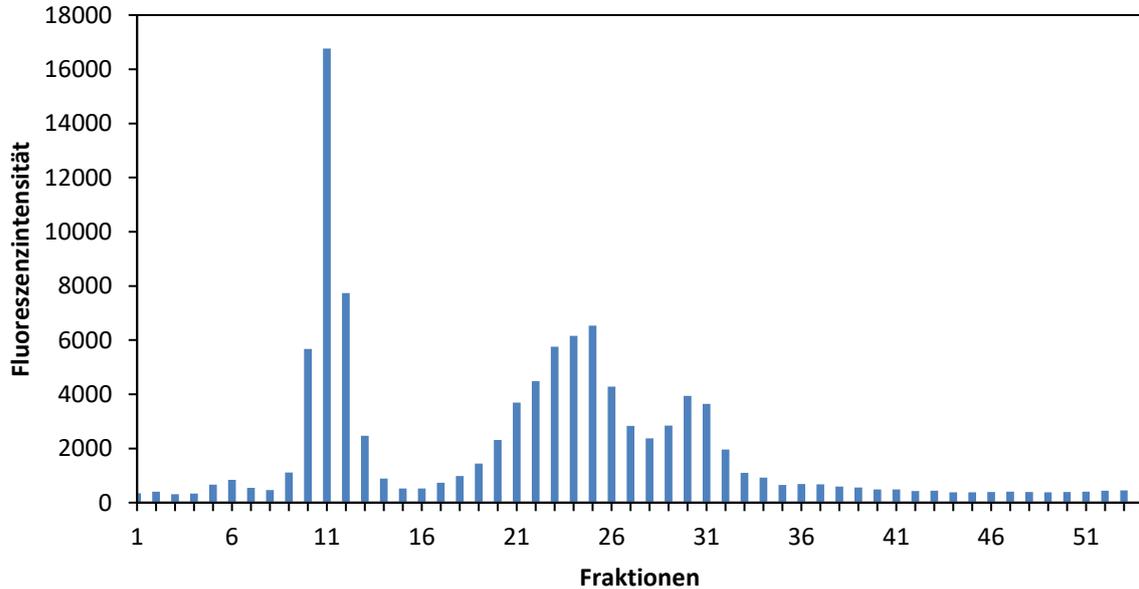


Abbildung 39 - Kultivierung PIP_514 - Messung aller Äkta-Fractionen bei Ex/Em = 408/512nm – Der größte Peak bei Fraktion 11 weist darauf hin, dass in dieser Probe das gesuchte Protein (Hydrophobin) enthalten ist. Die Peaks bei Fraktionen 23 und 30 weisen auf andere Proteine hin, die durch die Size-Exclusion Chromatografie abgetrennt wurden.

PIP_514 Proteinkonzentrationen Äkta-Fractionen

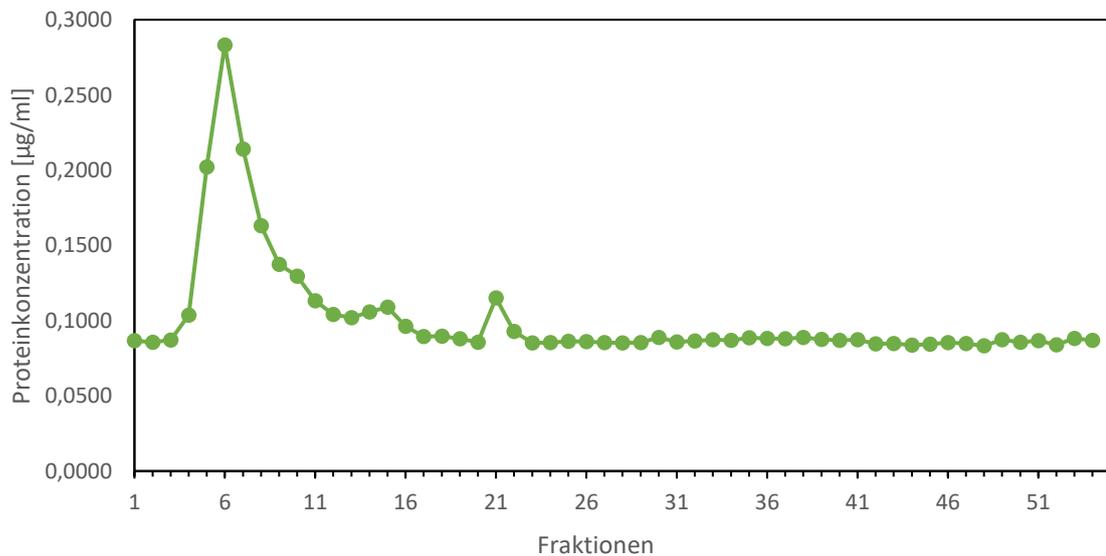


Abbildung 40 - Pierce Assay aller Fraktionen aus der Äkta – Die höchste Proteinkonzentration ist bei Fraktion 6 zu sehen, was im Vergleich mit der Fluoreszenzmessung der Fraktionen darauf hinweist, dass in dieser Probe ein anderes Protein vorliegt, welches in höherer Konzentration vorhanden ist, als das gesuchte Protein HFB.

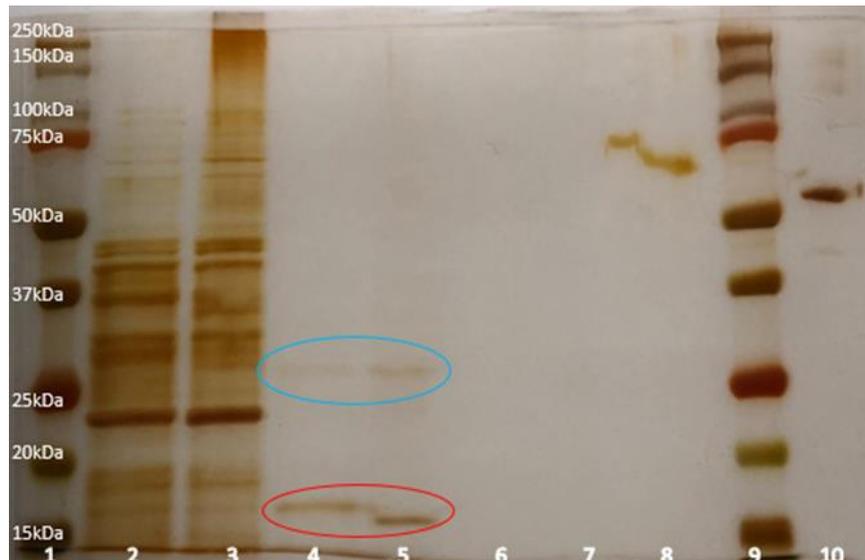


Abbildung 41 - SDS-PAGE Äkta-Fractionen nach Silberfärbung – Auf dem Gel sind nach Färbung und Entfärbung deutliche Banden sichtbar. 1: Referenz-Marker, 2 & 3: Fraktion 7 (reduziert/nicht reduziert), 4 & 5: Fraktion 11 (red./nicht red.), 6 & 7: Fraktion 23 (red./nicht red.), 8 & 10: BSA Standard (7.4mg/ml, red./nicht red.), 9: Referenz-Marker – Mögliche Hydrophobin-Banden sind in Reihe 4 & 5 bei etwa 17kDa (roter Kreis) zu erkennen, die leichten Banden bei etwa 30kDa (blauer Kreis) sind nicht eindeutig zuordbar (es könnte sich hierbei um Verunreinigung oder HFB mit Fluoreszenzmarker handeln). Einstellungen: 300V, 100mA, 60min

Proteinmenge lyophilisierter HFB-RFP-Proben

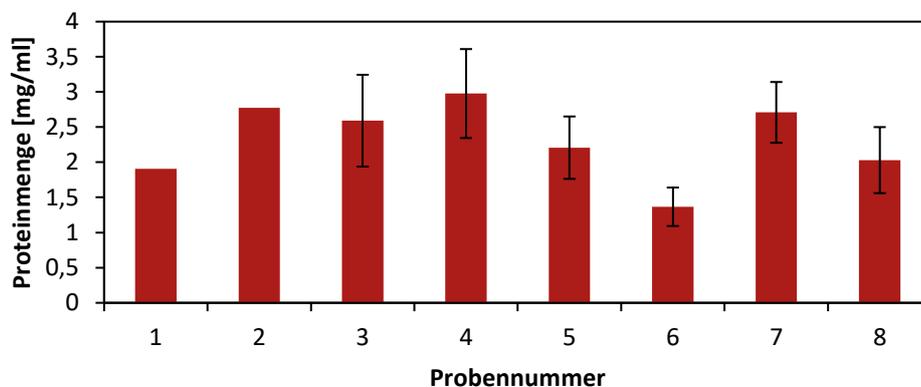
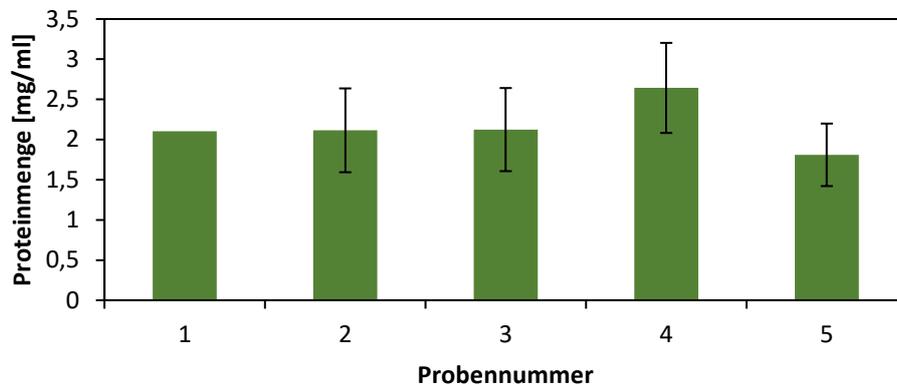


Abbildung 42 - gewogene Proteinmenge nach Lyophilisation – Die Proteinmenge variiert pro Probe leicht, da nicht immer exakt dieselbe Menge Protein aufgereinigt werden kann. Von PIP_517 wurden acht Proben lyophilisiert. Die ausgewählten Fraktionen sind **Tabelle 15** zu entnehmen. n=1 (Lyophilisation 1 und 2), n=2 (bei Proben 3-8)

Proteinmenge lyophilisierter HFB-GFP-Proben



*Abbildung 43 - gewogene Proteinmenge nach Lyophilisation – Die Proteinmenge variiert pro Probe leicht, da nicht immer exakt dieselbe Menge Protein aufgereinigt werden kann. Von PIP_514 wurden fünf Proben lyophilisiert. Die ausgewählten Fraktionen sind **Tabelle 15** zu entnehmen. n=1 (Lyophilisation 1), n=2 (bei Proben 2-5)*

Zusammenfassend lässt sich über die Aufreinigung mittels Size-Exclusion Chromatografie sagen, dass Hydrophobin mit hohem Reinheitsgrad von anderen, ebenfalls im Überstand enthaltenen Bestandteilen, abgetrennt werden kann. Dies wird sowohl durch Fluoreszenzmessungen mittels Tecan als auch SDS-PAGE bestätigt. Interessant ist allerdings, dass andere, ebenfalls im Überstand enthaltene Bestandteile nicht ausreichend voneinander abgetrennt werden konnten (Reihen 2 und 3, **Abbildung 41**). Eine mögliche Erklärung ist die zu Beginn schneller eingestellte Flussrate, die ab der HFB-Fraktion gedrosselt wurde, um eine genauere Abtrennung zu erreichen. Über das Pierce-Assay wird deutlich, dass Hydrophobin zwar nicht die größte Menge an Protein in der Probe darstellt, dafür aber rein isoliert vorliegt.

Resultate Analytik

Messwellenlängen der Fluoreszenzmarker

In **Abbildung 44** und **Abbildung 45** sind 3D-Scans von Kultivierung PIP_514 zu sehen. Da bei 3D-Scans über sehr große Wellenlängenbereiche für Exzitation und Emission sehr viele Werte gemessen werden, die überlappen, wurde für die bessere Veranschaulichung mit eingeschränktem Wellenlängen-Bereich gemessen. Vergleicht man die beiden Abbildungen, wird klar, dass im Überstand der ersten Probe (Beginn der Kultivierung) kein eindeutiger Peak zu sehen ist, in der zweiten (Ende der Kultivierung) allerdings ein deutlicher Peak bei Ex/Em = 406/512nm, der auf das Vorliegen von Hydrophobin bei dieser Wellenlänge schließen lässt. Die überraschenderweise hohe Fluoreszenzintensität zu Beginn der Kultivierung könnte auf das Vorliegen anderer Bestandteile hinweisen, die etwa durch unvollständig Zentrifugation noch im Überstand vorhanden gewesen sein könnten.

Die beiden 3D-Scans wurden unter denselben Bedingungen und mit denselben Einstellungen vermessen, was zeigt, dass zu Beginn kein Fusionsprotein vorlag, am Ende der Kultivierung aber eindeutig Hydrophobin in der Probe enthalten war.

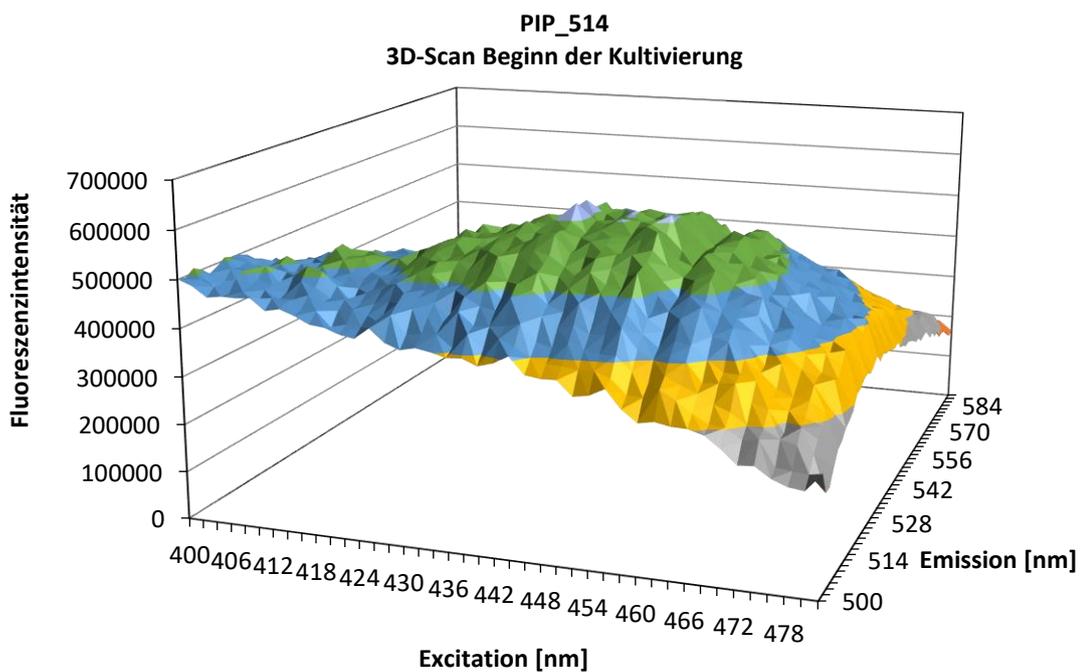


Abbildung 44 - 3D-Scan Beginn Kultivierung PIP_514 – Die Grafik zeigt die gemessenen Werte des 3D-Scans bei folgenden Einstellungen: Exzitation = 400-490nm, Emission = 500-590nm, Bandbreite = 5nm, stepzisse = 2nm, Gain = 100 – Der hohe Basiswert bei 500 000 könnte auf eine unvollständige Abtrennung der festen Bestandteile bei der Zentrifugation zurückzuführen sein (Streulichteffekte).

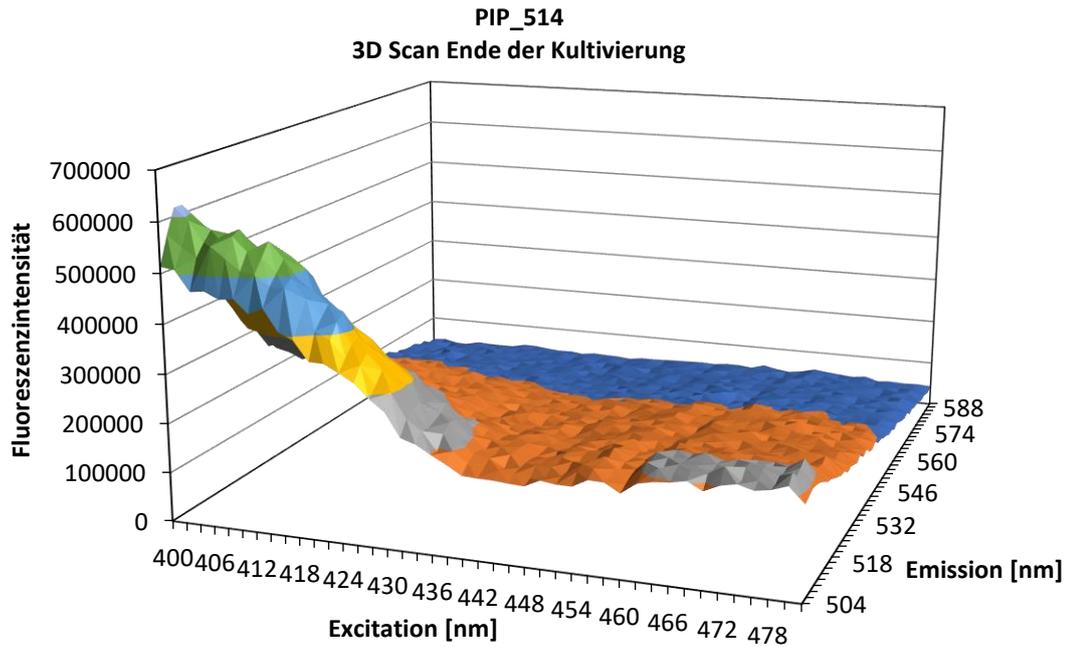


Abbildung 45 - 3D-Scan Ende Kultivierung PIP_514 – Die Grafik zeigt die gemessenen Werte des 3D-Scans bei folgenden Einstellungen: Exzitation = 400-490nm, Emission = 500-590nm, Bandbreite = 5nm, stepzsize = 2nm, Gain = 100 – Der hohe Peak weist auf das Vorliegen eines Proteins bei Ex/Em = 406/512nm hin.

Aufnahmen mit dem Licht-/Fluoreszenzmikroskop

In **Abbildung 46** und **Abbildung 47** sind einige Aufnahmen des Fluoreszenzmikroskops der Kultivierungen PIP_506 und PIP_513 zu sehen. Weitere fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sind bei den jeweils zugehörigen Kapiteln zu finden.

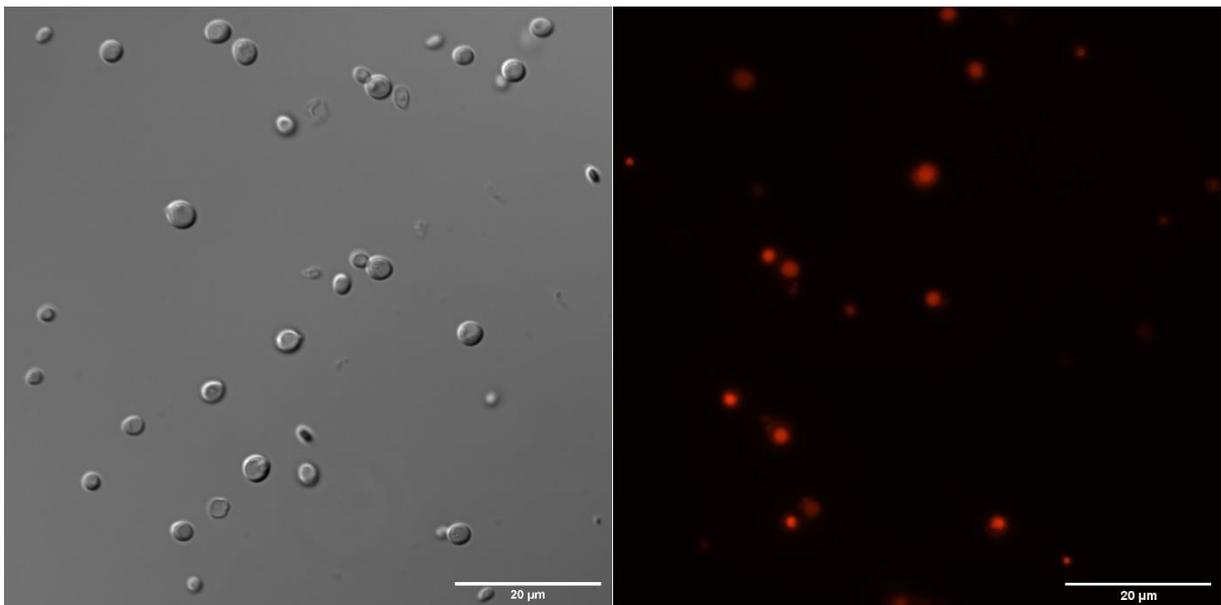


Abbildung 46 – Kultivierung PIP_506 - P. pastoris Zellen im DIC-Kanal (links) und im FITC-Kanal (rechts) – Die stärker fluoreszierenden Teile des Bildes könnten auf das Vorliegen von bisher nicht-sekretiertem rot-fluoreszierendem Hydrophobin in der Vakuole hindeuten.

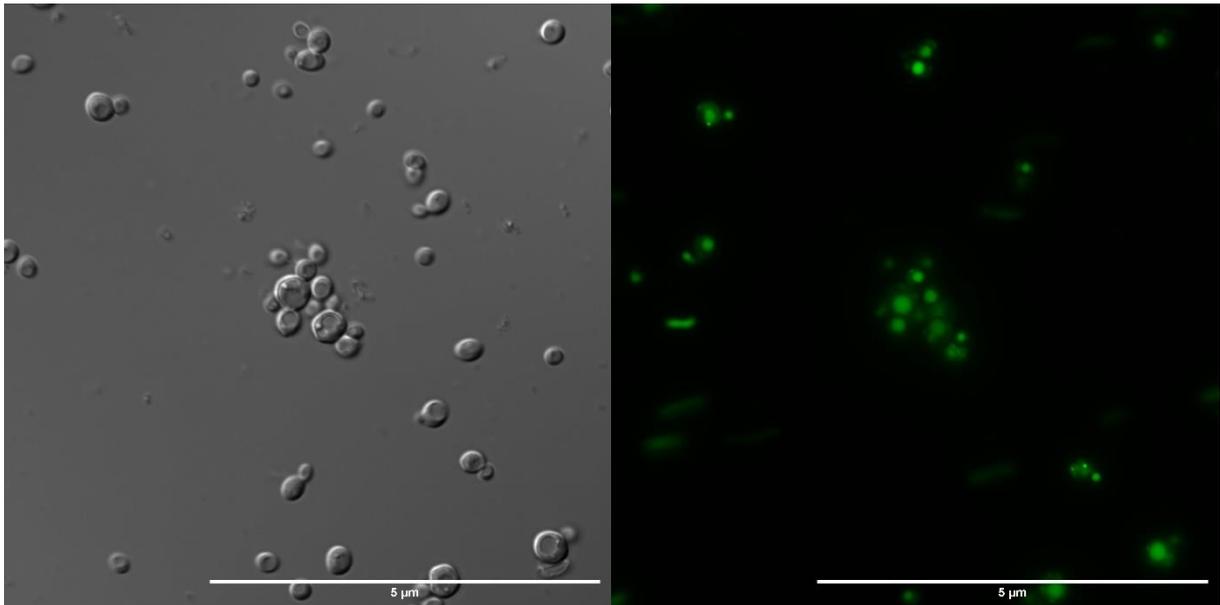


Abbildung 47 – Kultivierung PIP_513 - *P. pastoris* Zellen im DIC-Kanal (links) und im FITC-Kanal (rechts) – Die stärker fluoreszierenden Teile des Bildes könnten auf das Vorliegen von bisher nicht-sekretiertem Hydrophobin-GFP in der Vakuole hindeuten.

SDS-PAGE

Die Ergebnisse der durchgeführten SDS-PAGEs sind in den Kapiteln **ATPS – Aqueous Two Phase System** und **Aufreinigung mittels Size-Exclusion Chromatography – Äkta** erläutert.

Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Pierce-Assay

In **Abbildung 48** bis **Abbildung 57** sind die mittels Pierce-Assay gemessenen Proteinkonzentrationen der einzelnen Kultivierungen grafisch dargestellt. Vor der Erstellung der Proteinkonzentrations-Kurven wurde für die BSA-Standards eine Kalibrationsgerade generiert, aus der sich dann die Formel für die Berechnung der Konzentrationen der Proben ergab. Die bei Absorption 660nm gemessenen Daten wurden vor Eintragen in die Proteinkonzentrations-Grafiken auf ihre jeweilige Biomasse (CDW) normiert.

BSA-Standardkurve PIP_503

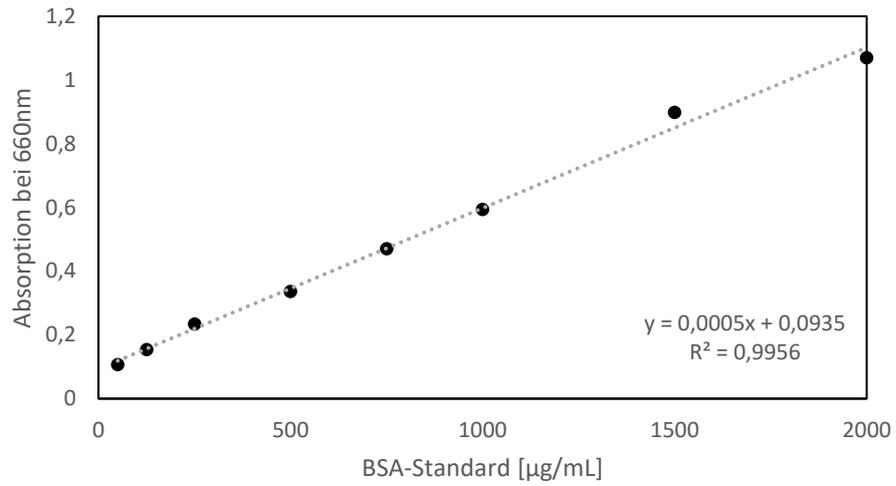


Abbildung 48 - BSA-Standardkurve für PIP_503

Proteinkonzentration PIP_503

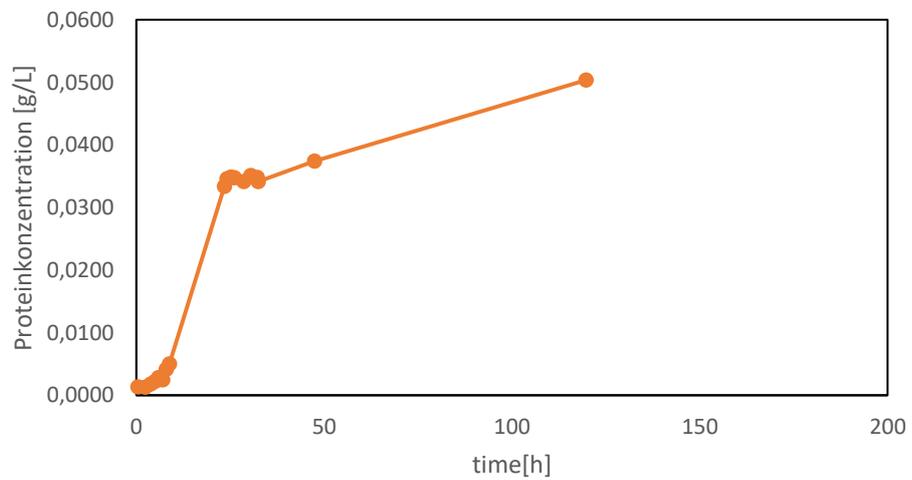


Abbildung 49 - Kurve der Proteinkonzentration von PIP_503 – HFB-RFP – Die in die Grafik eingetragenen Daten ergaben sich aus der Formel der BSA-Standardkurve und den auf die jeweilige Biomasse (CDW) der Probe normierten Werten.

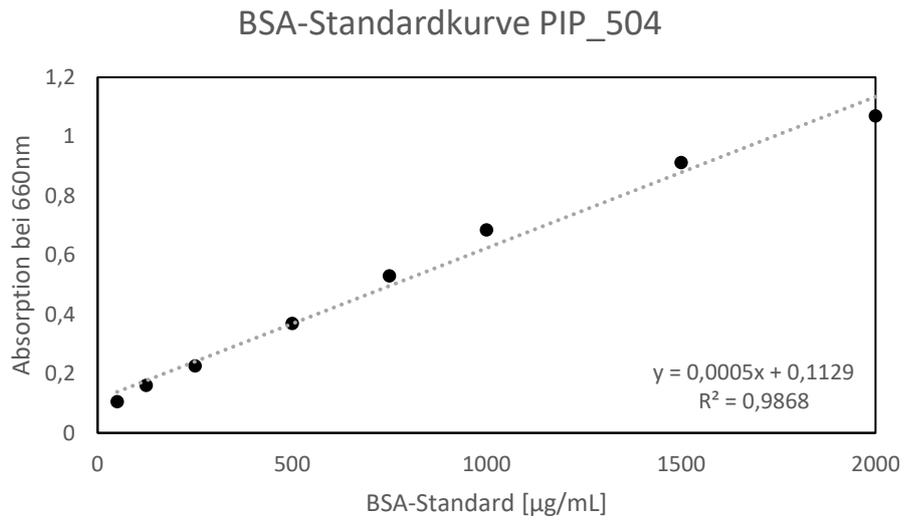


Abbildung 50 - BSA-Standardkurve für PIP_504

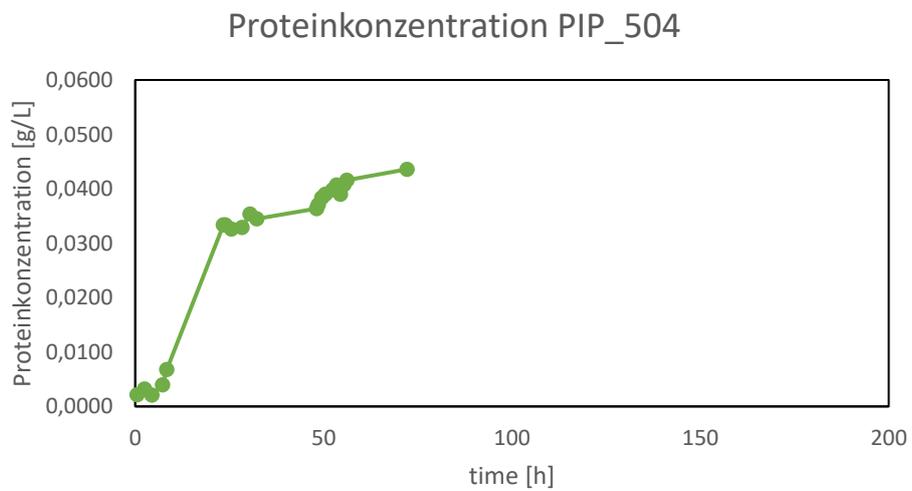


Abbildung 51 - Kurve der Proteinkonzentration von PIP_504 – HFB-GFP – Die in die Grafik eingetragenen Daten ergaben sich aus der Formel der BSA-Standardkurve und den auf die jeweilige Biomasse (CDW) der Probe normierten Werten.

BSA-Standardkurve PIP_506

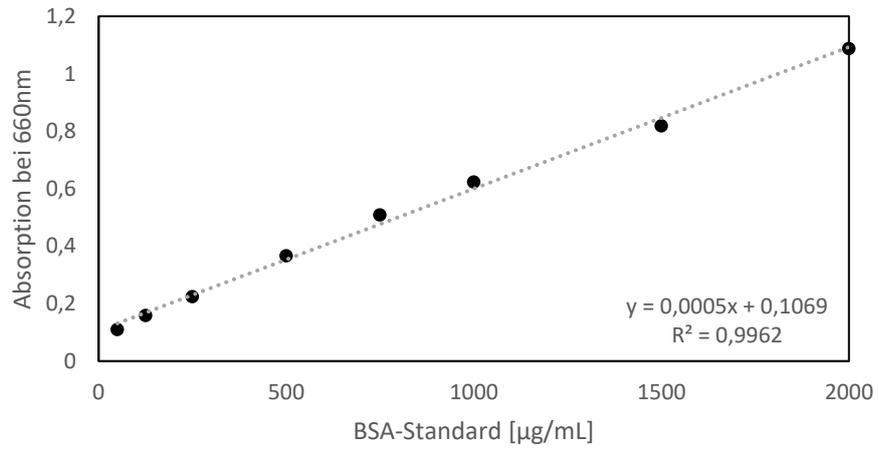


Abbildung 52 - BSA-Standardkurve für PIP_506

Proteinkonzentration PIP_506

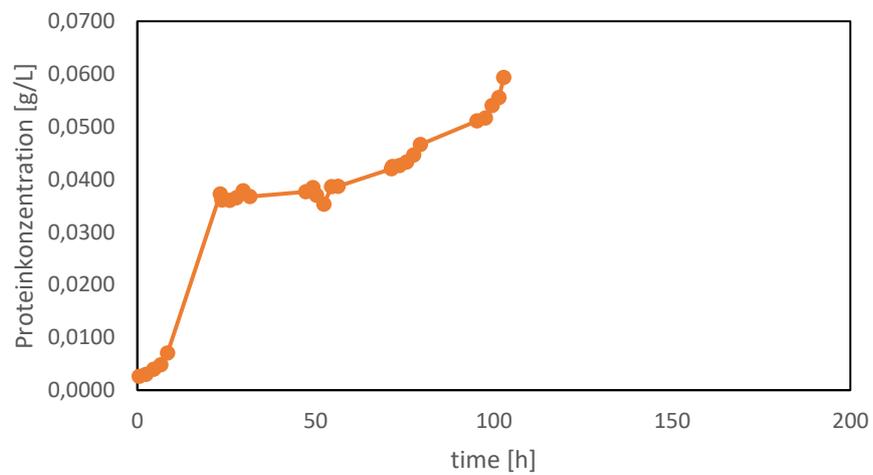


Abbildung 53 - Kurve der Proteinkonzentration von PIP_506 – HFB-RFP – Die in die Grafik eingetragenen Daten ergaben sich aus der Formel der BSA-Standardkurve und den auf die jeweilige Biomasse (CDW) der Probe normierten Werten.

BSA-Standardkurve PIP_508

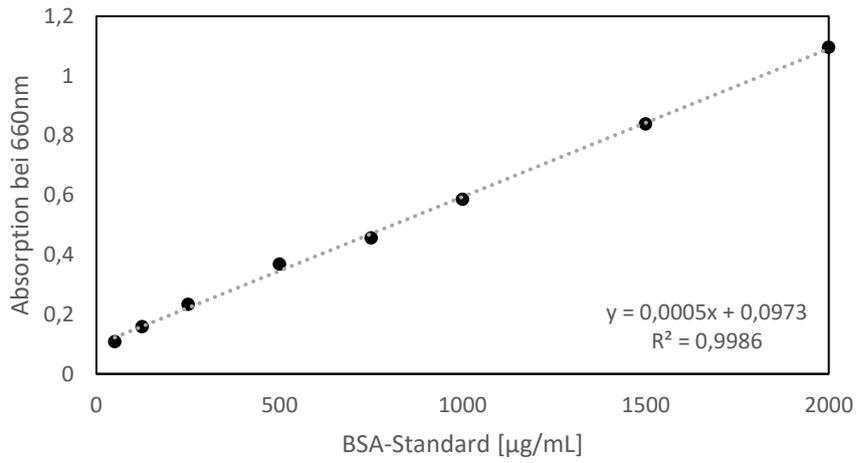


Abbildung 54 - BSA-Standardkurve für PIP_508

Proteinkonzentration PIP_508

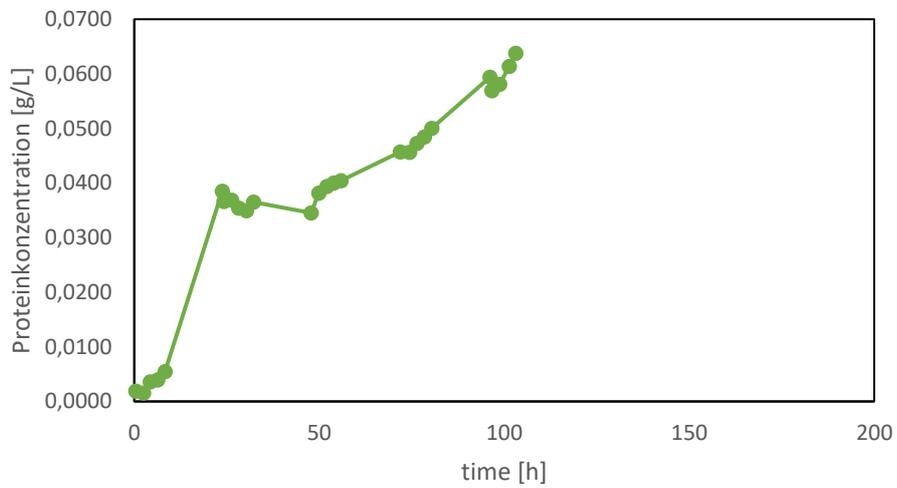


Abbildung 55 - Kurve der Proteinkonzentration von PIP_508 – HFB-GFP – Die in die Grafik eingetragenen Daten ergaben sich aus der Formel der BSA-Standardkurve und den auf die jeweilige Biomasse (CDW) der Probe normierten Werten.

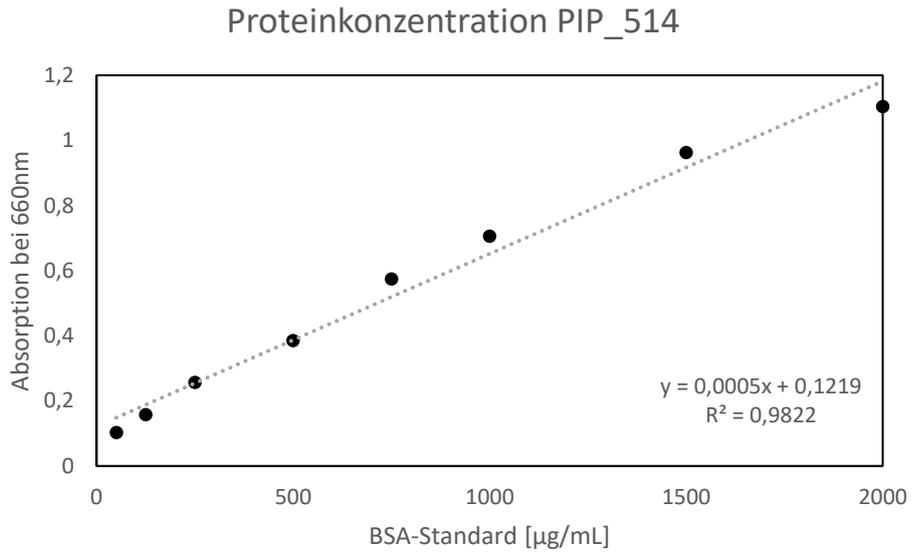


Abbildung 56 - BSA-Standardkurve für PIP_514

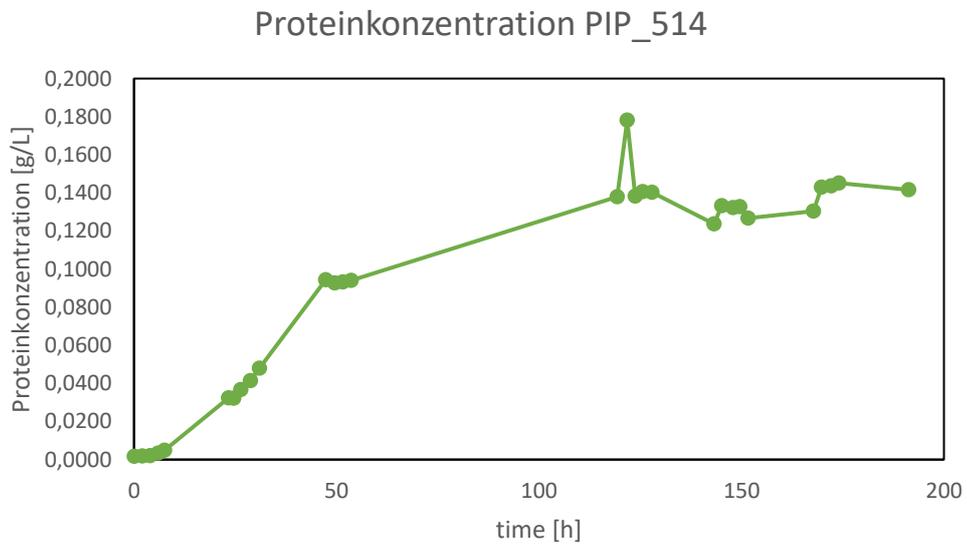


Abbildung 57 - Kurve der Proteinkonzentration von PIP_514 – HFB-GFP – Die in die Grafik eingetragenen Daten ergaben sich aus der Formel der BSA-Standardkurve und den auf die jeweilige Biomasse (CDW) der Probe normierten Werten.

Resultate Zellbindungs- und Internalisierungsversuche

Weder bei den Einzelzell-Suspensionen noch beim Monolayer der Caco-2- und SvHuc-Zellen konnte eindeutig eine Zellbindung beziehungsweise Internalisation von Hydrophobin festgestellt werden.

Bei der Inkubation von SvHuc-/Caco-2-Einzelzell-Suspensionen mit HFB-RFP/-GFP konnte keine signifikante Steigerung der Fluoreszenz im Vergleich zu den mit fWGA (Positiv-Kontrolle) inkubierten Proben festgestellt werden (Grafik nicht gezeigt).

Am Caco-2-Monolayer-Versuch, der bei 4°C durchgeführt wurde, wird ersichtlich, dass fWGA als Positiv-Kontrolle auch nach den Waschschritten eine nur leicht schwankende Fluoreszenz aufweist (die durch Quenching zustande kommen kann), was darauf hinweist, dass fWGA an die Zellen gebunden haben sollte. Die Fluoreszenzwerte von HFB-RFP fielen schon nach dem ersten Waschschrift deutlich ab, was darauf hinweist, dass HFB-RFP nicht an die einzelnen Zellen gebunden hat. Ein Versuch, die Caco-2-Monolayer bei 37°C mit HFB zu inkubieren wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt. Die Ergebnisse sind **Abbildung 60** und **Abbildung 61** zu entnehmen.

Bei den Messungen der bei 4°C inkubierten SvHuc-Monolayer, das wird in **Abbildung 62** bis **Abbildung 64** deutlich, sinken die Fluoreszenz-Werte nach dem Waschschrift stark ab, was darauf hinweist, dass das Hydrophobin nicht ausreichend an den Zellen gebunden wurde oder aufgenommen wurde. Eine Ausnahme stellt **Abbildung 65** dar, hier besteht die Möglichkeit, dass nach 120min Inkubationszeit (bei 4°C) HFB-GFP an die Zellen gebunden haben könnte oder internalisiert wurde. Diese Annahme müsste aber durch Wiederholung des Versuchs und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden.

Bei der Inkubation der SvHuc-Monolayer bei 37°C – siehe **Abbildung 66** bis **Abbildung 69** – sinken die Fluoreszenzwerte nach den Waschschritten weniger deutlich ab als nach Inkubation bei 4°C, was darauf hindeutet, dass eine Internalisation oder Bindung an die Zellen stattgefunden haben könnte. Um zu bestätigen, dass eine temperaturabhängige Internalisation stattgefunden hat, müssten die Versuche mehrfach wiederholt werden und durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unterstützt werden.

An Bildern der Monolayer-Platten (**Abbildung 58** – A5/A6, B5/B6) wird sichtbar, dass sich die mit HFB inkubierten Zell-Monolayer beginnen vom Plattenboden zu lösen (rot umrandet), im Vergleich dazu sind derselben Abbildung (blau umrandet) mit PBS inkubierte Wells zu sehen (C5/C6, D5/D6). Dieses Phänomen könnte auf die tensidartigen Eigenschaften von Hydrophobin zurückgeführt werden (eine vergrößerte Ansicht der mit HFB inkubierten Wells ist in **Abbildung 59** zu sehen), eine durch das Pipettieren ausgelöste mechanische Ablösung kann aufgrund der Vergleichsproben (mit PBS inkubierte Zellen) ausgeschlossen werden.

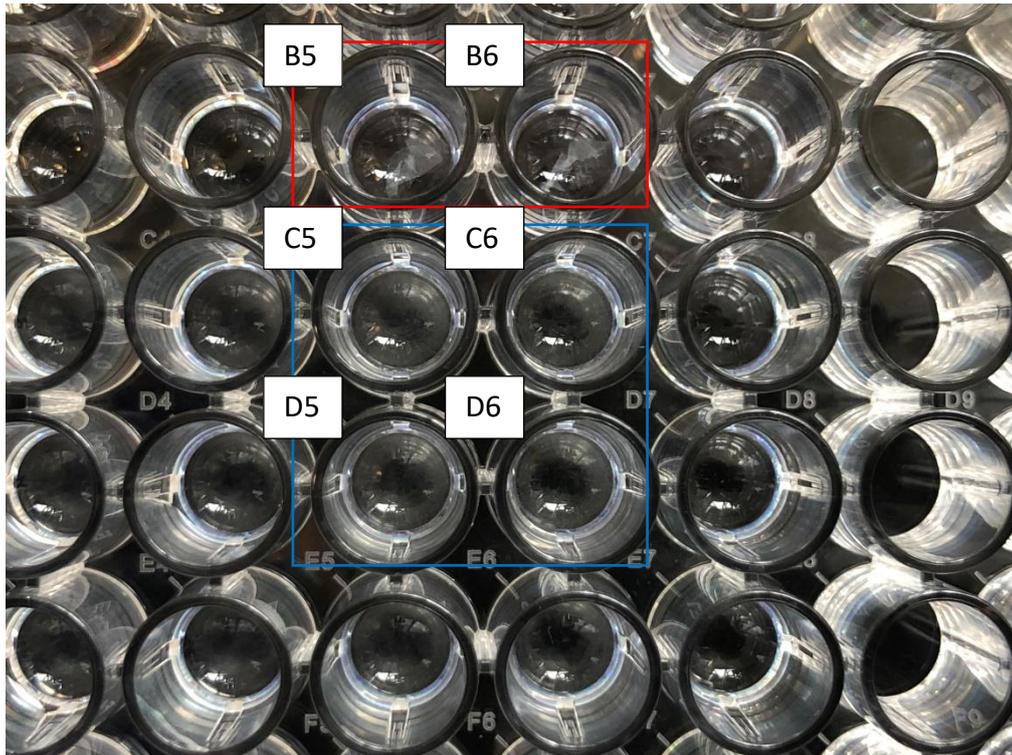


Abbildung 58 - mit HFB und PBS inkubierte Monolayer-Platte – In den Wells B5/B6 sind die abgelösten Zell-Monolayer sichtbar (rot), im Vergleich dazu sind in mit PBS inkubierte Wells (C5/C6, D5/D6) weiterhin konfluent (blau).

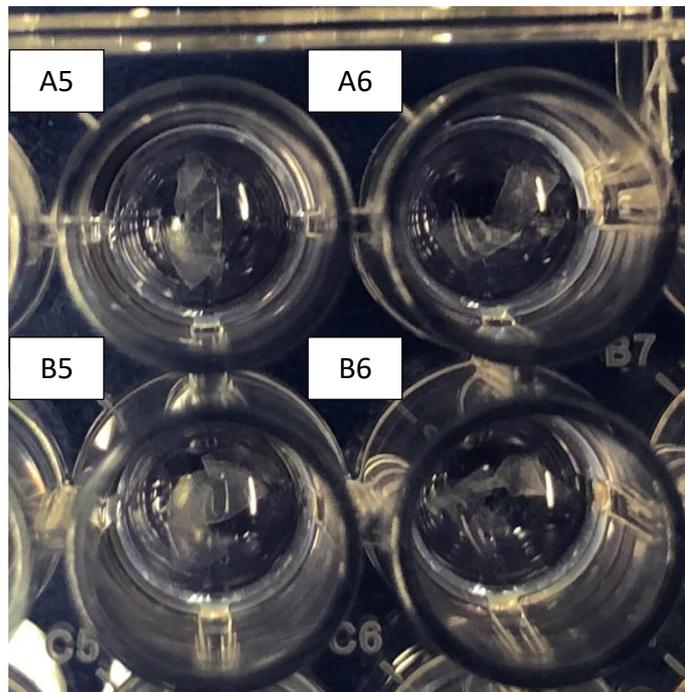


Abbildung 59 - vergrößerte Ansicht der mit HFB inkubierten Zellen – Durch die tensidartigen Eigenschaften von HFB könnte es zur Ablösung der Zell-Monolayer kommen.

HFB-RFP/fWGA

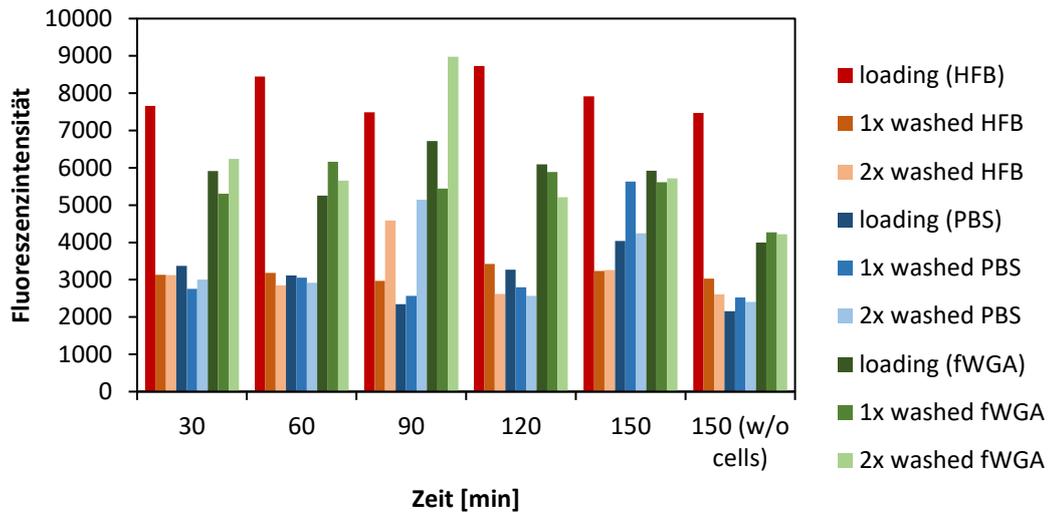


Abbildung 60 - Caco-2-Monolayer-Versuch 1 mit Positiv-Kontrolle – Es ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzwerte von den mit Hydrophobin beladenen Wells (loading) nach dem Waschschrift im Vergleich zur Messung direkt nach der Inkubation bei 4°C deutlich absinken. Bei der Positiv-Kontrolle fWGA schwanken die Werte nur leicht, was zeigt, dass die Bindung an die Caco-Zellen erfolgreich war. Die mit PBS inkubierten Zellen verdeutlichen, dass bei der Fluoreszenzmessung ein Grundrauschen zu sehen ist und unterstreicht, dass HFB durch die Waschschrift entfernt wurde.

HFB-RFP/fBSA

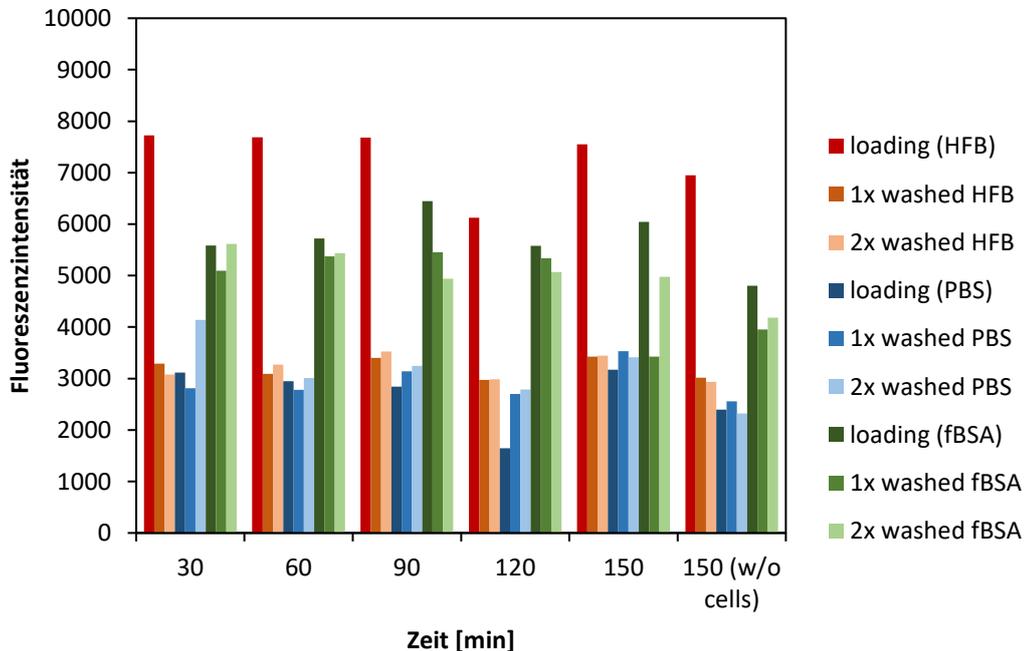


Abbildung 61 - Caco-2-Monolayer Versuch 1 mit Negativ-Kontrolle – Auch in dieser Grafik ist deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenzwerte von den mit Hydrophobin beladenen Wells (loading) nach dem Waschschrift im Vergleich zur Messung direkt nach der Inkubation bei 4°C deutlich absinken. Bei der Negativ-Kontrolle fBSA wurde sichtlich nicht gut genug gewaschen, weshalb die Werte etwas höher sind, als erwartet. Die mit PBS inkubierten Zellen verdeutlichen, dass bei der Fluoreszenzmessung ein Grundrauschen zu sehen ist und unterstreicht, dass HFB durch die Waschschrift entfernt wurde.

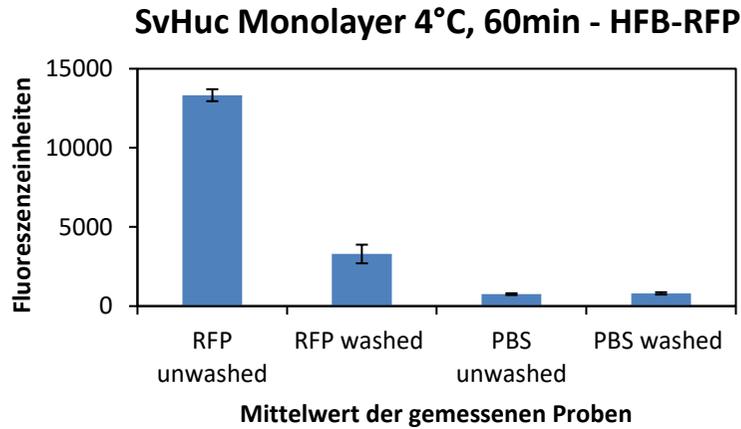


Abbildung 62 - SvHuc-Monolayer 1 – Nach dem Waschen sinkt der Fluoreszenzwert deutlich ab. HFB-RFP bindet nach 60min bei 4°C nicht/wird nicht internalisiert. n=6

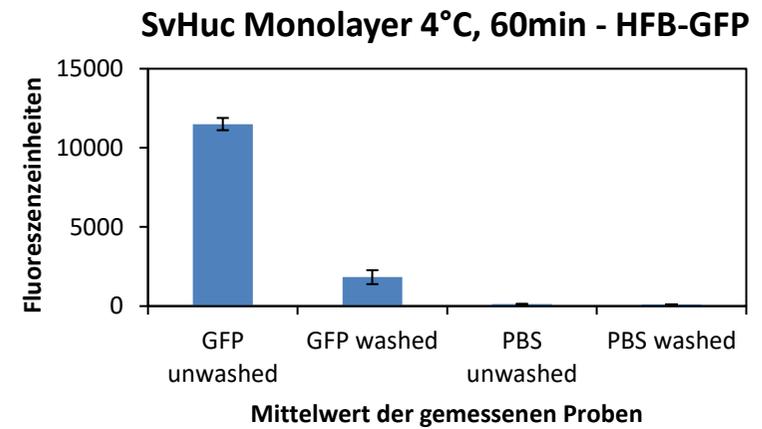


Abbildung 63 - SvHuc-Monolayer 1 – Nach dem Waschen sinkt der Fluoreszenzwert deutlich ab. HFB-GFP bindet nach 60min bei 4°C nicht/wird nicht internalisiert. n=6

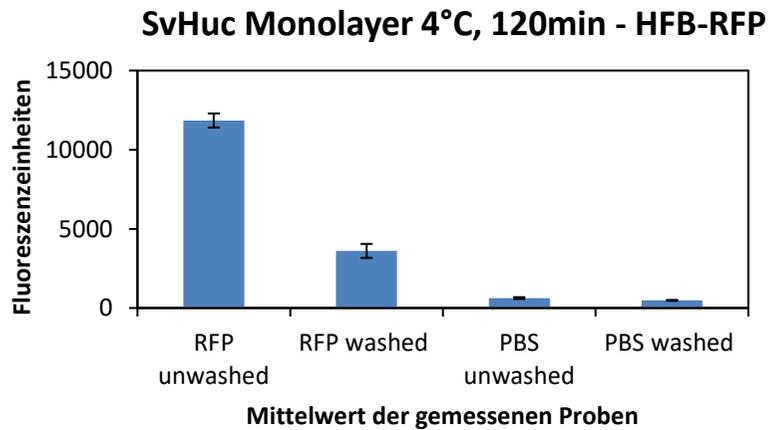


Abbildung 64 - SvHuc-Monolayer 1 – Nach dem Waschen sinkt der Fluoreszenzwert deutlich ab. HFB-RFP bindet nach 120min bei 4°C nicht/wird nicht internalisiert. n=6

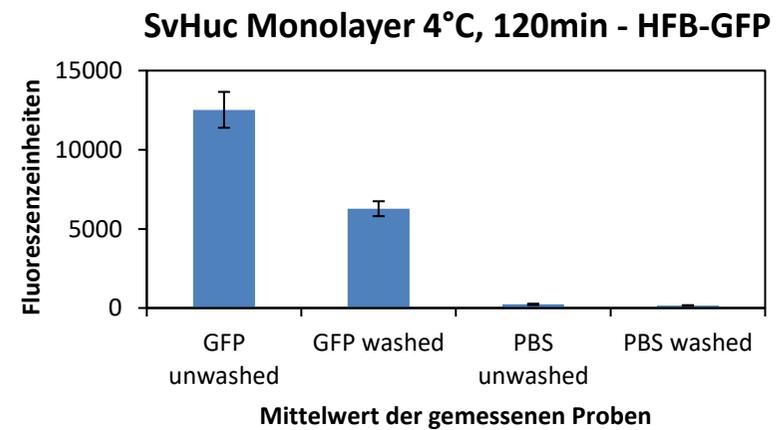


Abbildung 65 - SvHuc-Monolayer 1 – Nach dem Waschen sinkt der Fluoreszenzwert zwar ab, es könnte aber hier eine Bindung/Internalisation stattgefunden haben, die durch Wiederholung des Versuchs und mikroskopische Aufnahmen bestätigt werden müsste. n=6

SvHuc Monolayer 37°C, 60min - RFP

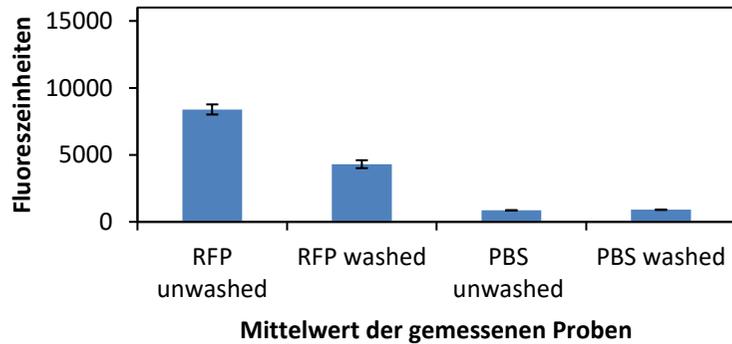


Abbildung 66 - SvHuc-Monolayer 2 - Nach dem Waschen sinkt der Fluoreszenzwert weniger deutlich ab, als bei 4°C, was auf eine mögliche Internalisation hindeutet. n=6

SvHuc Monolayer 37°C, 60min - GFP

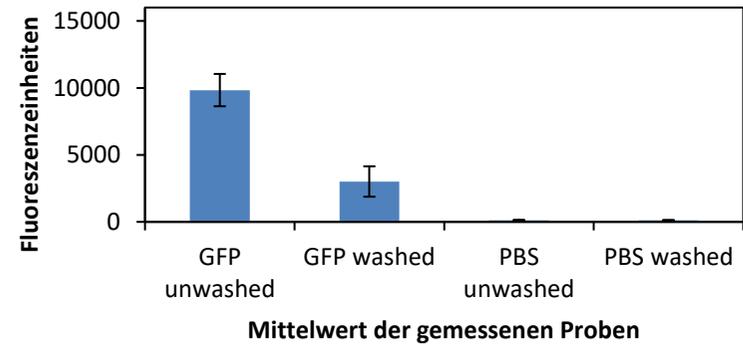


Abbildung 67 - SvHuc-Monolayer 2 - Nach dem Waschen sinkt der Fluoreszenzwert deutlich ab, was darauf schließen lässt, dass keine Bindung/Internalisierung stattgefunden hat. n=6

SvHuc Monolayer 37°C, 120min - RFP

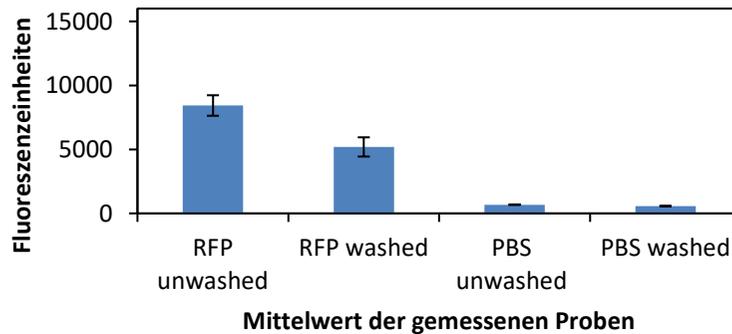


Abbildung 68 - SvHuc-Monolayer 2 - Nach dem Waschen sinkt der Fluoreszenzwert weniger deutlich ab, als bei 4°C, was auf eine mögliche Internalisation hindeutet. n=6

SvHuc Monolayer 37°C, 120min - GFP

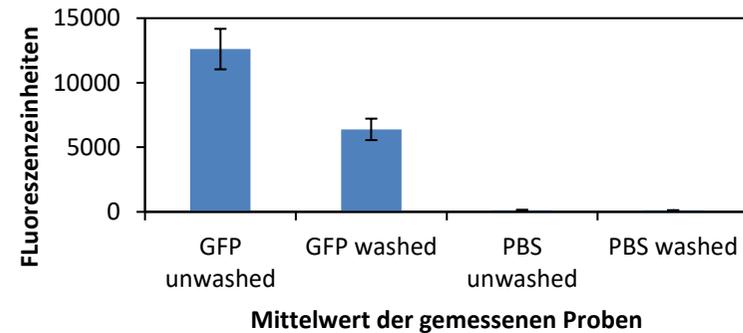


Abbildung 69 - SvHuc-Monolayer 2 - Nach dem Waschen sinkt der Fluoreszenzwert weniger deutlich ab, als bei 4°C, was auf eine mögliche Internalisation hindeutet. n=6

Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mithilfe eines rekombinanten Produktionssystems – *P. pastoris* – ein Fusionsprotein, in diesem Fall Hydrophobin mit Fluoreszenz-Marker, herzustellen, eine geeignete Methode zur Aufreinigung des Proteins zu finden und die Bindung an oder Internalisierung in tierische Zellen zu testen.

P. pastoris eignete sich für die Kultivierung von Hydrophobin sehr gut, da sich das Wachstum und die Proteinproduktion über verschiedene Substrate, wie Glycerol und Methanol, relativ genau steuern lässt und außerdem, im Gegensatz zu *E.coli*, einige post-translationale Modifikationen ausführen kann^{31,33–37,40,53}. Der Hefestamm erwies sich zwar als unglaublich robust, da er auch sehr hohen Methanol-Konzentrationen und Druckschwankungen standhielt und sich von verschiedenen Methoden, wie Kugelmühle oder Ultraschallstab, nicht sofort zerstören ließ, hohen Temperaturen allerdings konnte *P. pastoris* nicht mehr standhalten. Viele Forschungsgruppen haben festgestellt, dass Methanol in zu hohen Konzentrationen cytotoxisch wirken kann und möglicherweise die Proteinproduktion limitiert. Es könnte also noch nachgeprüft werden, ab welcher Methanol-Konzentration die *P. pastoris*-Zellen absterben und was die optimale Substratkonzentration für maximale Proteinproduktion darstellt^{36,38–40}.

Hydrophobin scheint aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften ein vielversprechendes Fusionsprotein zu sein, das in verschiedenen Bereichen eingesetzt werden könnte, um zur Änderung der Lipophilie oder Hydrophilie oder zur Stabilisation von Suspensionen und Emulsionen beizutragen^{20,21,45}. Im Zuge dieser Projektarbeit wurde unter anderem Hydrophobin als Coating-Material für Mikro-/Nanopartikeln getestet, womit die Zirkulation von Nanopartikeln, ähnlich wie nach Coating mit humanem Serumalbumin, die Zirkulation im biologischen System erhöht werden könnte²⁵.

Unterschiedliche Anwendungen, wie Stabilisation von Teflon- und Graphit-Suspensionen²⁰, von Schaum in der Lebensmittelindustrie⁴⁵ und von Nanopartikel-Suspensionen²⁰, wurden bereits getestet und könnten in den nächsten Jahren schon im großen Maßstab eingesetzt werden. Auffallend waren die deutliche Schaumbildung während der Kultivierung, die auch noch beim Putzen des Bioreaktors auftrat, und die korrespondierend zum Fluoreszenztag entstehende Färbung des Mediums, die auf erfolgreiche Produktion von Hydrophobin hindeutet. Nachdem Hydrophobin auch Inclusion Bodies zu bilden scheint^{31,53}, könnte man auch dahingehend testen, ob ein Wirkstoff im Inneren eines Inclusion Body's einschließbar und somit als Arzneimittel verabreichbar wäre und damit möglicherweise im targeted drug-delivery zum Einsatz kommen könnte.

Zur Behandlung der Hefekultur kamen Lyticase, Kugelmühle und Sonotrode zum Einsatz, allerdings wären weitere Versuche, ähnlich Bzducha et al.⁵¹, interessant, ob durch Kombination mehrerer verschiedener Aufschlussmethoden die Ausbeute an Hydrophobin noch erhöht werden kann.

Um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, müssten viele für diese Arbeit durchgeführten Versuche noch mehrfach wiederholt werden, da die meisten aus Zeitgründen nur einmal durchgeführt werden konnten. Weiters sind nur bei den Zellbindungs- und Internalisierungs-Versuchen mittels Säulenchromatografie aufgereinigte Proben eingesetzt worden, in Zukunft

sollten auch alle weiteren Versuche mit aufgereinigten, lyophilisierten und in PBS resuspendierten HFB-Proben ausgeführt werden.

An dieser Stelle müssen auch die Fluoreszenz-Messergebnisse der Versuche mit Kultivierung PIP_503 relativiert werden, da die Messwellenlängen aufgrund einer Fehlinterpretation des 3D-Scans nicht korrekt eingestellt waren und dadurch die gemessenen Werte nicht korrekt interpretierbar waren.

Das für die Abtrennung von Hydrophobin von den restlichen in der Probe vorhandenen Bestandteilen angewendete ATPS (Aqueous Two Phase System) erwies sich als aufwändiges und relativ komplexes Trennverfahren, welches am Ende einen erneuten Aufreinigungsschritt erfordern würde, da mit dieser Methode nicht die gesamte Menge HFB aus der Probe abtrennt werden konnte und immer auch Lösungsmittelreste in der Probe verbleiben, wodurch ein Up-Scaling erschwert wird^{45,54}.

Eine Methode, die sich als weitaus besser erwiesen hat, ist die Aufreinigung mittels Size Exclusion Chromatography. Durch den Einsatz der Säulenchromatographie konnte schneller, sauberer und mit deutlich geringerem Aufwand eine höhere und reinere Ausbeute erzielt werden. Die Abtrennung von HFB mittels Säulenchromatographie könnte durch verschiedene Anpassungen, wie der aufzureinigenden Probenmenge, Säulengröße und Methode, noch effizienter gemacht werden.

Der Bindungsversuch von HFB an SvHuc-/Caco-2-Einzelzellen hat keine aussagekräftigen Ergebnisse gebracht, möglicherweise hat aber eine temperaturabhängige Internalisierung stattgefunden. Um die Messergebnisse zu bestätigen müssten beide Versuche noch mehrfach wiederholt und weiters durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unterstrichen werden. Zusätzlich untersucht werden könnte die Kombination mit einem Linker, der eventuell eine Bindung an tierische Zellen ermöglicht⁵⁶.

Das Konzept des Einsatzes von PLGA-Nanopartikeln für die zielgerichtete Arzneimitteltherapie hat sich in der Wissenschaft bereits etabliert^{1,3,6,9,14,15,17,18}, die Abgabeformen und Anwendungsgebiete sind aber noch ausbaufähig, da das Beladen und die Freisetzung der Nanopartikel oft noch nicht so funktioniert, wie gewollt⁹. In der Krebs-Therapie und -Diagnostik kommen Nano-Carrier seit einiger Zeit zum Einsatz^{6,9,12}, es gibt aber auch Ansätze für die Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen^{9,18}, von AIDS^{3,12} und zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke^{3,18}. Hydrophobin eröffnet aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften die Möglichkeit, Mikro- und Nanopartikel zu ummanteln und damit deren Zirkulationszeit im Blut zu erhöhen²⁵. Gekoppelt mit einem Linker, der an spezifische Zellstrukturen bindet, könnte ein hochaffiner Wirkstoff generiert werden, der mit minimalen systemischen (Neben-)Wirkungen an einem bestimmten Ort eine Wirkung auslösen könnte.

Referenzen

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und deren Zustimmung zur Aufnahme der Bilder in meine Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, bitte ich um Meldung bei mir.

1. Coelho JF, Ferreira PC, Alves P, et al. Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA J.* 2010;1(1):164-209. doi:10.1007/s13167-010-0001-x
2. Park K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *J Control Release.* 2014;190:3-8. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.054
3. Muthu MS, Singh S taru. Targeted nanomedicines: Effective treatment and brain disorders. *Nanomedicine.* 2009;4:105–118. doi:10.1016/j.jelectrocard.2005.06.005
4. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(12):751-760. doi:10.1038/nnano.2007.387
5. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(SUPPL.):206-212. doi:10.1016/j.addr.2012.09.033
6. Dinarvand, Rassoul; Sepehri, N; Manoochehri, S; Rouhani, H; Atyabi F. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:877-895. doi:10.2147/IJN.S18905
7. Tiwari G, Tiwari R, Bannerjee S, et al. Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharm Investig.* 2012;2(1):2. doi:10.4103/2230-973X.96920
8. Ortiz de Montellano PR. Cytochrome P450-activated prodrugs. *Futur Med Chem.* 2013;5(213-228):213-228.
9. Danhier, Fabienne; Ansorena, Eduardo; Silva, Joana M.; Coco, Régis; Le Breton, Aude; Prétat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J Control Release.* 2012;161:505-522. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043
10. Lü JM, Wang X, Marin-Muller C, et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009;9(4):325-341. doi:10.1586/erm.09.15
11. Qureshi SA. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology Third Edition- Volume 1.*; 2007. doi:10.1081/E-EPT-100001705
12. Dunin-Borkowski RE, McCartney MR, Smith DJ. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology.* Vol 7.; 2004.
13. Particle Sizes. <https://www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2/>.
14. Tan SY, Grimes S. Medicine in Stamps Paul Ehrlich (1854-1915): man with the magic bullet. *Singapore Med J.* 2010;51(11):842-843.
15. Schwartz RS. Paul Ehrlich ' s Magic Bullets. *N Engl J Med.* 2004;350(11):1079-1080. doi:10.1056/NEJMp048021
16. Feynman RP. There is plenty of room at the bottom for innovation. *J micro-electromechanical Syst.* 1992;1(1):60-66. doi:10.1002/sml.200400080
17. Taniguchi N. On the Basic Concept of Nanotechnology. 1974.

18. Mir M, Ahmed N, Rehman A ur. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2017;159:217-231. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.038
19. Dördelmann G, Kozlova D, Karczewski S, Lizio R, Knauer S, Epple M. Calcium phosphate increases the encapsulation efficiency of hydrophilic drugs (proteins, nucleic acids) into poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) nanoparticles for intracellular delivery. *J Mater Chem B*. 2014;2(41):7250-7259. doi:10.1039/c4tb00922c
20. Wösten HAB, Scholtmeijer K. Applications of hydrophobins: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(4):1587-1597. doi:10.1007/s00253-014-6319-x
21. Sunde M, Kwan AHY, Templeton MD, Beever RE, Mackay JP. Structural analysis of Hydrophobins. *Sci Direct - micron*. 2007:1-12. doi:10.1016/j.micron.2007.08.003
22. Fessi HC, Devissaguet J-P, Puisieux F, Thies C. US 5118528 A - Process For The Preparation Of Dispersible Colloidal Systems Of A Substance In The Form Of Nanoparticles - The Lens. 1992:7. https://www.lens.org/lens/patent/US_5118528_A.
23. Ho IT, Sessler JL, Gambhir SS, Jokerst J V. Parts per billion detection of uranium with a porphyrinoid-containing nanoparticle and in vivo photoacoustic imaging. *Analyst*. 2015;140(11):3731-3737. doi:10.1039/c5an00207a
24. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Control release*. 2001;70(1-2):1-20. doi:10.1016/S0168-3659(00)00339-4
25. Esfandyari-Manesh M, Mostafavi SH, Majidi RF, et al. Improved anticancer delivery of paclitaxel by albumin surface modification of PLGA nanoparticles. *DARU, J Pharm Sci*. 2015;23(1):1-8. doi:10.1186/s40199-015-0107-8
26. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods: Critical comparison. *Adv Colloid Interface Sci*. 2011;163(2):90-122. doi:10.1016/j.cis.2011.02.005
27. Langer K, Balthasar S, Vogel V, Dinauer N, Von Briesen H, Schubert D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *Int J Pharm*. 2003;257(1-2):169-180. doi:10.1016/S0378-5173(03)00134-0
28. Weber C, Coester C, Kreuter J, Langer K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int J Pharm*. 2000;194(1):91-102. doi:10.1016/S0378-5173(99)00370-1
29. Galindo-Rodriguez S, Allémann E, Fessi H, Doelker E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm Res*. 2004;21(8):1428-1439. doi:10.1023/B:PHAM.0000036917.75634.be
30. Panyam J, Dali MM, Sahoo SK, Ma W. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly (D, L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *J Control Release*. 2003;92:173-187. doi:10.1016 /S0168-3659(03)00328-6
31. Porro, Danilo; Sauer, Michael; Branduardi, Paola; Mattanovich D. Recombinant Protein Production in Yeast. *Mol Biotechnol*. 2005;31(3):245-260.
32. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5(APR):1-17. doi:10.3389/fmicb.2014.00172
33. Idiris A, Tohda H, Kumagai H, Takegawa K. Engineering of protein secretion in yeast: Strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;86(2):403-417. doi:10.1007/s00253-010-2447-0

34. Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;65(4):363-372. doi:10.1007/s00253-004-1656-9
35. Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv*. 2014;33(6):1177-1193. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.05.008
36. Krainer FW, Dietzsch C, Hajek T, Herwig C, Spadiut O, Glieder A. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microb Cell Fact*. 2012;11(1):22. doi:10.1186/1475-2859-11-22
37. Fickers P. *Pichia pastoris* : a workhorse for recombinant protein production. 2014;2(3):354-363.
38. van der Klei IJ, Yurimoto H, Sakai Y, Veenhuis M. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2006;1763(12):1453-1462. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.07.016
39. Yurimoto H, Oku M, Sakai Y. Yeast methylotrophy: Metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. *Int J Microbiol*. 2011;2011. doi:10.1155/2011/101298
40. Yang Z, Zhang Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnol Adv*. 2018;36(1):182-195. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.11.002
41. Vogl T, Sturmberger L, Kickenweiz T, et al. A Toolbox of Diverse Promoters Related to Methanol Utilization: Functionally Verified Parts for Heterologous Pathway Expression in *Pichia pastoris*. *ACS Synth Biol*. 2016;5(2):172-186. doi:10.1021/acssynbio.5b00199
42. Obst U, Lu TK, Sieber V. A Modular Toolkit for Generating *Pichia pastoris* Secretion Libraries. *ACS Synth Biol*. 2017;6(6):1016-1025. doi:10.1021/acssynbio.6b00337
43. Tevere S. Inclusion Bodies-biologische Nanopartikel als funktionelles Drug Delivery System. 2018.
44. Wösten HAB. Hydrophobins: Multipurpose Proteins. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55(1):625-646. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.625
45. Linder MB, Szilvay GR, Nakari-Setälä T, Penttilä ME. Hydrophobins: The protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(5):877-896. doi:10.1016/j.femsre.2005.01.004
46. Wessels J. Developmental Regulation of Fungal Cell Wall Formation. *Annu Rev Phytopathol*. 1994;32:413-437.
47. Grunér MS, Szilvay GR, Berglin M, Lienemann M, Laaksonen P, Linder MB. Self-assembly of class II hydrophobins on polar surfaces. *Langmuir*. 2012;28(9):4293-4300. doi:10.1021/la300501u
48. Wösten HAB, De Vocht ML. Hydrophobins, the fungal coat unravelled. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr*. 2000;1469(2):79-86. doi:10.1016/S0304-4157(00)00002-2
49. Szilvay GR, Kisko K, Serimaa R, Linder MB. The relation between solution association and surface activity of the hydrophobin HFBI from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett*. 2007;581(14):2721-2726. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.024
50. Thermo Fisher Scientific. Y-PER -S Yeast Protein Extraction Reagent. *Doc Manual, Advert*. 2017;0747(815):1-2. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011382_YPER_Yeast_Protein_Extract_Reag_UG.pdf.
51. Bzducha-Wróbel A, Błżajek S, Kawarska A, Stasiak-Rózańska L, Gientka I, Majewska E. Evaluation of the efficiency of different disruption methods on yeast cell wall preparation for β -glucan isolation. *Molecules*. 2014;19(12):20941-20961. doi:10.3390/molecules191220941

52. Flückiger S, Frei Y. Biologischen Nanopartikeln auf der Spur. 2019.
53. Przylucka A, Akcapinar GB, Bonazza K, et al. Comparative Physicochemical Analysis of Hydrophobins Produced in Escherichia Coli and Pichia Pastoris. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2017;159:913-923. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.08.058
54. Joensuu JJ, Conley AJ, Linder MB, Menassa R. Bioseparation of Recombinant Proteins from Plant Extract with Hydrophobin Fusion Technology. In: *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. Vol 9. ; 2012:527-534. doi:10.1007/978-1-61779-433-9_28
55. Wang XQ, Graveland-Bikker JF, De Kruif CG, Robillard GT. Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: From soluble state to self-assembly. *Protein Sci*. 2004;13(3):810-821. doi:10.1110/ps.03367304
56. Neutsch L, Wambacher M, Wirth EM, et al. UPEC biomimicry at the urothelial barrier: Lectin-functionalized PLGA microparticles for improved intravesical chemotherapy. *Int J Pharm*. 2013;450(1-2):163-176. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.04.058
57. Silver Staining protocol: This protocol is valid for both SDS-PAGE and native PAGE gels. If not better, these home-made solutions work as good as commercially available ones. :10.
58. Thermo Fisher Scientific Inc. Pierce 660nm Protein Assay Reagent -. 2015;0747(22660). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22660>.

Anhang

Verwendete *Pichia pastoris* Stämme und Hydrophobin-Vektoren

	interne Nummerierung	P. pastoris Stamm	Hydrophobin	HFB-Vektor	Fluoreszenzmarker
PIP_503	6626	KM71H	HFB8	pPICZα A	mRFP-1
PIP_504	6625		HFB4		GFPuv-7
PIP_506	6626		HFB8		mRFP-1
PIP_508	6625		HFB4		GFPuv-7
PIP_510_1	6616		HFB4		-
PIP_511_1	6626		HFB8		mRFP-1
PIP_512	6617		HFB7		-
PIP_513	6625		HFB4		GFPuv-7
PIP_514_1	6625		HFB4		GFPuv-7

Abkürzungen

Abkürzung	English	Deutsch
AOX	alcohol oxidase	Alkoholoxidase
ATPS	Aqueous Two-Phase System	wässriges Zwei-Phasen-System
BSA	bovine serum albumin	bovines Serumalbumin
CDW	cell dry weight	Trockenmasse der Zellen
DIC	differential interference contrast	Differentialinterferenzkontrast
DTT	dithiothreitol	Dithiothreitol
FCM	Flow Cytometry	Durchflusszytometer
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate	Fluoreszein-5-Isothiocyanat
fBSA	fluorescent bovine serum albumin	fluoreszierendes Serumalbumin
fWGA	fluorescent wheat germ agglutinin	Fluoreszierendes Weizenlektin
GFP	green fluorescent protein	Grün-fluoreszierendes Protein
HFB	hydrophobin	Hydrophobin
IB	inclusion body	Inklusionskörper
MP/NP	microparticles/nanoparticles	Mikropartikel/Nanopartikel
MUP	methanol utilization pathway	Methanol-Abbauweg
MWCO	molecular weight cut off	Molekulares Abtrenngewicht
OD	optical density	optische Dichte
PIP	<i>Pichia pastoris/P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris/P. pastoris</i>
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic) acid	Poly(lactid-co-glycolid)
RFP	red fluorescent protein	Rot-fluoreszierendes Protein
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis	Natrium-dodecyl-sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
UHQ	ultra-high-quality water	ultrareines Wasser

Geräteliste

Gerät	Firma
ABS – Advanced Biocontrol System	Secure Cell
Äkta	Äkta pure, GELife Sciences
Äkta Säule	HiLoad Superdex 75 pg prep. Size exclusion chromatography Säule, 5ml
Analysenwaage	Mettler Toledo AL204
ArcView	465 XL Hamilton
Autoklav	Systec V-Series
Flowcytometer	CytoSens Flow Cytometer, CytoBuoy
Fluoreszenzmikroskop	Olympus IX83
Grafikprogramm Lucillus	Secure Cell
HPLC	Agilent Technologies 1200 Series
Inkubator SDS-Proben	Eppendorf, Thermomixer comfort 2ml
Inkubator Vorkulturen	Infors HT, Multitron Pro (30°C, 150rpm)
Kugelmühle	Retsch, MM 400
Laminar Air Flow Bench	Vitaris, Scanlaf Mars
Lichtmikroskop	Leitz Laborlux S
Nu mera	Secure Cell
OD-Sonde + Verstärker	Hamilton
pH Puffer	Hamilton Duracal Buffer 4.01 & 7.0
pH-Messgerät	Metrohm 827 pH Lab
Reaktoren R11, R10, 16 L Stahl-Rührkessel	Bilfinger Industrie, Salzburg
Rotavapor	Büchi
Schüttler (SDS)	Stuart, mini see-saw rocker SSM4
SDS Power Supply	Amersham Biosciences
Tecan Plattenreader	Spark 20M
Trockenschrank	Heraeus kelvitron t (105°C)
Ultra Turrax	Omni International GLH
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex
Ultraschallstab	Bandelin Sonopuls HD 3100/3200
UV/Vis-Spektrophotometer	Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific
Vortex	Vortex-Genie 2, Scientific Industries
Waagen	Mettler
Wasserbad	Julabo TW20
Zentrifuge groß	Heraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific
Zentrifuge klein	Eppendorf Centrifuge 5424 R

Verwendete Medien

Medium 1:

BMGY by Invitrogen					
	M [g/mol]	1L	6L	[]	mischen und autoklavieren
Yeast extract		10	60	g	
Peptone		20	120	g	
Water		700	4200	ml	
10X GY		100	600	ml	
1M Potassium phosphate pH 6.0 ^A		100	600	ml	
10X YNB ^A		100	600	ml	
500X Biotin ^A		2	12	ml	

^A nach dem Autoklavieren unter dem Laminar Air Flow steril dazu filtrieren (falls die Stocklösungen noch nicht steril filtriert wurden)

Medium 2:

Modif. Hellwig et al., 2001 – Batch ohne Zusätze						
Mineral medium	Molecular formula	M [g/mol]	1L	6L	[]	mischen und autoklavieren
Glycerol (85%)	C ₃ H ₈ O ₃	92.09	35.29	211.74	g	
Water	H ₂ O	18	0.86	5.16	kg	
Potassium sulfate	K ₂ SO ₄	174.30	2.86	17.16	g	
Potassium hydroxide	KOH	56.11	0.64	3.84	g	
Magnesium sulfate heptahydrate	MgSO ₄ *7H ₂ O	246.47	2.32	13.92	g	
Calcium sulfate dihydrate	CaSO ₄ *2H ₂ O	172.17	0.17	1.02	g	
EDTA disodium salt dihydrate	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	292.24	0.60	3.6	g	
Phosphoric acid	H ₃ PO ₄	98.00	4.25	25.5	ml	
Sodium chloride	NaCl	58.50	0.22	1.32	g	
Antifoam agent, Polypropylenglycol	C ₆ H ₁₄ O ₃	134.175	0.10	0.6	ml	
PTM1 ^A			4.35	26.1	ml	
500X Biotin ^A			4.35	26.1	ml	
Inoculum ^A			0.10	0.6	L	

^A nach dem Autoklavieren unter dem Laminar Air Flow hinzugefügt

Stocklösungen:

10X YNB	M [g/mol]	1L	6L	[]	mischen und steril filtrieren
Yeast Nitrogen Base		134	804	g	
Water to a final volume of		1000	6000	ml	

10X GY	M [g/mol]	1L	6L	[]	
(a) Glycerol (100%)	92.1	138	828	g	a/b mit Wasser mischen und autoklavieren/steril filtrieren
ODER					
(b) Glycerol (85%)	92.1	139	834	g	

1M Potassium phosphate pH 6.0	M [g/mol]	1L	6L	[]	
1M K ₂ HPO ₄	147.2	143	858	ml	mischen und autoklavieren/steril filtrieren
1M KH ₂ PO ₄	136.2	144	864	ml	
H ₃ PO ₄ or KOH	to pH 6.0				

PTM1	Molecular formula	M [g/mol]	1L	[]	
Sulphuric acid conc. (96%)	H ₂ SO ₄	98.1	5	ml	alles steril in die Flasche(n) filtriert
Cupric sulfate	CuSO ₄	159.6	6.00	g	
Sodium iodide	NaI	149.9	0.08	g	
Manganese sulfate monohydrate	MnSO ₄ *H ₂ O	169	3	g	
Sodium molybdate dihydrate	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	241.9	0.2	g	
Boric acid	H ₃ BO ₃	61.83	0.02	g	
Cobalt chloride hexahydrate	CoCl ₂ *6H ₂ O	237.9	0.5	g	
Zinc chloride	ZnCl ₂	136.4	20	g	
Ferrous sulfate heptahydrate	FeSO ₄ *7H ₂ O	278	65	g	
Water (filtered 0.22µm) to a final volume of	H ₂ O	18	1	L	

500X Biotin	Molecular formula	M [g/mol]	0.5L	1L	[]	
Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244.31	0.1	0.2	g	steril filtriert
Water to a final volume of	H ₂ O	18	500	1000	ml	

Puffer für Äkta Size Exclusion Chromatography

50mM Na-Acetat Puffer pH 5.0 (1L)	Mass [g]	M [g/mol]
Na-Acetat*3H ₂ O	4.58	82.0343
Acetat	0.981	0.0163
H ₂ O	800	18.015

Rohdaten Kultivierung PIP_503

Time [h]	CDW_average [g/L]	Time [h]	OD_offline	Time [h]	Glycerol [g/L]	Time [h]	Methanol [g/L]
0,42	0,75	0,42	1,00	48,07	0,00	48,07	0,00
2,34	0,72	2,33	1,35	48,90	0,00	48,90	4,05
3,80	1,00	3,80	1,56	49,86	0,00	49,86	3,79
4,98	1,25	4,97	1,78	50,86	0,00	50,86	2,35
5,90	1,50	5,90	1,98	51,86	0,00	51,86	2,32
6,97	1,43	6,97	2,24	52,87	0,00	52,87	0,90
7,94	2,30	7,94	2,60	53,87	0,00	53,87	0,86
8,83	2,73	8,84	3,07	54,87	0,00	54,87	2,61
23,42	18,95	23,43	35,22	55,86	0,00	55,86	4,69
24,09	18,57	24,10	31,85	48,07	0,00	48,07	0,00
25,17	18,97	25,16	31,95	48,90	0,00	48,90	4,05
26,14	18,73	28,57	30,70	49,86	0,00	49,86	3,79
28,57	18,77	29,30	33,82	50,86	0,00	50,86	2,35
30,42	19,27	30,42	31,54	51,86	0,00	51,86	2,32
32,17	19,45	32,17	31,80	52,87	0,00	52,87	0,90
32,48	18,90	32,47	32,51	53,87	0,00	53,87	0,86
47,44	20,03	47,43	41,06	54,87	0,00	54,87	2,61
119,68	26,90	48,36	36,06	55,86	0,00	55,86	4,69
		49,21	36,66				
		50,15	32,43				
		51,16	35,10				
		52,15	44,22				
		119,68	52,86				

Rohdaten Kultivierung PIP_504

Time [h]	CDW_average [g/L]	Time [h]	OD_offline	Time [h]	Glycerol [g/L]	Time [h]	Methanol [g/L]
0,53	1,33	0,52	2,04	48,15	0,00	48,15	0,00
2,46	1,93	2,46	2,62	48,52	0,00	48,52	0,00
4,50	1,25	4,50	3,66	49,49	0,00	49,49	3,59
7,27	2,38	7,35	6,72	50,47	0,00	50,47	3,08
8,42	3,98	8,42	9,02	52,47	0,00	52,47	1,71
23,46	18,90	23,45	38,32	53,51	0,00	53,51	0,78
23,96	19,05	23,96	39,33	54,49	0,00	54,49	0,42
25,53	19,05	25,52	38,43	55,49	0,00	55,49	0,00
28,39	18,80	28,40	37,63	56,22	0,00	56,22	0,00
30,47	19,25	30,48	47,75	72,17	0,00	72,17	0,00
32,30	19,13	32,13	46,30				
48,20	19,93	48,21	47,70				
48,57	19,75	48,58	46,30				
49,58	21,08	49,58	48,10				
50,47	20,75	50,48	48,05				
52,47	21,15	52,48	49,45				
53,50	21,50	53,50	49,70				
54,48	21,53	54,48	49,75				
55,48	21,63	55,48	49,80				
56,23	21,98	56,22	49,85				
72,18	23,30	72,17	51,45				

Rohdaten Kultivierung PIP_506

Time [h]	CDW_average [g/L]	Time [h]	OD_offline	Time [h]	Glycerol [g/L]	Time [h]	Methanol [g/L]
0,55	1,58	0,55	2,48	30,11	0,00	30,11	1,68
2,46	1,78	2,46	2,75	58,54	0,00	58,54	3,21
4,56	2,35	4,55	3,41	60,28	0,00	60,28	2,36
6,56	2,83	6,56	4,51	62,28	0,00	62,28	1,26
8,50	4,15	8,49	6,35	64,28	0,00	64,28	0,00
23,22	21,28	23,22	51,55	66,28	0,00	66,28	0,00
23,68	21,05	23,70	53,25	68,28	0,00	68,28	0,00
25,85	21,00	25,85	51,00	70,28	0,00	70,28	0,00
27,80	21,03	27,80	52,00	77,10	0,00	77,10	0,00
29,69	21,50	29,69	52,20	78,06	0,00	78,06	0,00
31,60	20,93	31,55	51,00	78,92	0,00	78,92	2,27
47,25	20,83	47,25	50,70	79,71	0,00	79,71	10,88
49,29	21,33	49,29	52,25	81,80	0,00	81,80	8,02
50,20	20,33	50,20	51,45	83,80	0,00	83,80	5,73
52,34	20,35	52,34	51,05	85,80	0,00	85,80	3,64
54,44	21,08	54,44	52,50	87,80	0,00	87,80	1,99
56,25	21,20	56,25	54,20	89,80	0,00	89,80	0,90
71,27	22,63	71,27	59,00	91,80	0,00	91,80	0,00
71,50	22,65	71,50	59,70	93,80	0,00	93,80	0,00
73,56	22,78	73,55	58,30	95,36	0,00	95,36	8,64
75,50	23,48	75,51	59,80	97,45	0,00	97,45	6,08
77,47	24,18	77,47	63,35	99,67	0,00	99,67	3,97
79,42	24,65	79,41	62,70	101,36	0,00	101,36	2,70
95,24	27,33	95,23	66,55				
97,57	28,00	97,57	66,65				
99,47	28,65	99,47	72,90				
101,38	29,23	101,38	60,10				
102,79	31,35	102,79	62,25				

Rohdaten Kultivierung PIP_508

Time [h]	CDW_average [g/L]	Time [h]	OD_offline	Time [h]	Glycerol [g/L]	Time [h]	Methanol [g/L]
1,33	1,13	0,43	2,64	74,03	0,00	74,03	0,00
25,33	0,90	2,46	2,89	74,81	0,00	74,81	8,79
49,33	2,10	4,34	3,29	76,37	0,00	76,37	6,84
73,33	2,33	6,34	3,99	78,38	0,00	78,38	0,00
97,33	3,20	8,27	5,45	80,34	0,00	80,34	16,93
121,33	20,48	23,83	50,00	82,38	0,00	82,38	0,00
146,33	19,92	24,19	47,85	84,38	0,00	84,38	11,17
170,33	20,38	26,30	49,95	86,38	0,00	86,38	8,48
194,33	20,17	28,23	47,60	88,38	0,00	88,38	0,00
218,33	20,60	30,34	50,95	90,38	0,00	90,38	0,00
242,33	20,63	32,25	49,45	92,38	0,00	92,38	2,22
266,33	19,20	47,80	50,15	94,38	0,00	94,38	0,00
290,33	20,98	49,87	48,30	96,67	0,00	96,67	11,71
314,33	21,70	52,07	52,05	98,70	0,00	98,70	9,10
338,33	21,85	53,90	52,10	100,36	0,00	100,36	7,02
362,33	21,52	55,83	49,30	101,36	0,00	101,36	5,91
386,33	24,38	71,87	57,10	103,44	0,00	103,44	22,25
410,33	24,38	74,39	57,35				
434,33	25,15	76,37	60,10				
458,33	25,63	78,38	57,70				
482,33	26,40	80,35	60,50				
506,33	30,15	96,12	64,35				
530,33	28,65	96,67	70,50				
554,33	29,10	98,74	68,20				
578,33	30,55	103,10	69,80				
602,33	31,28						

Rohdaten Kultivierung PIP_510

Time [h]	CDW_average [g/L]	Time [h]	OD_offline	Time [h]	Glycerol [g/L]	Time [h]	Methanol [g/L]
0,48	0,53	0,58	1,72	2,08	30,93	2,08	0,00
1,52	0,43	1,58	0,89	3,64	34,81	3,64	0,00
2,58	0,70	2,58	1,71	6,64	34,21	6,64	0,00
3,72	0,77	3,58	1,91	9,64	33,96	9,64	0,00
6,04	0,92	5,91	1,93	12,64	0,00	12,64	0,00
7,05	0,47	6,91	2,07	15,64	35,01	15,64	0,00
7,88	1,23	7,92	1,98	18,64	34,00	18,64	0,00
9,03	0,45	8,92	1,95	21,62	32,34	21,62	0,00
13,96	0,68	13,82	2,75	26,14	24,19	26,14	0,00
13,99	0,58	13,97	2,23	29,14	8,61	29,14	0,00
23,63	4,50	23,62	7,65	31,64	1,47	31,64	1,81
24,60	5,88	24,57	11,51	33,62	0,00	33,62	2,49
25,62	7,53	25,57	14,03	36,62	0,00	36,62	2,14
26,58	10,00	26,57	19,58	39,62	0,00	39,62	0,00
27,39	12,45	27,49	23,60	47,62	0,00	47,62	0,00
29,67	22,60	29,66	39,73	53,63	0,00	53,63	2,52
30,57	21,55	30,67	43,00	56,13	0,00	56,13	4,82
31,34	18,95	31,32	48,85	57,65	0,00	57,65	4,94
31,36	21,63	31,34	51,15	60,65	0,00	60,65	4,94
32,37	21,27	32,32	53,63	63,65	0,00	63,65	4,75
33,30	21,30	33,33	56,56	66,65	0,00	66,65	4,72
47,54	21,60	47,58	38,13	69,63	0,00	69,63	4,65
48,58	22,05	48,58	45,63				
49,52	21,70	49,58	49,81				
50,61	21,65	50,58	41,75				
51,51	22,27	51,58	52,95				
52,52	22,20	52,58	42,95				
53,52	22,95	53,58	43,30				
54,50	23,02	54,58	44,85				
55,61	22,65	55,57	43,75				
56,21	23,18	56,23	48,25				
71,42	25,65	71,41	52,70				
72,33	27,72	72,41	55,10				

Rohdaten Kultivierung PIP_511

Time [h]	CDW_average [g/L]	Time [h]	OD_offline	Time [h]	Glycerol [g/L]	Time [h]	Methanol [g/L]
0,47	0,83	0,46	1,54	1,14	28,04	1,14	0,00
1,54	0,53	1,54	1,95	1,52	28,13	1,52	0,00
2,55	0,90	2,50	2,00	4,96	31,54	4,96	0,00
3,52	0,59	3,51	2,18	7,31	29,53	7,31	0,00
5,48	1,03	5,51	2,60	10,31	9,60	10,31	0,00
6,45	1,03	6,50	3,05	13,31	17,03	13,31	0,00
7,46	1,47	7,50	4,56	16,31	0,37	16,31	0,00
8,44	2,30	8,51	5,55	19,31	0,40	19,31	0,00
23,50	18,02	23,51	40,68	22,31	0,32	22,31	0,00
24,81	18,47	24,75	42,20	24,31	0,00	24,31	2,66
25,56	18,37	25,50	41,96	24,79	0,00	24,79	0,00
26,56	18,62	26,51	42,05	25,31	0,00	25,31	2,60
27,51	18,22	27,51	40,30	26,31	0,32	26,31	2,54
29,45	18,40	29,51	37,28	27,31	0,00	27,31	0,00
30,48	18,35	30,51	44,70	28,48	0,00	28,48	2,28
31,45	18,25	31,51	48,95	31,80	0,00	31,80	0,00
32,42	18,45	32,50	52,30	47,81	0,00	47,81	0,00
47,27	20,20	47,25	40,80	53,80	0,00	53,80	13,15
48,52	19,70	48,50	40,45	56,31	0,00	56,31	17,89
49,41	19,62	49,51	42,50	58,32	0,00	58,32	22,05
50,43	19,38	50,51	41,80	61,32	0,00	61,32	27,20
51,67	20,73	51,58	41,40	64,32	0,00	64,32	30,69
52,43	19,73	52,51	42,90	67,32	0,00	67,32	32,42
53,43	20,62	53,43	42,95	70,32	0,00	70,32	35,74
54,51	20,77	54,50	43,10				
55,56	21,08	55,50	43,65				
55,97	20,80	56,00	46,35				
71,26	22,82	71,50	52,05				

Rohdaten Kultivierung PIP_512

Time [h]	CDW_average [g/L]	Time [h]	OD_offline	Time [h]	Glycerol [g/L]	Time [h]	Methanol [g/L]
0,59	0,95	0,60	1,81	0,73	33,23	0,73	0,00
1,76	1,43	1,76	2,18	3,32	31,90	3,32	0,00
2,63	1,30	2,59	2,41	6,33	30,45	6,33	0,00
3,66	1,98	3,66	2,77	9,33	26,31	9,33	0,00
4,60	1,93	4,59	3,46	12,33	15,56	12,33	0,00
5,60	2,67	5,59	3,75	15,33	0,75	15,33	0,00
6,56	2,95	6,60	4,23	18,32	0,00	18,32	0,00
7,55	3,55	7,60	6,21	21,31	0,00	21,31	0,00
8,56	5,00	8,63	6,76	24,32	0,00	24,32	3,83
23,42	20,30	23,32	42,20	25,84	0,00	25,84	4,81
24,22	20,65	24,23	42,35	27,32	0,00	27,32	4,65
25,28	20,33	25,26	44,70	28,84	0,00	28,84	4,38
26,41	18,88	26,41	48,60	30,32	0,00	30,32	4,02
27,21	20,37	27,26	46,60	31,84	0,00	31,84	3,48
28,36	19,15	28,25	51,55	33,63	0,00	33,63	2,81
29,48	21,70	29,54	42,85	34,81	0,00	34,81	0,00
30,30	21,55	30,52	43,50	36,63	0,00	36,63	0,00
31,55	21,60	31,50	42,55	37,81	0,00	37,81	0,00
32,52	20,50	32,52	45,25	39,63	0,00	39,63	0,00
47,32	22,13	47,32	47,85	40,81	0,00	40,81	0,00
48,40	21,55	48,39	43,70	42,63	0,00	42,63	0,00
49,27	22,48	49,31	42,75	43,81	0,00	43,81	0,00
50,27	21,35	50,25	42,30	45,63	0,00	45,63	0,00
51,17	22,32	51,27	41,40	46,81	0,00	46,81	0,00
52,12	21,95	52,26	41,00	54,32	0,00	54,32	0,00
53,30	23,42	53,27	47,45	58,33	0,00	58,33	5,48
54,32	23,20	54,26	45,15	62,32	0,00	62,32	6,06
55,33	23,47	55,26	47,75	66,32	0,00	66,32	10,55
56,26	23,95	71,34	58,65	70,32	1,29	70,32	5,22
71,35	28,78	72,40	58,90	71,33	28,15	71,33	2,61
72,42	28,78						

Rohdaten Kultivierung PIP_513

Time [h]	CDW_average [g/L]	Time [h]	OD_offline	Time [h]	Glycerol [g/L]	Time [h]	Methanol [g/L]
0,84	0,50	0,84	2,04	1,29	0,28	1,29	0,00
1,88	1,37	1,88	2,46	4,29	0,29	4,29	0,00
2,81	1,35	2,81	2,09	7,29	0,33	7,29	0,00
3,75	18,30	3,83	2,63	10,29	0,28	10,29	0,00
4,80	1,33	4,84	2,01	13,29	0,00	13,29	0,00
6,76	35,52	5,93	2,70	16,29	0,00	16,29	0,00
7,74	35,00	6,94	2,80	19,29	0,00	19,29	0,00
23,22	17,00	7,93	3,18	22,28	0,00	22,28	0,00
24,00	14,65	8,69	3,38	23,93	0,00	23,93	4,10
25,81	17,50	23,99	31,90	25,36	0,00	25,36	4,77
26,06	16,75	24,88	32,60	26,79	0,00	26,79	4,45
26,96	15,82	25,78	31,20	28,36	0,00	28,36	3,80
27,83	17,50	26,81	33,35	29,74	0,00	29,74	0,00
29,26	17,20	27,93	34,00	31,36	0,00	31,36	0,00
29,74	16,98	29,27	33,80	32,79	0,00	32,79	0,00
30,81	17,05	29,85	32,60	34,29	0,00	34,29	0,00
31,85	16,90	30,86	30,30	35,79	0,00	35,79	0,00
32,79	16,97	31,91	31,70	37,29	0,00	37,29	0,00
47,12	16,95	32,75	32,15	38,79	0,00	38,79	0,00
48,41	16,60	47,54	36,05	40,29	0,00	40,29	0,00
49,48	16,98	48,41	30,85	41,79	0,00	41,79	0,00
50,38	17,20	49,47	33,50	43,29	0,00	43,29	0,00
51,56	17,03	50,48	32,30	44,79	0,00	44,79	0,00
53,13	17,42	51,51	32,75	46,29	0,00	46,29	0,00
54,32	16,87	53,12	32,35	53,78	0,00	53,78	5,45
55,46	17,90	54,33	31,75	57,78	0,00	57,78	7,81
56,42	16,75	55,33	33,45	61,78	0,00	61,78	9,93
71,29	18,90	71,26	33,85	65,78	0,00	65,78	19,74
72,10	19,57	72,13	32,30	69,77	80,44	69,77	9,20
				71,78	0,00	71,78	0,00

Rohdaten Kultivierung PIP_514

Time [h]	CDW_average [g/L]	Time [h]	OD_offline	Time [h]	Glycerol [g/L]	Time [h]	Methanol [g/L]
0,12	1,08	0,11	2,45	27,85	0,00	27,85	0,00
2,08	1,17	2,07	2,83	28,73	0,00	28,73	0,00
3,95	1,30	3,96	3,35	30,11	0,00	30,11	0,00
5,95	2,07	5,95	4,30	31,08	0,00	31,08	0,00
7,52	3,08	7,52	5,52	34,08	0,00	34,08	0,00
23,33	19,33	23,33	44,80	37,08	0,00	37,08	0,00
24,65	19,23	24,64	44,80	40,08	0,00	40,08	0,00
26,34	21,80	26,34	49,45	43,08	0,00	43,08	0,00
28,73	24,55	28,72	54,60	47,45	0,00	47,45	0,00
30,95	27,80	30,94	62,75	48,11	0,00	48,11	6,33
47,37	49,25	47,36	126,40	49,55	0,00	49,55	5,58
49,54	48,02	49,54	119,80	51,44	0,00	51,44	3,30
51,60	47,67	51,59	117,00	53,58	0,00	53,58	0,00
53,60	48,45	53,59	134,00	57,66	0,00	57,66	3,05
119,35	56,92	119,34	197,80	60,63	0,00	60,63	8,99
121,82	69,78	121,82	148,60	63,63	0,00	63,63	12,16
123,75	56,07	123,76	147,80	66,63	0,00	66,63	14,07
125,57	57,00	125,58	154,40	69,63	0,00	69,63	17,47
127,88	56,80	127,89	154,00	72,63	0,00	72,63	0,00
143,27	56,13	143,27	143,60	75,63	0,00	75,63	24,57
143,27	56,13	145,15	150,60	78,63	0,00	78,63	0,00
145,16	56,17	147,93	157,20	86,59	0,00	86,59	0,00
145,16	56,17	149,56	166,80	89,58	0,00	89,58	11,22
147,92	56,35	151,61	164,80	92,58	0,00	92,58	0,00
147,92	56,35	167,78	164,00	95,58	0,00	95,58	0,00
149,56	56,60	169,80	173,80	98,58	0,00	98,58	0,00
149,56	56,60	172,13	160,00	101,58	0,00	101,58	0,00
151,61	57,13	174,04	159,00	104,58	0,00	104,58	0,00
151,61	57,13	191,32	175,60	122,30	0,00	122,30	0,00
167,78	59,43			123,82	0,00	123,82	5,41
167,78	59,43			125,57	0,00	125,57	0,00
169,85	60,37			127,88	0,00	127,88	12,11
169,85	60,37			130,83	0,00	130,83	16,54
172,12	60,77			133,83	0,00	133,83	0,00
172,12	60,77			136,83	0,00	136,83	0,00
174,04	61,10			139,83	0,00	139,83	0,00
174,04	61,10			142,83	0,00	142,83	0,00
191,33	62,65			145,33	0,00	145,33	0,00
191,33	62,65						