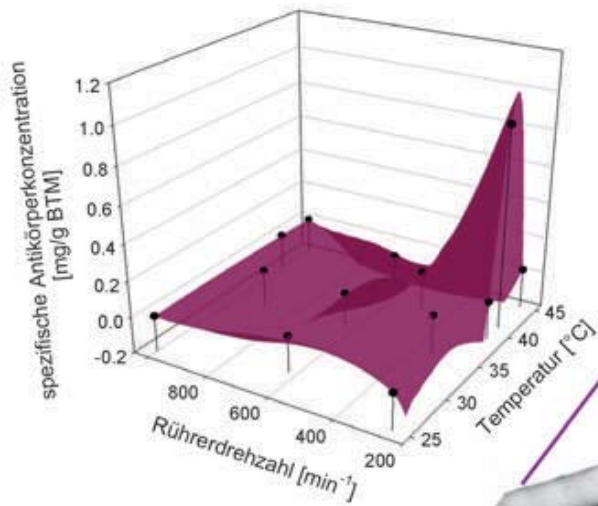




Technische
Universität
Braunschweig



Prozess- und Proteomanalyse gestresster Mikroorganismen

Svenja Lüders

ibvt-Schriftenreihe

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik
der Technischen Universität Braunschweig

Herausgegeben von Prof. Dr. Christoph Wittmann

Band 49

Cuvillier-Verlag
Göttingen, Deutschland

Herausgeber
Prof. Dr. Christoph Wittmann
Institut für Bioverfahrenstechnik
TU Braunschweig
Gaußstraße 17, 38106 Braunschweig
www.ibvt.de

Hinweis: Obgleich alle Anstrengungen unternommen wurden, um richtige und aktuelle Angaben in diesem Werk zum Ausdruck zu bringen, übernehmen weder der Herausgeber, noch der Autor oder andere an der Arbeit beteiligten Personen eine Verantwortung für fehlerhafte Angaben oder deren Folgen. Eventuelle Berichtigungen können erst in der nächsten Auflage berücksichtigt werden.

Bibliographische Informationen der Deutschen Nationalbibliothek

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

1. Aufl. – Göttingen: Cuvillier, 2010

© Cuvillier-Verlag · Göttingen 2010
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte, auch das der Übersetzung, vorbehalten

Dieses Werk – oder Teile daraus – darf nicht vervielfältigt werden, in Datenbanken gespeichert oder in irgendeiner Form – elektronisch, foto-mechanisch, auf Tonträger oder sonst wie – übertragen werden ohne die schriftliche Genehmigung des Verlages.

1. Auflage, 2010

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 978-3-86955-435-8

ISSN 1431-7230

Prozess- und Proteomanalyse gestresster Mikroorganismen

Bei der Fakultät für Maschinenbau
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung der Würde

einer Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

von: Dipl.-Biol. Svenja Lüders

aus: Helmstedt

eingereicht am: 19.12.2009

mündliche Prüfung am: 05.02.2010

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. R. Krull

1. Referent: Juniorprof. Dr.-Ing. E. Franco-Lara

2. Referent: Prof. Dr. D. Jahn

2010

Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit der Genehmigung der Fakultät für Maschinenbau, vertreten durch Herrn Juniorprof. Dr.-Ing. E. Franco-Lara, in folgenden Beiträgen bereits veröffentlicht:

Poster

S. Lüders, C. Fallet, E. Franco-Lara, Proteomanalyse der stationären *Escherichia coli* Hitzeschockantwort, Biokatalyse: neue Verfahren, neue Produkte, 18.5.-20.5.2009 Bad Schandau

S. Lüders, C. Fallet, E. Franco-Lara, Proteomanalyse der stationären *Escherichia coli* Hitzeschockantwort, BMBF BioFuture 2009

F. David, F. Schädel, S. Lüders, T. Namuth, E. Franco-Lara, Metabolische Prozessanalyse und -optimierung bakterieller Kultivierungen (*Bacillus megaterium*), SFB 578 Berichtskolloquium 2007.

Fachartikel

S. Lüders, C. Fallet, and E. Franco-Lara, Proteome Analysis of the *Escherichia coli* Heat Shock Response under Steady-State Conditions, Proteome Science 2009, 7:36 doi:10.1186/1477-5956-7-36

-
- Band 1** **Sunder, Matthias:** Oxidation grundwasserrelevanter Spurenverunreinigungen mit Ozon und Wasserstoffperoxid im Rohrreaktor. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-00-4
- Band 2** **Pack, Hubertus:** Schwermetalle in Abwasserströmen: Biosorption und Auswirkung auf eine schadstoffabbauende Bakterienkultur. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-01-2
- Band 3** **Brüggenhies, Antje:** Biologische Reinigung EDTA-haltiger Abwässer. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-02-0
- Band 4** **Liebelt, Uwe:** Anaerobe Teilstrombehandlung von Restflotten der Reaktivfärberei. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-03-9
- Band 5** **Mann, Volker G.:** Optimierung und Scale up eines Suspensionsreaktorverfahrens zur biologischen Reinigung feinkörniger, kontaminierter Böden. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-04-7
- Band 6** **Boll Marco:** Einsatz von Fuzzy-Control zur Regelung verfahrenstechnischer Prozesse. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-06-3
- Band 7** **Büscher, Klaus:** Bestimmung von mechanischen Beanspruchungen in Zweiphasenreaktoren. 1997. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-07-1
- Band 8** **Burghardt, Rudolf:** Alkalische Hydrolyse – Charakterisierung und Anwendung einer Aufschlußmethode für industrielle Belebtschlämme. 1998. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-13-6
- Band 9** **Hemmi, Martin:** Biologisch-chemische Behandlung von Färbereiabwässern in einem Sequencing Batch Process. 1999. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-14-4
- Band 10** **Dziallas, Holger:** Lokale Phasengehalte in zwei- und dreiphasig betriebenen Blasensäulenreaktoren. 2000. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-15-2
- Band 11** **Scheminski, Anke:** Teiloxidation von Faulschlammern mit Ozon. 2001. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-16-0
- Band 12** **Mahnke, Eike Ulf:** Fluidodynamisch induzierte Partikelbeanspruchung in pneumatisch gerührten Mehrphasenreaktoren. 2002. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-17-9
- Band 13** **Michele, Volker:** CDF modeling and measurement of liquid flow structure and phase holdup in two- and three-phase bubble columns. 2002. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-18-7

-
- Band 14** **Wäsche, Stefan:** Einfluss der Wachstumsbedingungen auf Stoffübergang und Struktur von Biofilmsystemen. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-19-5
- Band 15** **Krull Rainer:** Produktionsintegrierte Behandlung industrieller Abwässer zur Schließung von Stoffkreisläuren. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-20-9
- Band 16** **Otto, Peter:** Entwicklung eines chemisch-biologischen Verfahrens zur Reinigung EDTA enthaltender Abwässer. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-21-7
- Band 17** **Horn, Harald:** Modellierung von Stoffumsatz und Stofftransport in Biofilmsystemen. 2003. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-22-5
- Band 18** **Mora Naranjo, Nelson:** Analyse und Modellierung anaerober Abbauprozesse in Deponien. 2004. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-23-3
- Band 19** **Döpfens, Eckart:** Abwasserbehandlung und Prozesswasserrecycling in der Textilindustrie. 2004. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-24-1
- Band 20** **Haarstrick, Andreas:** Modellierung millieugesteuerter biologischer Abbauprozesse in heterogenen problembelasteten Systemen. 2005. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-27-6
- Band 21** **Baaß, Anne-Christina:** Mikrobieller Abbau der Polyaminopolycarbonsäuren Propylendiamintetraacetat (PDTA) und Diethylentriaminpentaacetat (DTPA). 2004. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-26-8
- Band 22** **Staudt, Christian:** Entwicklung der Struktur von Biofilmen. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-28-4
- Band 23** **Pilz, Roman Daniel:** Partikelbeanspruchung in mehrphasig betriebenen Airlift-Reaktoren. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-29-2
- Band 24** **Schallenberg, Jörg:** Modellierung von zwei- und dreiphasigen Strömungen in Blasensäulenreaktoren. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-30-6

-
- Band 25** **Enß, Jan Hendrik:** Einfluss der Viskosität auf Blasensäulenströmungen. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-31-4
- Band 26** **Kelly, Sven:** Fluidodynamischer Einfluss auf die Morphogenese von Biopellets filamentöser Pilze. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-32-2
- Band 27** **Grimm, Luis Hermann:** Sporenaggregationsmodell für die submerse Kultivierung koagulativer Myzelbildner. 2006. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-33-0
- Band 28** **León Ohi, Andrés:** Wechselwirkungen von Stofftransport und Wachstum in Biofilmsystemen. 2007. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-34-9
- Band 29** **Emmler, Markus:** Freisetzung von Glucoamylase in Kultivierungen mit *Aspergillus niger*. 2007. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-35-7
- Band 30** **Leonhäuser, Johannes:** Biotechnologische Verfahren zur Reinigung von quecksilberhaltigem Abwasser. 2007. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 3-932252-36-5
- Band 31** **Jungebloud, Anke:** Untersuchung der Genexpression in *Aspergillus niger* mittels Echtzeit-PCR. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-37-2
- Band 32** **Hille, Andrea:** Stofftransport und Stoffumsatz in filamentösen Pilzpellets. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-38-9
- Band 33** **Fürch, Tobias:** Metabolic characterization of recombinant protein production in *Bacillus megaterium*. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-39-6
- Band 34** **Grote, Andreas Georg:** Datenbanksysteme und bioinformatische Werkzeuge zur Optimierung biotechnologischer Prozesse mit Pilzen. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-40-120
- Band 35** **Möhle, Roland Bernhard:** An Analytic-Synthetic Approach Combining Mathematical Modeling and Experiments – Towards an Understanding of Biofilm Systems. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-41-9

-
- Band 36** **Reichel, Thomas:** Modelle für die Beschreibung des Emissionsverhaltens von Siedlungsabfällen. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-42-6
- Band 37** **Schultheiss, Ellen:** Charakterisierung des Exopolysaccharids PS-EDIV von *Sphingomonas pituitosa*. 2008. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-43-3
- Band 38** **Dreger, Michael Andreas:** Produktion und Aufarbeitung des Exopolysaccharids PS-EDIV aus *Sphingomonas pituitosa*. 1996. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-44-0
- Band 39** **Wiebels, Cornelia:** A Novel Bubble Size Measuring Technique for High Bubble Density Flows. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-45-7
- Band 40** **Bohle, Kathrin:** Morphologie- und produktionsrelevante Gen- und Proteinexpression in submersen Kultivierungen von *Aspergillus niger*. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-46-2
- Band 41** **Fallet, Claas:** Reaktionstechnische Untersuchungen der mikrobiellen Stressantwort und ihrer biotechnologischen Anwendungen. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-47-1
- Band 42** **Vetter, Andreas:** Sequential Co-simulation as Method to Couple CFD and Biological Growth in a Yeast. 2009. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-48-8
- Band 43** **Jung, Thomas:** Einsatz chemischer Oxidationsverfahren zur Behandlung industrieller Abwässer. 2010. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-49-5
- Band 45** **Herrmann, Tim:** Transport von Proteinen in Partikeln der Hydrophoben Interaktions Chromatographie. 2010. FIT-Verlag · Paderborn, ISBN 978-3-932252-51-8
- Band 46** **Becker, Judith:** Systems Metabolic Engineering of *Corynebacterium glutamicum* towards improved Lysine Production. 2010. Cuvillier-Verlag · Göttingen, ISBN 978-3-86955-426-6

Prozess- und Proteomanalyse gestresster Mikroorganismen

Inhalt: In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Temperatur, des mechanischen Stresses und die Produktion rekombinanter Proteine auf Mikroorganismen auf Prozess- und Proteomebene analysiert. Diese Stressfaktoren wurden im Zusammenhang mit der stationären *Escherichia coli* Hitzeschockantwort in einer kontinuierlichen Reaktorkaskade sowie während der heterologen Produktion eines Antikörperfragmentes in *Bacillus megaterium* untersucht.

Im ersten Projekt ermöglichte es die Versuchsanordnung einer Reaktorkaskade, *E. coli*-Zellen einem konstanten, definierten Temperaturstress bei einer konstanten Durchflussrate auszusetzen. Die Proteomanalyse zeigte neben der verstärkten Expression von Chaperonen und Proteasen einen aufgrund der höheren Temperatur verursachten oxidativen Stress. Die Aminosäurebiosynthese sowie Enzyme des Zentralstoffwechsels wurden ebenso verstärkt gebildet wie Proteine, die an der alternativen Substrataufnahme aus dem umgebenden Medium beteiligt sind.

Im zweiten Projekt konnte die Analyse und Optimierung der heterologen Antikörperfragmentproduktion in *B. megaterium* zeigen, dass neben der Temperatur sich vor allem der mechanische Stress signifikant auf die Produktivität sowie auf die Zellgröße, die Aktivität und das Wachstum auswirkten. Die Proteomanalyse des heterologen Produktionsstresses zeigte die verstärkte Expression von Proteasen, einem Chaperon sowie Proteinen der Aminosäurebiosynthese und den verstärkten Transport von Peptiden aus dem Medium. Der mechanische Stress führte zum Induktionszeitpunkt zu einem höheren oxidativen Stress und höheren Expressionslevel der Protease ClpP und des Chaperons GrpE. In der Produktionsphase konnte bei einer geringeren mechanischen Belastung die verstärkte Expression des OppA-Proteins, das an der Aufnahme von Peptiden beteiligt ist, sowie Chaperonaktivität beobachtet werden. In dieser Arbeit wurde deutlich, dass die detaillierte Analyse des Einflusses verschiedener Stressfaktoren auf Bakterienzellen viele Möglichkeiten aufzeigen kann, biotechnologische Prozesse auf Basis der Proteomanalyse zu optimieren.

Suchbegriffe: *Escherichia coli*, Hitzeschock, Bioreaktorkaskade, *Bacillus megaterium*, Antikörperfragment scFv, mechanischer Stress, 2D-Gelelektrophorese

Contents: In the present work the influence of the temperature, mechanical stress and heterologous protein production on microorganisms was analysed. These stress factors were investigated in the context of the stationary heat shock response of *Escherichia coli* and the heterologous antibody fragment production with *Bacillus megaterium*.

In the first project the experimental platform of the continuously operated bioreactor cascade provided the possibility of a constant, defined stress analysis. The proteome analysis revealed increased expression of chaperones and proteases and an oxidative stress response interrelated to the high temperature. The amino acid biosynthesis, the central metabolic pathway as well as proteins expression associated with the uptake of alternative substrates were also upregulated under heat shock conditions.

In the second project the analysis and the optimization of the antibody fragment production in *B. megaterium* demonstrated the significant influence of the mechanical stress and the cultivation temperature on the productivity but also on cell size, cell activity and the bacterial growth. The corresponding proteome analysis of the heterologous protein production indicated an increased expression of a protease and proteins related to amino acid biosynthesis and an enhanced uptake of peptides. The mechanical stress at the time of induction caused an increased oxidative stress expression of the protease ClpP and the chaperone GrpE. During the production phase a reduced mechanical stress caused the significant upregulation of OppA, which is involved in the uptake of peptides and additionally displays chaperone activity.

This work highlights how the detailed analysis of different stress factors that affect bacterial cells which can reveal possibilities to optimize biotechnological processes based on proteome analysis.

Key words: *Escherichia coli*, heat shock, bioreactor cascade, *Bacillus megaterium*, antibody fragment scFv, mechanical stress, two-dimensional gel electrophoresis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Aufgabenstellung	3
3	Theorie	4
3.1	Stationäre <i>Escherichia coli</i> Hitzeschockantwort in kontinuierlicher Bioreaktorkaskade	4
3.1.1	Die <i>Escherichia coli</i> Hitzeschockantwort	4
3.1.2	Stationärphase und generelle Stressantwort	6
3.1.3	Die kontinuierlich betriebene Bioreaktorkaskade	7
3.2	Rekombinante Antikörperproduktion in <i>Bacillus megaterium</i>	8
3.2.1	SFB 578 - Vom Gen zum Produkt	8
3.2.2	<i>Bacillus megaterium</i>	9
3.2.3	Produktion und Sekretion homologer und heterologer Proteine in der Gattung <i>Bacillus</i>	11
3.3	Aufbau, Herstellung und therapeutische Anwendung von Antikörpern	14
3.4	Die rekombinante Proteinproduktion in <i>Bacillus megaterium</i>	17
3.5	Proteomanalyse	18
4	Material und Methoden	21
4.1	Chemikalien	21
4.2	Bakterienstämme und Plasmide	21
4.3	Medien und Medienzusätze	23
4.4	Kultivierung	25
4.4.1	Sterilisation	25
4.4.2	Vorkulturen	25
4.4.3	Kryokulturen	25
4.4.4	Kultivierung in der Mikrotiterplatte	26
4.4.5	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> in einer kontinuierlichen Bioreaktorkaskade	26
4.4.6	Batch-Kultivierung <i>Bacillus megaterium</i>	28
4.4.6.1	Bioreaktoren	28
4.4.6.2	Anlagenkonfiguration	29
4.4.6.3	Batch-Kultivierung	29
4.4.6.4	On-line Analytik	30

4.5	Experimentelles Design	30
4.5.1	Einfluss des mechanischen Stresses und der Temperatur auf die Produktion des Antikörperfragmentes scFv D1.3 in <i>B. megaterium</i>	31
4.6	Kultivierungsbegleitende Analytik	33
4.6.1	Bestimmung der Biotrockenmasse	33
4.6.2	Bestimmung der optischen Dichte	33
4.6.3	Messung des Glukosegehalts im Medium	33
4.6.4	Durchflusszytometrie.....	34
4.6.5	Messung externer Metabolite mittels high performance liquid chromatography (HPLC)	34
4.6.6	Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	35
4.7	Proteinanalytik.....	36
4.7.1	Probenvorbereitung für die Proteinanalytik.....	36
4.7.2	Zellaufschluss.....	36
4.7.3	Extraktion der Proteine.....	37
4.7.4	Anreicherung von Membranproteinen.....	38
4.7.4.1	Anreicherung von Membranproteinen mittels Triton-X-114.....	38
4.7.4.2	Anreicherung von Membranproteinen mittels Natriumcarbonat	38
4.7.4.3	Anreicherung von Membranproteinen mittels Rehydratationspuffer	39
4.7.5	Isoelektrische Fokussierung.....	39
4.7.6	Separation der Proteine durch SDS-Gelelektrophorese	40
4.7.7	Spaltung und Identifikation der Proteine	40
4.7.8	Eindimensionale SDS-Gelelektrophorese.....	41
5	Ergebnisse und Diskussion.....	43
5.1	Proteomanalyse der stationären <i>Escherichia coli</i> Hitzeschockantwort.....	43
5.1.1	Biochemische Analyse der stationären Hitzeschockantwort.....	43
5.1.2	Proteine der oxidativen Stressantwort	47
5.1.3	Proteine der Zellhülle	48
5.1.4	Proteinbiosynthese und Chaperone.....	50
5.1.5	Enzyme des Energiestoffwechsels	52
5.1.6	Proteine der Aminosäurebiosynthese	55
5.1.7	Zusammenfassung: Die stationäre <i>Escherichia coli</i> -Temperaturstressantwort.....	57
5.2	Analyse und Optimierung der Antikörperfragmentproduktion in <i>Bacillus megaterium</i>	60
5.2.1	Variation des Induktionszeitpunktes der Antikörperfragmentproduktion.....	61
5.2.2	Produktion des Antikörperfragmentes im Schüttelkolben	64
5.2.3	Produktion des Antikörperfragmentes im Bioreaktor	65

5.2.4	Einfluss der Temperatur und des mechanischen Stresses auf die rekombinante Proteinproduktion	66
5.2.5	Durchflusscytometrische Analyse	71
5.2.5.1	Zellaktivitätsmessung mittels DIBAC ₄ (3)-Fluoreszenzfärbung	71
5.2.5.2	Durchflusscytometrische Analyse der Zellgröße.....	74
5.3	<i>Bacillus megaterium</i> Kultivierungen unter optimierten Produktionsbedingungen	78
5.3.1	Vergleich der Antikörperfragmentproduktion in Minimal- und Komplexmedium	78
5.3.2	Reduktion des mechanischen Stresses und der Begasungsrate in der Produktionsphase.....	79
5.4	<i>Bacillus megaterium</i> Proteomanalyse.....	83
5.4.1	Proteomanalyse der heterologen Proteinproduktion im Bioreaktor.....	85
5.4.1.1	Enzyme des Zentralstoffwechsels	86
5.4.1.2	Proteine des Aminosäure- und Proteinmetabolismus und der allgemeinen Stressantwort.....	89
	Zusammenfassung	93
5.4.2	Einfluss des mechanischen Stresses auf die rekombinante Proteinproduktion	93
5.4.2.1	Einfluss des mechanischen Stresses zum Zeitpunkt der Induktion der heterologen Proteinproduktion.....	94
5.4.2.2	Einfluss des mechanischen Stresses in der Produktionsphase des rekombinanten Antikörperfragmentes.....	101
6	Zusammenfassung.....	106
7	Symbolverzeichnis	108
8	Anhang	110
9	Literaturverzeichnis	117

