

Phagen-freie Herstellung von Einzelstrang-DNA mit nutzerdefinierter Sequenz mit *Escherichia coli*

Karl Lorenz Ludwig Behler

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Engineering and Design der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation

Vorsitz: Prof. Dr. rer. nat. Oliver Lieleg
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz
2. Prof. Dr. rer. nat. Hendrik Dietz

Die Dissertation wurde am 23.06.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Engineering and Design am 05.10.2022 angenommen.

“A philosopher once said: 'It is necessary for the very existence of science that the same conditions always produce the same results'. Well, they do not.”

RICHARD P. FEYNMAN
(Mitbegründer der Nanotechnologie)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz. Viele Menschen haben auf unterschiedlichste Art und Weise einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet und dafür möchte ich mich an dieser Stelle von Herzen bedanken.

Bei Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz möchte ich mich besonders bedanken. Für die Freiheiten und vor allem das Vertrauen, das Sie mir bei der Bearbeitung dieses Projektes entgegengebracht haben. In den letzten 6 Jahren durfte ich immer meine eigenen Ideen umsetzen und konnte dabei jeder Zeit zu Ihnen kommen, wenn ich Unterstützung benötigt habe.

Mein herzlicher Dank gilt auch dem Coreferenten Prof. Dr. Hendrik Dietz und dem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr. Oliver Lieleg für die Übernahme des jeweiligen Amtes.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Projektpartnern am Institut für Biomolekulare Nanotechnologie unter Leitung von Prof. Dr. Hendrik Dietz. Dort bin ich nie „nur“ als Projektpartner, sondern als Teil des Teams betrachtet worden. Ich konnte auch bei dir, Hendrik, immer auf deine konstruktive Kritik und motivierende Art zählen und hatte dabei stets deine volle Unterstützung. Im Speziellen möchte ich mich auch bei Florian Praetorius, Floris Engelhardt und Max Honemann bedanken. Ihr habt mich mit viel hilfreicher Diskussion und unglaublich guter Zusammenarbeit während der gesamten Arbeit großartig unterstützt.

Bei allen (ehemaligen) Kollegen am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik sowie den Professuren für Systembiotechnologie und Selektive Trenntechnik möchte ich mich für das wirklich tolle Arbeitsklima bedanken. Bei Benjamin Kick möchte ich mich für alles bedanken, was er mir beigebracht hat und für die vielen Diskussionen und die gemeinsame Arbeit. Hervorzuheben sind auch Ellen, Gabi, Marlene, Patrick, Markus, Georg und Norbert, die mich immer bei allen organisatorischen und technischen Fragen unterstützt haben. Ihr habt immer ein offenes Ohr für Probleme aller Art gehabt. Besonders du, Norbert, hast immer Zeit für mich gehabt, egal weshalb ich zu dir gekommen bin.

Bedanken möchte ich mich auch bei Jeremy von Poschinger und Dominik Maslak für die tolle Zusammenarbeit in und um das Technikum für Weiße Biotechnologie vor und während meiner Experimente zur Maßstabsvergrößerung.

Besonderer Dank gilt auch Daniel Nitschke, Kornelia Veith, Regina Forstner, Katharina Dietmann, Nhi Pham, Veronika Burgmaier, Juliana Geromiller, Lucia Maciossek, Matthias Landesfeind, Jonathan Avonda, Lena Just, Fabian Kick und Emil Korzin für die großartige Unterstützung im Labor.

Bei euch, Frank, Christine, Kim, Michi, Michaela und Günther möchte ich mich bedanken, dass ihr mich in eure Familie aufgenommen habt und ich in der tollen Zeit, die ich mit euch verbringe, immer wieder den Kopf frei bekomme. Danke für eure Unterstützung besonders jetzt auf der Zielgerade.

Riesengroßer Dank gebührt meiner Familie. Eure Unterstützung während der Promotion, aber auch einfach immer und bei allem, ist nicht in Worte zu fassen. Ohne euch wäre ich nicht so weit gekommen. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei dir bedanken, Lara, weil du nicht nur in der Arbeit, sondern vor allem außerhalb immer für mich da bist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Problemstellung und Zielsetzung.....	3
3	Theorie.....	7
3.1	Desoxyribonukleinsäure.....	7
3.1.1	Einzelsträngige DNA, Bedeutung und Herstellung.....	7
3.1.2	DNAzyme.....	10
3.1.3	<i>Scaffolded</i> DNA Origami.....	11
3.2	Biologische Systeme.....	14
3.2.1	<i>Escherichia coli</i>	14
3.2.2	Bakteriophage M13.....	20
3.2.3	Phagemid, Helferphage und Helferplasmid.....	25
3.3	Kultivierung von Mikroorganismen.....	27
3.3.1	Kinetik von Wachstum und Produktbildung.....	28
3.3.2	Betriebsweisen mikrobiologischer Prozesse.....	31
4	Material und Methoden.....	37
4.1	Medien.....	37
4.1.1	Lysogeny broth Medium.....	37
4.1.2	2xYT Medium.....	38
4.1.3	Mineralmedium nach Riesenberg.....	38
4.1.4	Zulaufmedium für die Hochzeldichtekultivierung.....	39
4.2	Lösungen und Puffer.....	39
4.3	Mikroorganismen und Plasmide.....	41
4.3.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme und M13-Varianten.....	41
4.3.2	Helferplasmide und Phagemide.....	42
4.4	Molekularbiologische Arbeiten.....	47
4.4.1	Design von Plasmiden.....	47
4.4.2	Amplifikation und Reinigung.....	47

4.4.3	Assemblieren von Plasmiden	48
4.4.4	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmiden.....	49
4.4.5	Evaluation von Plasmiden	49
4.4.6	Herstellung von Kryokulturen	50
4.5	Verwendete Reaktorsysteme	51
4.5.1	Rührkesselreaktor im Litermaßstab.....	51
4.5.2	Rührkesselreaktor im Pilotmaßstab.....	53
4.6	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> zur Herstellung von ssDNA.....	54
4.6.1	Kultivierung nach Doppeltransformation im Schüttelkolben	55
4.6.2	Kultivierung nach Doppeltransformation im Rührkesselreaktor.....	55
4.6.3	Kultivierung mit „Reverser Infektion“ im Schüttelkolben.....	57
4.6.4	Kultivierung mit „Reverser Infektion“ im Rührkesselreaktor	57
4.6.5	Kultivierung im Schüttelkolben mit M13 Phagen Infektion	60
4.7	Isolieren von Einzelstrang DNA.....	60
4.7.1	Isolierung der Einzelstrang DNA im Millilitermaßstab	60
4.7.2	Isolierung der Einzelstrang DNA im Litermaßstab	61
4.7.3	Isolierung der Einzelstrang DNA im Pilotmaßstab	61
4.8	Faltung von DNA-Origami-Strukturen.....	62
4.8.1	Schneiden der DNAzyme mit Zn^{2+}	63
4.8.2	Falten von DNA-Origami-Strukturen.....	65
4.9	Analytische Methoden	66
4.9.1	Bestimmung der Zellkonzentration	66
4.9.2	Bestimmung der Einzelstrang DNA Konzentration	66
4.9.3	Bestimmung der Qualität der Einzelstrang DNA	67
4.9.4	Bestimmung der Qualität der DNA-Origami-Strukturen	67
4.9.5	Bestimmung der Phagen bzw. Phagemidkonzentration.....	67
4.9.6	Agarosegelelektrophorese.....	68
4.10	Berechnung	69
4.10.1	Mathematische Beschreibung der Produktbildung nach Gompertz.....	69
4.10.2	Berechnung der Multiplizität der Infektion.....	69

5	Phagen-freie Herstellung von ssDNA mit induzierbaren Helferplasmiden	71
5.1	ssDNA Herstellung mit Hilfe doppelt transformierter <i>E. coli</i>	71
5.2	Trennung von Biomasse- und Produktbildung durch induzierbare Helferplasmide	79
6	Phagen-freie Herstellung von ssDNA mit „Reverser Infektion“	85
6.1	Auswirkung einzelner M13 Gene auf die Infektionsresistenz	85
6.2	Regelung der Gen 3 Expression mit Hilfe eines Lac-Operators	91
6.3	Übertrag von Gen 3 auf das Phagemid	95
6.4	Rekombination und Bildung selbstreplizierender Partikel	103
6.5	Optimiertes Zweiplasmidsystem	109
6.6	Verbesserung der Produktionsbedingungen durch Temperaturvariation	114
6.7	Prozesssicherheit bei Kreuzkontamination	119
6.8	Standardisierung des Phagemidrückgrats	122
6.9	Maßstabsübertragung in den Pilotmaßstab	125
7	Zusammenfassung und Ausblick	131
8	Literaturverzeichnis	137
9	Anhang	149
9.1	Zusatzarbeiten zur Reduktion der Fix-Sequenz des Phagemidrückgrats	149
9.2	Abkürzungsverzeichnis	154
9.3	Symbolverzeichnis	156
9.4	Abbildungsverzeichnis	157
9.5	Geräte	159
9.6	Chemikalien	160

1 Einleitung

Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist eines der wichtigsten Biopolymere in der Natur. Sie ist dafür bekannt, Träger der Erbinformation zu sein und damit grundlegend zu bestimmen, wie alles Leben auf der Erde funktioniert. Wenn von DNA gesprochen wird, ist eigentlich immer ein Doppelstrang aus zwei Molekülen gemeint, die über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind und eine α -Helix ausbilden (Berg *et al.*, 2018). Als Einzelstrang-DNA wird jeweils die Hälfte dieser Doppelhelix und damit ein einzelnes DNA-Polymer-Molekül bezeichnet. Einzelstrang-DNA (engl.: *single-stranded DNA*, kurz: ssDNA) kommt in der Natur üblicherweise nur in bestimmten Viren oder als Übergangszustand während der Replikation der doppelsträngigen DNA (dsDNA) vor. Für die Wissenschaft und einige zukunftsweisende Technologien spielt ssDNA allerdings früher wie heute eine wichtige Rolle.

Als Frederick Sanger in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts seine Methode zur Entschlüsselung des genetischen Codes vorstellte nutzte er ssDNA als Vorlage um diese zu sequenzieren. So war das erste Genom, welches komplett sequenziert wurde, das des Bakteriophagen Φ X174, dessen Genom einzelsträngig vorliegt (Sanger *et al.*, 1977).

Kürzlich wurde ssDNA wieder in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Dabei wird vor allem ihre Eigenschaft genutzt, dass die Paarung unterschiedlicher ssDNA-Moleküle über ihre Sequenz vorhergesagt und gesteuert werden kann. So wird in der Gentechnologie mit Hilfe von CRISPR/Cas eine 0,5-2 kb lange ssDNA als Donor eingesetzt, um neue Sequenzen in ein Genom einzubauen (Quadros *et al.*, 2017; Xue & Greene, 2021).

Eine besondere Rolle spielen die Eigenschaften von ssDNA allerdings in der Nanotechnologie. Hier wird sie nicht als Informationsträger betrachtet, sondern als Baumaterial. Sie kann genutzt werden, um ein Gerüst von steuerbarer Größe und Struktur für sogenannte Hydrogele zu bilden (Chen *et al.*, 2020), oder direkt um Nanopartikel aus DNA anzufertigen. Paul Rothemund entwickelte 2006 die *bottom-up* Methode des *scaffolded* DNA-Origami (Rothemund, 2006). Diese ermöglicht das rationale Design von zwei oder drei dimensional Nanostrukturen (Douglas *et al.*, 2009). Diese Nanopartikel haben das Potenzial eine wichtige Rolle in vielen Zukunftstechnologien zu spielen, da es bereits eine Vielzahl an möglichen Anwendungsfeldern gibt (Douglas *et al.*, 2007; Jungmann *et al.*, 2010; Derr *et al.*, 2012; Langecker *et al.*, 2012; Pfitzner *et al.*, 2013; Shaw *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018; Sigl *et al.*, 2021).

All diese Technologien haben gemeinsam, dass sie auf längere Sicht große Mengen an maßgeschneiderter ssDNA benötigen, die nicht nur von hoher Qualität sein muss, sondern auch kostengünstig hergestellt werden kann.

2 Problemstellung und Zielsetzung

Viele Verfahren und Methoden, die ssDNA nutzen, unabhängig ob wegen ihrer genetischen Information oder als Baumaterial, benötigen ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz.

Für die Gentechnologie mit CRISPR/Cas wird ssDNA benötigt, deren Enden in ihrer Sequenz zu je etwa 100 Basen komplementär zu der Stelle in der genomischen DNA sind, an der sie eingefügt werden soll. Zwischen diesen Enden liegt eine Sequenz, die entsprechend ihrer Aufgabe designt werden kann. CRISPR/Cas erzeugt dazu lediglich den Doppelstrangbruch an der richtigen Stelle in der DNA. Anschließend lagert sich der ssDNA-Donorstrang mit seinen komplementären Enden an die genomische DNA an. Durch die Reparaturmechanismen der Zelle werden dann die Strangbrüche wieder repariert und die einzelsträngige Sequenz zu doppelsträngiger ergänzt. Im Ergebnis liegt die genomische DNA ohne jegliche Art von „Narben“ mit einer positionsspezifisch insertierten Sequenz vor. Der ssDNA-Donorstrang muss dafür neben den Komponenten für den Doppelstrangbruch in die Zelle eingebracht werden (Quadros *et al.*, 2017; Bai *et al.*, 2020). Solange mit dieser Methode nur einzelne Zellen behandelt werden, besteht kein hoher Bedarf an ssDNA-Donor. Soll diese Technologie allerdings, ähnlich wie beim *gene knockout* (Gillmore *et al.*, 2021), als Gentherapie genutzt werden, wobei Zielgewebe oder sogar ganze Individuen behandelt werden, so wird eine große Menge an ssDNA benötigt.

In der Nanotechnologie verhält es sich mit dem Bedarf ähnlich. Bei dem *scaffolded* DNA-Origami werden zur Faltung von zwei- oder dreidimensionalen Nanopartikeln zwei ssDNA-Komponenten benötigt: Ein langer ssDNA-Strang, der als Gerüst (engl. *scaffold*) dient und mehrere einzelsträngige Oligonukleotide, die als Klammern (engl. *staples*) dienen. In einer einzigen Reaktion hybridisieren die Klammernukleotide und der Gerüststrang langsam, während die Reaktionstemperatur graduell abgesenkt wird. Dabei paaren sich die meisten Klammernukleotide mit mehreren verschiedenen Positionen des Gerüststrangs, wodurch sogenannte *crossover* entstehen. Durch diese wird der Gerüststrang in seine spätere Form gefaltet. Dabei werden DNA-Doppelhelices in einem quadratischen oder hexagonalen Raster angeordnet, woraus sich die globale Struktur ergibt (Wagenbauer *et al.*, 2017).

Zum Erstellen von Hydrogelen mit DNA-basiertem Gerüst werden ähnlich wie beim DNA-Origami verschiedene ssDNA-Spezies gemischt. Diese sind so designt, dass durch ihre Paarung Gerüststrukturen entstehen, entlang derer dann andere Moleküle positionsgenau immobilisiert werden können (Chen *et al.*, 2020).

Für beide Nanotechnologien werden demnach ssDNA-Moleküle mit nutzerdefinierter Sequenz benötigt. Nanopartikel, basierend auf DNA-Origami, werden bereits für eine Vielzahl an wissenschaftlichen Methoden eingesetzt. Dazu zählt zum Beispiel die Einzelmolekülanalytik, Biosensorik oder die Enzymkatalyse (Chandrasekaran *et al.*, 2016). Aber gerade für das Einsatzfeld der Medizin, wie zum Beispiel zur Inaktivierung von Viruspartikeln (Sigl *et al.*, 2021) oder als Transportsystem für Medikamente (Douglas *et al.*, 2012) werden zukünftig große Mengen an maßgeschneiderter ssDNA benötigt.

Bisher wird ssDNA meist durch chemische Synthese hergestellt. Dabei liegen die Kosten für die Herstellung von einem Gramm DNA-Origami bei mehreren einhunderttausend Euro und die Synthese dauert mehrere Monate (Linko & Dietz, 2013). Zusätzlich ist die Länge von chemisch hergestellter ssDNA limitiert, wodurch ssDNA-Donorstränge für die Gentechnologie begrenzt sind und DNA-Origami meist auf natürlich vorkommende ssDNA als Gerüststrang zurückgreift.

In der Herstellung natürlich vorkommender ssDNA wurden bereits große Fortschritte erzielt. So konnte das ssDNA-Genom des Bakteriophagen M13, welches häufig als Gerüststrang für DNA-Origami genutzt wird, durch biotechnologische Herstellung in großen Mengen gewonnen werden (Kick *et al.*, 2015; Kick, Hensler, *et al.*, 2017). Dazu wurden die Phagen in einer Hochzelldichtekultivierung von *Escherichia coli* im Rührkesselbioreaktor hergestellt und ihr ssDNA-Genom nachfolgend isoliert.

Erste Ansätze für die zellbasierte Herstellung von ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz wurden bereits publiziert. Dafür existieren zwei Verfahren in denen die ssDNA eines Phagemids – eines Hybrides aus Phage und Plasmid – mit der Maschinerie des M13 Phagen hergestellt wird. Das Phagemid ist ein Plasmid, welches neben dem Plasmid-Replikationsursprung auch den Replikationsursprung des M13 Phagen sowie dessen Verpackungssignal trägt. Neben diesen Sequenzen kann das Phagemid eine nutzerdefinierte Sequenz tragen.

In dem einen Verfahren werden dazu M13 Helferphagen genutzt. *E. coli* Zellen, die ein Phagemid tragen werden mit den Helferphagen infiziert. Dadurch produzieren die Zellen sowohl neue Helferphagen als auch Phagen-ähnliche Partikel („Phagemidpartikel“), die das Phagemid als ssDNA enthalten (Vieira & Messing, 1987; Praetorius *et al.*, 2017). Da sich die selbstreplizierenden Helferphagen jedoch nicht mit absoluter Sicherheit von dem Produktionsequipment entfernen lassen (Branston *et al.*, 2013), ist wegen des Kontaminationsrisikos die Arbeit in großen Produktionsanlagen bei Lohnherstellern undenkbar.

Im zweiten Verfahren wird anstelle der Helferphagen ein sogenanntes Helferplasmid eingesetzt. Das Helferplasmid stellt lediglich die Gene des M13 Phagen zur Verfügung. *E. coli* Zellen werden sowohl mit dem Phagemid als auch mit dem Helferplasmid transformiert. Im Anschluss an die Transformation beginnen die Zellen Phagemidpartikel zu produzieren, ohne gleichzeitig selbstreplizierende Phagen freizusetzen (Chasteen *et al.*, 2006). In Satzprozessen konnten so bereits bis zu 2 mg L^{-1} an ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz hergestellt werden (Shepherd *et al.*, 2019). Da so keine selbstreplizierenden Phagen eingesetzt werden, eignet sich die Methode grundsätzlich zur Arbeit bei Lohnherstellern.

Werden *E. coli* Zellen mit dem M13 Phagen infiziert, werden bereits 10 Zell-Generationen später nahezu keine neuen Phagen mehr produziert (Smeal *et al.*, 2017b). Das lässt sich auch auf die Herstellung von Phagemidpartikeln übertragen, weshalb die doppelt mit Helferplasmid und Phagemid transformierten *E. coli* direkt im Produktionsprozess eingesetzt werden müssen, um die ssDNA-Produktion zu ermöglichen. Das wiederum kann technisch schwierig sein. Ein vorgeschalteter Satzprozess zur Vermehrung der Biomasse für den eigentlichen Produktionsprozess im großen Maßstab würde bereits die Anzahl von 10 Generationen überschreiten, so dass keine Phagemidpartikel im eigentlichen Prozess erzeugt werden. Somit ist die Methode der Doppeltransformation für die Maßstabsübertragung in den Produktionsmaßstab ungeeignet.

Deshalb war das Ziel dieser Arbeit eine Trennung von Biomasse- und Produktbildung in einem skalierbaren Zulaufprozess zur Herstellung von ssDNA mit *E. coli* im Rührkesselreaktor zu etablieren, ohne dabei selbstreplizierende Phagen einzusetzen. So kann zunächst *E. coli* Biomasse über mehrere Vorkulturstufen und im Produktionsreaktor gebildet werden. Durch einen nachfolgenden, gezielten Start der Produktion von Phagemidpartikeln wird die Anzahl produktiver Generationen nicht vor dem eigentlichen Produktionsprozess überschritten. Dadurch, dass keine selbstreplizierenden Phagen zum Einsatz kommen, kann in jeder Produktionsanlage gearbeitet werden. Um das zu erreichen wurden zwei Ansätze in Betracht gezogen:

Zum einen könnte das Konzept der doppelten Transformation beibehalten werden. Damit jedoch nicht direkt nach der Transformation die Produktion von Phagemidpartikeln einsetzt, war das Ziel ein Helferplasmid zu gestalten, bei dem die Expression der M13 Gene induziert werden kann. Mit einem solchen Helferplasmid und einem Phagemid transformierte *E. coli* könnten beliebig vermehrt werden, bis ausreichend Biomasse für die Herstellung von ssDNA bereitgestellt ist. Im Anschluss wird mit einem Induktionsmittel die Produktion von Phagemidpartikeln gestartet.

In einem zweiten Ansatz kann auch genutzt werden, dass die Herstellung von Phagemidpartikeln nur möglich ist, wenn sowohl das Helferplasmid als auch das Phagemid in *E. coli*

Zellen vorliegen und dass Phagemidpartikel mit M13 Kapsid infektiös sind. Ziel war hier, die Trennung von Biomasse- und Produktbildung zu erreichen, indem zunächst *E. coli* nur mit dem Helferplasmid transformiert werden und so ein beliebig vermehrbarer Produktionsstamm verfügbar gemacht wird. Dieser Stamm kann dann in einem Produktionsprozess in jedem Maßstab mit Phagemidpartikeln infiziert werden. Nach der Infektion liegen sowohl Helferplasmid als auch Phagemid vor, wodurch die Herstellung neuer Phagemidpartikel gestartet wird. Dieser Ansatz wird im Folgenden „Reverse Infektion“ genannt, da anders als bei der Produktion von Phagemidpartikeln mit Helferphagen nicht der Phage, sondern das Phagemid die Zelle infiziert. Die Reihenfolge in der die Genetische Information in die Zellen kommt ist hier also „Revers“.

Problematisch bei diesem Ansatz könnte sein, dass *E. coli*, die mit einem M13 Phagen infiziert sind, nicht von einem weiteren M13 Phagen infiziert werden können (Boeke *et al.*, 1982). Diese Infektionsresistenz kann auch dann auftreten, wenn die Zelle mit einem Helferplasmid transformiert ist. Da Phagemidpartikel, die ein M13 Kapsid haben, auf die gleiche Art und Weise infektiös sind wie der M13 Phage, sind auch diese von dieser Infektionsresistenz betroffen. Das bedeutet, dass Phagemidpartikel eine Zelle, die bereits mit einem ungeeigneten Helferplasmid transformiert ist, nicht infizieren können.

Um den Ansatz der „Reverse Infektion“ also überhaupt zu ermöglichen, muss daher zunächst untersucht werden, wodurch die Infektionsresistenz hervorgerufen wird. Erst dann können Helferplasmid und Phagemid so gestaltet werden, dass eine „Reversen Infektion“ die ssDNA Herstellung möglich machen kann.

3 Theorie

3.1 Desoxyribonukleinsäure

Desoxyribonukleinsäure (DNA) ist ein Biopolymer, welches aus sogenannten Nukleotiden besteht. Die Nukleotide sind aus einem Phosphatrest, dem Zucker Desoxyribose und einer von vier Nukleinbasen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin) aufgebaut. Die Monomere sind über Phosphodiester-Bindungen miteinander verbunden, wodurch das DNA-Rückgrat durch die Bindung vom 5' zum 3' Kohlenstoffatom des Zuckers entsteht. DNA kommt in allen Lebewesen und vielen Viren vor, wobei sie als Träger der Erbinformation dient. Auch wenn Friedrich Miescher DNA bereits 1869 als die saure Bestandteile des Zellkerns entdeckte (Miescher, 1871), wurde ihre kettenartige Struktur erst 1919 von Phoebus Levene vorgeschlagen (Levene, 1919). Ihre vollständige Struktur wurde dann 1953 von Watson und Crick – unter anderem auf Basis von Daten von Rosalind Franklin – entschlüsselt (Watson & Crick, 1953), wobei sie feststellten, dass es sich um eine Doppelhelix handelt. Heute ist also bekannt, dass die DNA in lebenden Zellen als Doppelstrang vorliegt, wobei die beiden Stränge aus kovalent verknüpften Nukleotiden bestehen, während deren Paarung auf der Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Basen Adenin und Thymin beziehungsweise Guanin und Cytosin beruht. Somit ist ein Strang der Doppelhelix stets das reverse Komplement des anderen Strangs (Berg *et al.*, 2018).

3.1.1 Einzelsträngige DNA, Bedeutung und Herstellung

Einzelsträngige DNA (engl.: *single-stranded DNA*, kurz: ssDNA) ist im Kern einfach die eine Hälfte einer DNA Doppelhelix und liegt in lebenden Zellen nur sehr transient während des Abschriebs der DNA vor. Grundsätzlich wird einzelsträngige DNA in Zellen immer durch die zelluläre Maschinerie zu doppelsträngiger DNA ergänzt, da nur so die korrekte Vervielfältigung möglich ist, die für die Funktion der DNA als Erbinformationsträger entscheidend ist.

In der Natur kommt ssDNA dennoch als Erbinformationsträger in einigen Viren vor. Diese Viren werden der Baltimore-Gruppe 2 zugeordnet und können entweder den (+)- oder den (-)-Strang der DNA enthalten. Allerdings wird auch bei diesen Viren die einzelsträngige DNA nach der Infektion in doppelsträngige DNA umgewandelt (Roossinck, 2020). Insofern hat einzelsträngige DNA in der Natur nur eine Bedeutung bei dem Einsparen von Platz, wenn DNA in Viruskapside verpackt werden muss.

Auch wenn ssDNA in der Natur nicht sehr verbreitet ist, nimmt sie doch eine wichtige Rolle in der Biotechnologie ein. Ende der 1970er Jahre wurde das Sequenzieren von DNA durch

Kettenabbruch erfunden (Sanger *et al.*, 1977). Für diese Methode wurde ssDNA genutzt, da zu dem Zeitpunkt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) noch nicht existierte. Joachim Messing entwickelte ein M13 Phagen basiertes System zum *shotgun*-sequenzieren, in dem unbekannte DNA-Fragmente in die DNA des Phagen eingebaut wurden und dann wiederum Teil des ssDNA-Genoms der Phagen war (Messing *et al.*, 1981). Da diese ssDNA verhältnismäßig leicht hergestellt werden kann, konnte so die unbekannte Sequenz ermittelt werden.

Heute spielt ssDNA vornehmlich in zwei relativ neuen Technologien eine wichtige Rolle. Zum einen im Genom-Editieren mit Hilfe der CRISPR/Cas-Methode zum anderen in der DNA-Origami Technologie. Es wurde gezeigt, dass beim Genom-Editieren mittels CRISPR/Cas eine signifikant erhöhte Effizienz zu beobachten ist, wenn an Stelle von doppelsträngiger DNA ssDNA als sogenannter Donor für den Reparaturmechanismus eingesetzt wird (Quadros *et al.*, 2017; Bai *et al.*, 2020). Bei der DNA-Origami-Technologie handelt es sich um eine Nanotechnologie, die die ssDNA nicht als Informationsträger, sondern als Baumaterial betrachtet.

Herstellung von ssDNA

Die Herstellung von einzelsträngiger DNA kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Dabei gibt es klassisch chemische Methoden und biochemische Methoden. Bei der chemischen Synthese werden einzelne DNA-Ketten Nukleotid für Nukleotid auf einer Festphase verlängert, bis die gesamte Sequenz erzeugt ist. Diese Methode ist weit verbreitet und so erzeugte ssDNA kann mit einer Länge von bis zu 2000 Basen kommerziell erworben werden. Da diese Methode aber relativ teuer ist und im Grunde nicht beliebig skaliert werden kann, wird sie hier nicht weiter behandelt.

Zellfreie Herstellung

Abgesehen von der chemischen Synthese kann ssDNA auch zellfrei durch enzymatische Prozesse hergestellt werden. Dazu zählen zum Beispiel einige PCR-basierte Methoden. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, bei der gereinigte Enzyme in einem gepufferten System zum Einsatz kommen. Hier wird eine vorhandene DNA, das sogenannte *template*, vervielfältigt. In der Regel werden dabei doppelsträngige *templates* verwendet. Zu der Mischung aus Enzymen und *template* werden auch kurze einzelsträngige DNA-Stücke (sogenannte Oligonukleotide, oder *primer*) zugegeben, die jeweils komplementär zu den 3' Enden der *template*-DNA sind. Durch Erhitzen der Mischung wird das *template* geschmolzen und anschließend können sich die *primer* durch Kühlen der Mischung an den jeweiligen Einzelstrang der *template*-DNA anlagern. Enzymatisch werden dann die Primer verlängert, bis wieder vollständige doppelsträngige DNA (dsDNA) Stücke vorliegen. Anschließend wird der

komplette Zyklus wiederholt, bis die gewünschte Menge an DNA erzeugt wurde. Um so allerdings einzelsträngige DNA zu erhalten muss das Vorgehen angepasst werden.

Bei der asymmetrischen PCR werden unterschiedliche Mengen an *forward* und *reverse primern* eingesetzt, wodurch ein Strang bevorzugt amplifiziert wird (Gyllensten & Erlich, 1988). Dabei wird allerdings nicht ausschließlich ssDNA, sondern auch ein gewisser Teil dsDNA gebildet. Diese beiden Spezies müssen anschließend wieder getrennt werden.

Alternativ kann unter Verwendung der Exonuklease des Phagen Lambda ein Strang der dsDNA selektiv verdaut werden. Dazu muss lediglich der Primer der nicht erwünschten ssDNA-Spezies in phosphorylierter Form eingesetzt werden. Der phosphorylierte Strang der dsDNA wird von der Exonuklease verdaut und nur die erwünschte ssDNA bleibt übrig (Citartan *et al.*, 2011). Aber auch bei dieser Methode kann ein Rest an ungeschnittener dsDNA in der Mischung verbleiben. Zusätzlich hat Exonuklease auch eine gewisse Aktivität gegenüber der ssDNA, wodurch auch hier Verluste entstehen.

Weitere Methoden, die auf der Trennung des komplementären Strangs basieren, existieren, sind jedoch auch so aufwendig, dass sie nicht für die Produktion größerer Mengen an ssDNA geeignet sind (Citartan *et al.*, 2012).

Allgemein sind Methoden, die auf PCR basieren, grundsätzlich nur schwer skalierbar. Die in wenigen Mikrolitern durchgeführten Heiz- und Kühlzyklen, die nur wenige Sekunden brauchen, um die erwünschten Temperaturen zu erreichen, können nur schwer in den Liter oder gar den Kubikmeter Maßstab überführt werden.

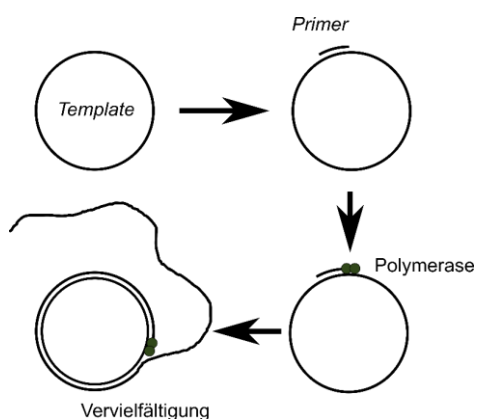


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Rolling Circle Amplification

Alternativ zur PCR, aber auch zellfrei, kann die sogenannte *Rolling Circle Amplification* (RCA) durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um einen isothermen Prozess, der eine strangverdrängende Polymerase nutzt. Die *template*-DNA ist in diesem Fall zirkulär und wird nach einem initialen *Priming* quasi im Kreislauf mehrfach hintereinander, wie in Abbildung 3.1 dargestellt, abgeschrieben. Wird eine Restriktionschnittstelle oder ein DNAzym (Kapitel 3.1.2) in die Sequenz inkorporiert, kann der entstandene Strang hinterher wieder in einzelne Stücke zerschnitten werden

(Gu & Breaker, 2013; Ali *et al.*, 2014). Da diese Methode allerdings hochreine Enzyme und *template*-DNA nutzt, ist auch hier die Skalierung nur schwer möglich und die Herstellung verhältnismäßig kostenintensiv.

Zellbasierte Herstellung

Eine weitere Möglichkeit einzelsträngige DNA herzustellen, besteht in einem nicht rein enzymatischen, sondern zellbasierten Prozess. Dabei wird genutzt, dass ssDNA als Genom einiger Bakteriophagen vorkommt. Der bisher vielversprechendste Ansatz benutzt den Bakteriophagen M13, wobei dessen einzelsträngiges DNA-Genom produziert wird. Da dieser Phage bereits seit den 1970er Jahren zu diesem Zweck genutzt wird, ist auch die Möglichkeit zusätzliche DNA-Sequenzen in seinem Genom zu platzieren gut untersucht (Messing *et al.*, 1977, 1981).

Die Herstellung der M13 Phagen basiert dabei darauf, dass M13 Phagen *E. coli*, welche ein F-Plasmid tragen, infizieren kann. Infizierte Zelle schleusen anschließend kontinuierlich neue Phagenpartikel aus, welche im Endeffekt gereinigt werden können, um die ssDNA aus ihnen zu isolieren. So wurde ssDNA zunächst in Schüttelkolben hergestellt, wobei 6,7 – 10 mg L⁻¹ an ssDNA erreicht werden konnte (Reddy & McKenney, 1996).

Um mit diesen Phagen auch größere Mengen an ssDNA produzieren zu können, entwickelte Kick *et al.* (2015, 2017) eine Methode, bei der die Phagenpartikel in einer *E. coli*-Hochzell-dichtekultivierung hergestellt werden.

Zu diesem Zweck wurden *E. coli* des Stammes XL1Blue MRF' oder des Stammes JM109 in einem Rührkesselbioreaktor kultiviert. Dazu wird ein Zulaufverfahren mit Glukose als Hauptsubstrat durchgeführt. In der Satzphase werden die Zellen bis zu einer Biotrockenmassekonzentration von etwa 25 g L⁻¹ angezogen und dann auf das Zulaufverfahren umgeschaltet. Durch den Zulauf wird die spezifische Wachstumsrate auf 0,15 h⁻¹ eingestellt und so 12 Stunden aufrechterhalten. Im Anschluss daran wird konstant Substrat zugeführt. Fünf Stunden nach Start des Zulaufs werden die Zellen mit den M13 Phagen infiziert. Dazu verwendeten Kick *et al.* verschiedene Varianten des Phagen M13mp18 (Messing & Vieira, 1982), die sich in der Länge der *inserts* unterschieden. Durch die korrekte Wahl der Multiplizität der Infektion (MOI), was der Menge der zugegebenen Phagen im Verhältnis zur Zellzahl zum Zeitpunkt der Infektion entspricht, kann die erreichte Produktmenge maximiert werden.

So konnten in Abhängigkeit der Länge des Produkts maximale Produktkonzentrationen von 370 – 590 mg L⁻¹ erreicht werden (Kick *et al.*, 2015; Kick, Hensler, *et al.*, 2017; Bush *et al.*, 2020)

3.1.2 DNAzyme

Bei DNAzymen handelt es sich um katalytisch aktive Einheiten, die aus DNA bestehen. Sie sind aus ssDNA aufgebaut, die sich durch Paarung mit sich selbst faltet. DNAzyme existieren, soweit bekannt, nicht in der Natur, sondern wurden künstlich erzeugt. Ihre Vorbilder, die

RNAzyme wiederum sind eine große Gruppe katalytisch aktiver Moleküle, die in der Natur in verschiedensten Organismen und mit einer großen Bandbreite an Aufgaben vorkommen (Silverman, 2005). DNAzyme hingegen wurden bisher hauptsächlich entwickelt, um wiederum andere ssDNA oder RNA schneiden zu können. Gu *et al.* (2013) entwickelten ein DNAzym, welches in Anwesenheit von Zinkionen eine bestimmte ssDNA Sequenz schneiden kann. Mit diesem DNAzym wurde ermöglicht mittels RCA (Kapitel 3.1.1) mehrere kurze ssDNA-Stücke herzustellen, die sich nach dem Abschrieb vom *template* selbst voneinander trennen (Gu & Breaker, 2013). Dabei enthält die produzierte Sequenz sowohl das DNAzym als auch den Substratstrang, wodurch sich ein autokatalytisch aktiver ssDNA-Strang bildet, der sich in Anwesenheit von Zinkionen selbst schneiden kann. Die DNAzyme wurden bereits in ähnlicher Weise in verschiedenen Methoden eingesetzt (Kong *et al.*, 2013; Endo *et al.*, 2015; Praetorius *et al.*, 2017).

3.1.3 Scaffolding DNA Origami

Bei der Paarung von zwei ssDNA-Strängen zur DNA-Doppelhelix spielt die Basensequenz eine große Rolle, da sich stets die Base Adenin mit der Base Thymin und analog Guanin mit Cytosin paaren. Dadurch ist ein Strang in der Doppelhelix immer das reverse Komplement zu dem anderen (Berg *et al.*, 2018). Wenn zwei DNA-Doppelhelices die gleiche Sequenz haben, so kann es dazu kommen, dass sie rekombinieren und eine sogenannte *Holliday Junction* bilden (Holliday, 1964). Dabei paart sich der (+)-Strang der ersten Helix teilweise mit dem (-)-

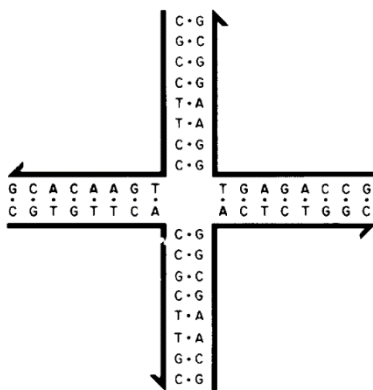


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung einer stabilen *Holliday Junction* (Seeman, 1982).

Strang der zweiten Helix. Die so freien Enden der Helix paaren sich wiederum und es kommt zu einem doppelten *crossover*. Auf Basis dieser Grunderkenntnisse entwickelte Nadrian Seeman in den 1980er und 90er Jahren die DNA Nanotechnologie. Indem er Oligonukleotide designte, die jeweils zur Hälfte gegen ein anderes Oligonukleotid komplementär waren, erzeugte er stabile *Holliday Junctions* (Seeman, 1982). Seine Idee bestand darin, die stabilen *Holliday Junctions* (Abbildung 3.2) mit ssDNA überhängen, sogenannten *sticky ends*, an allen Enden zu versehen, wodurch die DNA Objekte miteinander polymerisieren und

ein Gerüst im Raum bilden. So entwickelte er später die ersten DNA-basierten Objekte (Chen & Seeman, 1991; Fu & Seeman, 1993).

Seeman legte damit den Grundstein für das sogenannte *scaffolding* DNA-Origami. Dabei handelt es sich um eine Methode, mit der Nanoobjekte in einem sogenannten *bottom-up* Ansatz designt und erstellt werden können. Die Methode nutzt ein langes ssDNA Molekül, den Gerüststrang (engl. *scaffold*), welcher durch Paarung mit kurzen Oligonukleotiden (<100

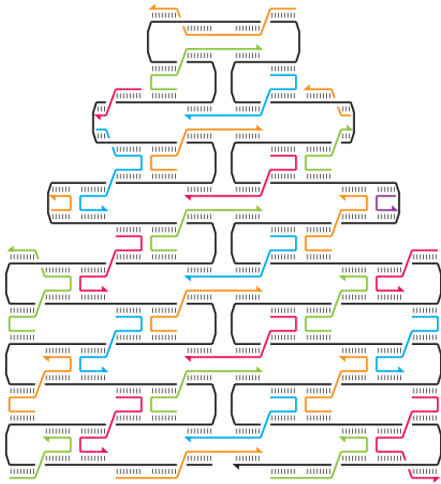


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des *scaffolded* DNA-Origami. Der Gerüststrang (schwarz) wird durch die Klammer-Nukleotide (bunt) gefaltet, indem stabile *crossover* erzeugt werden (Rothemund, 2006).

Nukleotide) den sogenannten Klammern (engl. *staples*) in eine Form gefaltet wird. Die Sequenz der Klammern wird so designt, dass sie bei der Paarung mit dem Gerüststrang stabile *crossover* zwischen zwei voneinander entfernten Regionen des Gerüststrangs bilden. Wird der gesamte Gerüststrang komplementiert, wobei auf die Positionierung der stabilen *crossover* geachtet wird, so ergibt sich eine Struktur aus DNA Doppelhelices, wie in Abbildung 3.3 dargestellt (Rothemund, 2006).

Da die Paarung der DNA-Stränge durch ihre Sequenz berechenbar ist und die Paarung bei ausreichender Länge der komplementären Regionen eindeutig ist, kann die notwendige Sequenz in Abhängigkeit des gewünschten Aussehens berechnet werden und die Strukturen in einer selbstassemblierenden Reaktion gefaltet werden.

Wird dieses Konzept erweitert, lassen sich auch dreidimensionale Strukturen bilden (Douglas *et al.*, 2009). Abgesehen davon können die Klammer-Nukleotide, da sie chemisch synthetisiert werden, an beinahe beliebiger Stelle zusätzlich chemisch funktionalisiert werden. Dadurch können den DNA-Nanoobjekten weitere chemische Eigenschaften verliehen werden oder Moleküle positionsgenau mit ihnen verknüpft werden (Langecker *et al.*, 2012).

Da mit der Methode des *scaffolded* DNA-Origami beliebige Strukturen erzeugt werden können, liegt es nahe, Nanoobjekte zu konstruieren, die besondere Funktionen erfüllen. Mögliche Anwendungsgebiete kommen aus der Medizin, der Analytik einzelner Proteine, der NMR-Technologie und der Nanorobotik. Hierbei werden Funktionalisierungen genutzt, um die Objekte an Oberflächen anzulagern, bewegliche und schaltbare Elemente einzuführen und Interaktionen sichtbar zu machen, wie in Abbildung 3.4 dargestellt.

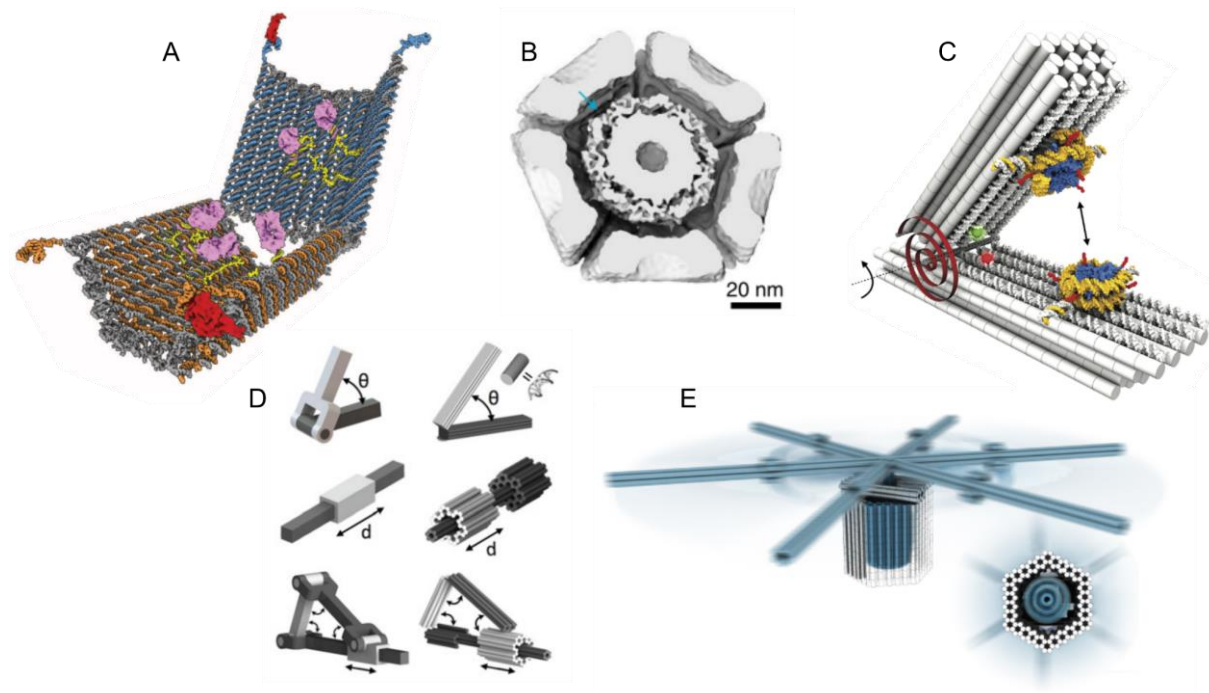


Abbildung 3.4: Darstellung verschiedener DNA-Origami-Strukturen. A: *Drug-delivery*-System, welches ein Krebstherapeutikum freisetzt, sobald es das Zielgewebe erkennt (Douglas *et al.*, 2012). B: Dreiecke aus DNA-Origami umschließen ein Viruspartikel, wodurch es inaktiviert wird (Sigl *et al.*, 2021). C: DNA-Origami-Struktur zur Messung von Interaktionskräften zwischen Biomolekülen (Funke *et al.*, 2016). D: Verschiedene DNA-Origami-Strukturen mit mechanisch vorgegebener Beweglichkeit (Marras *et al.*, 2015). E: DNA-Origami Rotor (Ketterer *et al.*, 2016).

Anwendungsbeispiele aus der Medizin sind sogenannte *drug-delivery*-Systeme, bei denen ein Wirkstoff nur in einem bestimmten Gewebe freigesetzt werden sollen. Dafür wurde ein Vehikel aus DNA konstruiert, welches mit Hilfe von Aptameren das Zielgewebe erkennt und anschließend eine Kavität freigibt, so dass ein Medikament freigesetzt wird (Douglas *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018). Eine andere Anwendung besteht darin, Viruspartikel in einer Hülle aus DNA-Objekten einzufangen, sodass sie sich nicht mehr an Zelloberflächen anheften können. Dazu wurden dreieckige Strukturen aus DNA entwickelt, die so designt werden können, dass sie sich in unterschiedlich große Kapside zusammenlagern, wobei sie ein oder mehrere Viruspartikel einschließen (Sigl *et al.*, 2021).

Wissenschaftliche Anwendungen in der Biophysik umfassen zum Beispiel die Messung von Kräften zwischen verschiedenen Biomolekülen. So können mit Hilfe einer speziellen Origami-Struktur zum Beispiel zwei Nukleosome in räumliche Nähe gebracht werden. Über die Origami-Struktur wird eine Kraft angelegt, die der Interaktion der Nukleosome entgegengerichtet ist. Aus dem resultierenden Abstand der beiden Moleküle kann dann auf die Kraft der Molekülinteraktion geschlossen werden (Funke & Dietz, 2016; Funke *et al.*, 2016).

Zur Untersuchung von Membranproteinen mittels NMR können DNA-Origami-Röhrchen in einer Art Flüssigkristall eingesetzt werden, wodurch eine schwache Ausrichtung der Moleküle erwirkt wird. Dies verbessert die NMR-Auflösung (Douglas *et al.*, 2007; Bellot *et al.*, 2013).

Aber auch als eigenständige molekulare Maschinen oder programmierbare Roboter lassen sich DNA-Origamistrukturen einsetzen. Nach dem Prinzip eines Rotor-Stator-Motors konnten bewegliche Einheiten entwickelt werden, die an das Funktionsprinzip der ATPase angelehnt sind (Ketterer *et al.*, 2016).

Andere Objekte ermöglichen auch die gerichtete Bewegung entweder über die mechanische Ausrichtung der Bewegung in einer vorgegebenen Dimension (Stömmer *et al.*, 2021) oder durch die programmierbare Bewegung entlang einer Fläche durch DNA-Hybridisierungsinteraktion (Zhou *et al.*, 2015).

3.2 Biologische Systeme

3.2.1 *Escherichia coli*

Das Bakterium *Escherichia coli* wurde zuerst 1885 von dem deutsch-österreichischen Kinderarzt Theodor Escherich als *Bakterium coli commune* beschrieben (Escherich, 1885). Es handelt sich dabei um ein gramnegatives, fakultativ anaerobes, nicht sporulierendes Bakterium (siehe Abbildung 3.5), welches hauptsächlich im unteren Verdauungstrakt warmblütiger Tiere und Reptilien vorkommt (Tenaillon *et al.*, 2010). Als Kommensale ist *E. coli* nicht pathogen, sondern wichtiger Bestandteil des Darmmikrobioms, wobei es etwa 0,1% der Darmbakterien ausmacht. Es existieren allerdings auch verschiedene Gruppen pathogener Stämme, die sich durch ihre Pathogenitätsinseln und Virulenzfaktoren unterscheiden (Slonczewski & Foster, 2012).

Da *E. coli* sehr einfach und kostengünstig kultiviert werden kann, ist es der vielleicht am häufigsten eingesetzte mikrobielle Modellorganismus. Wildtyp-Stämme können unter optimalen Bedingungen, bei einer Temperatur von 37°C und einem pH zwischen 6,5 und 7,3, Generationszeiten von lediglich 20 Minuten erreichen (Slonczewski & Foster, 2012).

Der Referenzstamm *E. coli* K12 mit seinem 4,6 Mbp großen Genom und seine Abkömmlinge spielten eine Schlüsselrolle in der Erforschung der Genetik, Molekularbiologie, Physiologie und Biochemie (Tenaillon *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass *E. coli* neben seinem Genom weitere genetische Information in Form von Plasmiden aufnehmen und verarbeiten kann, macht ihn sehr interessant für die Forschung. Über Plasmide ist auch der horizontale Gentransfer zwischen *E. coli*-Zellen möglich. Hierfür bilden Zellen, die den Fertilitätsfaktor auf dem sogenannten F-Plasmid tragen, einen Sexpilus aus, womit die Adhäsion an andere Zellen und der anschließende Austausch von genetischem Material ermöglicht wird (Slonczewski & Foster, 2012; Berg *et al.*, 2018).

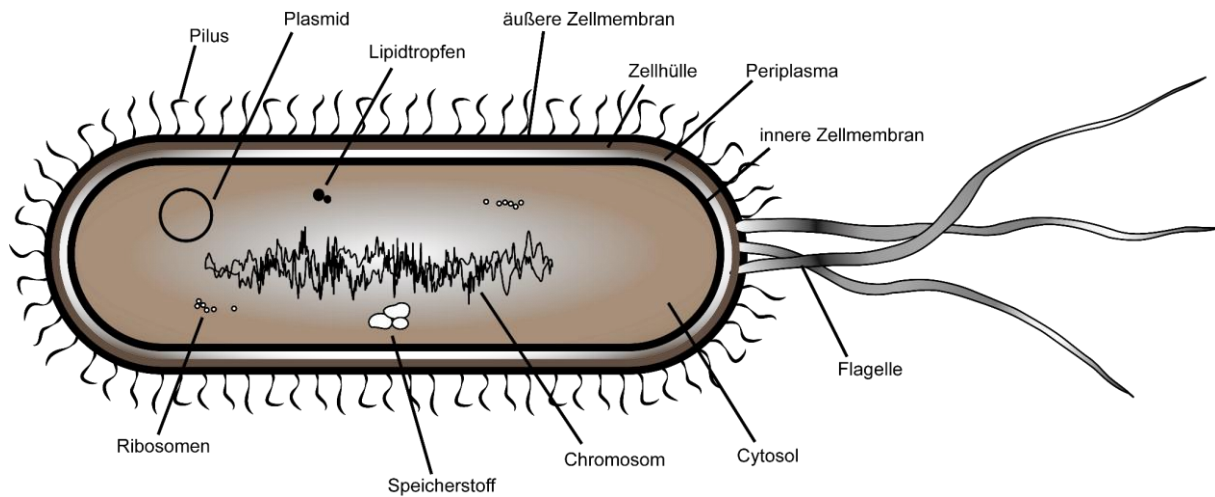


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung einer *E. coli* Zelle (nach Brechner *et al.*, 2015).

Der zentrale Stoffwechsel von *E. coli*

Wie jede Lebensform benötigt auch *E. coli* Energie für Wachstum und Stoffwechsel. Da *E. coli* ein heterotropher Organismus ist, benötigt es eine energiereiche Kohlenstoffquelle. Hier kann es verschiedene Hexosen und Pentosen oder auch Glycerin aufnehmen und verarbeiten. Da allerdings Glucose das bevorzugte Substrat für *E. coli* ist, wird hauptsächlich dies zur Kultivierung eingesetzt (Slonczewski & Foster, 2012).

Die Glukoseaufnahme kann bei *E. coli* über verschiedene Wege erfolgen. So kann Glukose genau wie viele andere Einfachzucker über das Phosphoenolpyruvat Carbohydrat Phosphotransferase System (PTS) aufgenommen werden. Dabei wird die Glukose parallel zum Transport in die Zelle phosphoryliert, was auch den Wiederaustritt ins Medium verhindert (Deutscher *et al.*, 2006).

Unter substratlimitierten Bedingungen wie zum Beispiel in einem Chemostat, wird der ABC-Transporter (*ATP binding cassette*) für Maltose (*malEGF*) hoch-reguliert, der auch Glucose in die Zelle transportieren kann (Notley & Ferenci, 1995; Steinsiek & Bettenbrock, 2012). Dabei wird die Glucose allerdings nicht im Transport phosphoryliert. Die Phosphorylierung der Glucose erfolgt in diesem Fall anschließend im Cytosol der Zellen durch eine Hexokinase. Das PTS bleibt allerdings der wichtigste Aufnahmeweg für Glucose (Steinsiek & Bettenbrock, 2012). Durch den aktiven Transport der Glucose über die Zellmembran werden auch sehr geringe Affinitätskoeffizienten erreicht (siehe Kapitel 3.3.1).

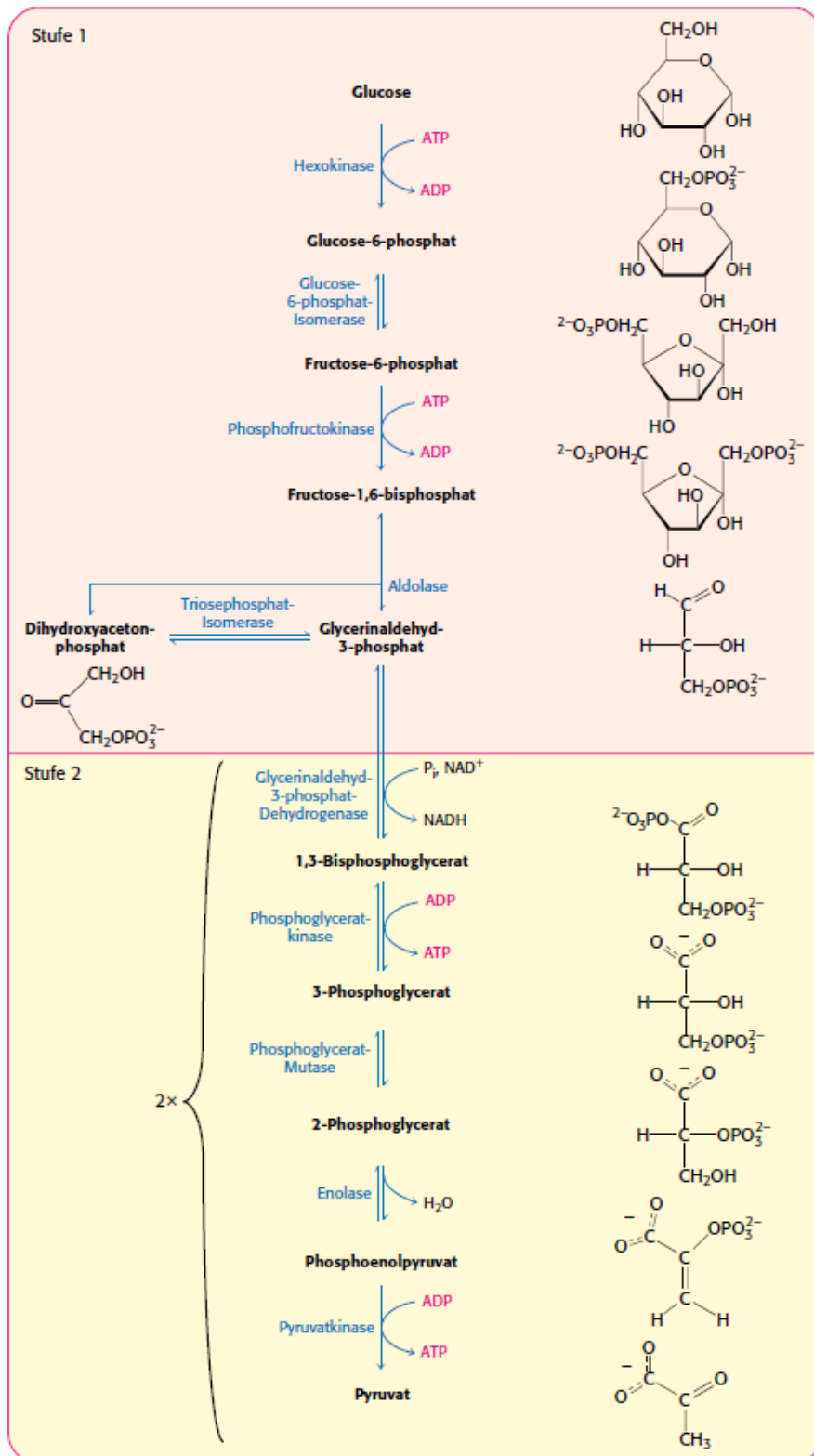


Abbildung 3.6: Darstellung der enzymkatalysierten Reaktionsschritte der Glykolyse im Zentralmetabolismus von *E. coli* (Berg *et al.*, 2018).

Nach der Aufnahme und Umwandlung in Glukose-6-phosphat geht es, wie in Abbildung 3.6 dargestellt, über mehrere enzymkatalysierte Reaktionen weiter, bis am Ende der Glykolyse pro Molekül Glukose zwei Moleküle Pyruvat gebildet wurden. Dabei werden effektiv pro Mol

Glukose zwei Mol ATP und zwei Mol des Reduktionsäquivalents NADH gebildet (Berg *et al.*, 2018).

Nach der Glykolyse kann der Kohlenstofffluss in zwei Richtungen weitergehen. Zum einen besteht bei den fakultativ anaeroben *E. coli* die Möglichkeit, unter Sauerstoffmangel weiter in die gemischte Säuregärung zu gehen. Dabei werden sowohl Acetat, Formiat, Lactat und Succinat sowie Ethanol, H₂ und CO₂ gebildet (Slonczewski & Foster, 2012). Da diese Stoffwechselprodukte allerdings ab einer gewissen Konzentration inhibierend auf das Wachstum wirken, soll dieser Stoffwechselweg bei der Kultivierung von *E. coli* weitestgehend vermieden werden.

Für die Kultivierung deutlich wichtiger ist der vollständig oxidative Abbau des in der Glykolyse entstandenen Pyruvats zu CO₂ und Wasser. Dafür muss zunächst das Pyruvat oxidativ decarboxyliert werden, wobei es unter Abspaltung von CO₂ und Bildung von NADH unter Einsatz des Coenzym A zu Acetyl-CoA umgelagert wird. Diese Reaktion bildet die Verbindung zwischen Glykolyse und dem sogenannten Citratzyklus.

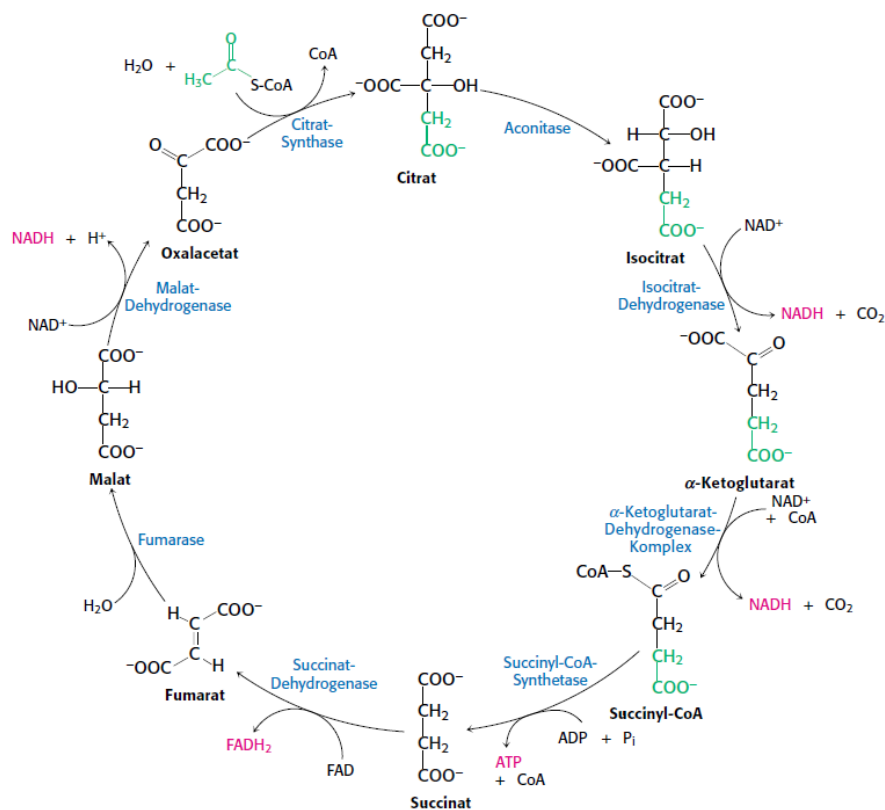


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der enzymkatalysierten Reaktionen im Citratzyklus. (Berg *et al.*, 2018)

Das Acetyl-CoA wird im Citratzyklus, wie in Abbildung 3.7 dargestellt, an Oxalacetat gekoppelt, wobei Citrat entsteht. Im Kreislauf wird dieses dann wieder zu Oxalacetat, wobei NADH, ATP und FADH₂ entstehen. Die Reduktionsäquivalente werden anschließend über die Atmungskette regeneriert, wobei Elektronen auf den Elektronenakzeptor Sauerstoff

übertragen werden und ein Protonengradient ausgebildet wird, dessen treibende Kraft der ATP-Synthase zur Bildung von ATP dient (Berg *et al.*, 2018).

Da die Reaktionen im Citratzyklus bzw. der Atmungskette langsamer ablaufen als die der Glykolyse, kann es bei einem hohen Angebot an Substrat, zum Beispiel während der Satzphase einer Kultivierung, zu sogenanntem Überschussmetabolismus kommen. Dabei akkumuliert das gebildete Pyruvat und Acetyl-CoA in der Zelle. So kommt es zur Aktivierung verschiedener Stoffwechselwege (*poxB ackA-pta*) ausgehend von beiden Metaboliten, die zur Bildung von Acetat führen (Dittrich *et al.*, 2005). Solange die Menge an gebildetem Acetat allerdings noch nicht zu starker Inhibierung führt, kann das Acetat unter Substratmangel wiederaufgenommen werden und vollständig verstoffwechselt werden.

Kultivierung von *E. coli*

Escherichia coli kann im Gegensatz zu einigen anderen Mikroorganismen in Reinkultur kultiviert werden. Das bedeutet, es benötigt keine anderen Organismen, um sich vermehren zu können (Slonczewski & Foster, 2012). Für das Wachstum benötigt *E. coli* hauptsächlich eine Stickstoff-, eine Phosphor-, eine Schwefel- und eine Kohlenstoffquelle sowie Sauerstoff. Zusätzlich benötigt es einige Spurenelemente (Chmiel, 2011). Wildtyp-Zellen können in der Regel alle komplexeren Moleküle, die sie benötigen, selbst synthetisieren, wenn sie dafür eine entsprechende Energiequelle haben (Slonczewski & Foster, 2012). Bei Laborstämmen gibt es große Unterschiede, da durch genetische Veränderung häufig einzelne Stoffwechselwege gezielt ausgeschaltet wurden. Um außerhalb der Laborumgebung nicht bzw. schlecht zu wachsen, benötigen die meisten Laborstämme als Sicherheit das Vitamin Thiamin. *E. coli* kann in Komplexmedium sowie definiertem Mineralmedium kultiviert werden. In definierten Medien wird meist Glukose als Kohlenstoffquelle und Ammonium, Sulfat sowie Phosphat als N-, S- bzw. P-Quelle eingesetzt. Da es sich bei den Medien um wässrige Lösungen handelt, steht auch ausreichend Wasser zur Verfügung (Slonczewski & Foster, 2012).

Wenn Zellen vereinzelt wachsen sollen, um einen definierten Genotyp zu erhalten, so ist die Kultivierung auf festen Nährmedien üblich. Zur Kultivierung von *E. coli* auf festen Nährmedien werden sogenannte Agarplatten eingesetzt. Hier wird ein Flüssigmedium durch das Polysaccharid Agar-Agar verfestigt. Alle Nährstoffe können durch den Feststoff diffundieren und müssen so zu den örtlich festen Zellen kommen (Slonczewski & Foster, 2012). So ist das Wachstum durch den Massentransfer limitiert. Sauerstoff muss aus der Luft in die gebildeten Kolonien diffundieren, wodurch schnell auch die unteren Schichten hiermit limitiert sind. Damit eignet sich diese Methode zwar gut zur Vereinzelung von Zellen und dem Screening nach bestimmten Genotypen, nicht jedoch zur Untersuchung der Wachstumseigenschaften.

In Flüssigmedien existieren verschiedene Prozessführungen, unter denen *E. coli* kultiviert werden kann. Im Satzverfahren werden alle notwendigen Medienbestandteile vorgelegt, so dass das Wachstum durch keine Komponente inhibiert oder limitiert ist. Dadurch können die Zellen zwar zunächst gut wachsen, doch sind keine hohen Zelldichten möglich. Zum einen können zu hohe Anfangskonzentrationen einiger Nährstoffe inhibierend wirken, weswegen sie begrenzt werden müssen, zum anderen führt ein hohes Substratangebot zu Überschussmetabolismus und damit zur Bildung giftiger Stoffwechselnebenprodukte (Riesenberg, 1991). Somit ist die Satzkultivierung von *E. coli* zwar der technisch einfachste und schnellste Weg Biomasse zu produzieren, allerdings in der Anwendung stark begrenzt.

Industriell weitaus wichtiger ist das sogenannte Zulaufverfahren. Es wird bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts als Alternative zum Satzverfahren eingesetzt (Weuster-Botz, 1999). Hierbei werden nicht alle Medienbestandteile von Prozessbeginn an vorgelegt, sondern durch ein Zulaufmedium im Prozessverlauf zugeführt. Die unerwünschte Nebenproduktbildung durch zu hohe Substratkonzentrationen kann vermieden werden, aber auch die Zellaktivität gezielt über die Substratverfügbarkeit geregelt werden (Chmiel *et al.*, 2018). Für die Kultivierung von *E. coli* im Zulaufverfahren wird in der Regel das Substrat Glukose limitierend zugeführt. Dabei wird im Allgemeinen zunächst eine Satzkultivierung mit geringer Glukosekonzentration durchgeführt, die nach Verbrauch aller Glukose in den Zulaufbetrieb umgestellt wird. So können deutlich höhere Biomassekonzentrationen erreicht werden als in einem reinen Satzverfahren. Die Bildung von Acetat durch Überschussmetabolismus wird gleichzeitig stark reduziert oder vermieden.

Für die Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* werden üblicherweise definierte Mineralsalz-Medien eingesetzt, wobei die Konzentration der vorgelegten Salze und Mikronährstoffe ausreichend sind, um Biotrockenmassenkonzentrationen jenseits von 100 g L^{-1} zu erreichen (Riesenberg, 1991). Da vor allem dichte Zellkulturen einen hohen Bedarf an Sauerstoff haben, muss eine hohe Sauerstofftransferrate durch ein geeignetes Reaktorkonzept gewährleistet werden (Riesenberg & Guthke, 1999). Durch einen Zulauf mit exponentiell steigender Zulaufgeschwindigkeit kann eine konstante spezifische Wachstumsrate für *E. coli* eingestellt werden. Kann jedoch nicht ausreichend Sauerstoff eingetragen werden, um einen vollständig oxidativen Abbau der Glukose zu gewährleisten, muss die Zulaufgeschwindigkeit reduziert und konstant gehalten werden (Riesenberg *et al.*, 1991). Durch diese Maßnahmen können theoretisch sehr hohe Biomassekonzentrationen erreicht werden. Rechnerisch wäre ein Maximum von 400 g L^{-1} bei dichtester Packung möglich (Riesenberg, 1991). Dies ist jedoch nicht realisierbar, da *E. coli* Suspensionen bereits ab einer Biotrockenmassenkonzentration von 220 g L^{-1} ihr Fließverhalten stark verändern (Shiloach & Fass, 2005).

3.2.2 Bakteriophage M13

Bakteriophagen, oder auch nur Phagen genannt, sind eine Untergruppe der Viren, welche Bakterien infizieren. Wie bei allen Viren handelt es sich um nicht zelluläre Partikel, die eine Wirtszelle infizieren müssen, um sich vermehren zu können. Ein Bakteriophage besteht aus einer Nucleinsäure und einer Schutzkapsel aus Proteinen, dem sogenannten Kapsid. Häufig besitzt das Kapsid eine molekulare Übertragungseinheit, die den Transfer des Genoms des Bakteriophagen in die Wirtszelle ermöglicht (Slonczewski & Foster, 2012). Aufgrund der Beschaffenheit dieser Übertragungseinheit sind viele Bakteriophagen wirtsspezifisch, können also nur eine bestimmte Sorte Bakterien infizieren. Nach der Infektion werden die Bakteriophagen intrazellulär vervielfältigt und verlassen anschließend die Zelle wieder. Dabei wird die Wirtszelle häufig lysiert. Es existieren jedoch auch Bakteriophagen, die ihre Wirtszelle bei Freisetzung von Nachkommen nicht töten. Dazu zählt der Bakteriophage M13 (Rasched & Oberer, 1986).

Der filamentöse Bakteriophage M13 wurde bereits 1963 durch Hofschneider mit einer Länge von etwa 800 nm und einem Durchmesser von etwa 8 nm beschrieben (Hofschneider, 1963). Er infiziert, wie der bereits 1960 entdeckte und verwandte Bakteriophage f1, nur *E. coli* Kulturen mit dem Genotyp F⁺ oder Hfr (Loeb, 1960) und bildet auf Agar-Kulturen homogen-trübe Plaques (Hofschneider, 1963). Als Genom enthält er einzelsträngige DNA, die im Inneren des einfachen helikalen Kapsids spiralisiert vorliegt (Slonczewski & Foster, 2012). Er gehört zu der Gruppe der F-spezifischen filamentösen Phagen (Ff-phagen), die sich durch ihre hohe genetische Ähnlichkeit auszeichnen. So haben die Phagen fd, f1 und M13 ungefähr 98,5% gleiche Sequenz, womit sie unter bestimmten Umständen als gleich gelten können (Marvin *et al.*, 2014).

M13 hat, wie in Abbildung 3.8 gezeigt, ein Kapsid bestehend aus 5 Proteinen, wobei P3 und P5 den „Kopf“, P7 und P9 den „Schwanz“ und P8 den zylindrischen Korpus bilden (Marvin, 1998). Während von den Proteinen P3, P6, P7 und P9 nur wenige Kopien vorliegen, besteht das Kapsid hauptsächlich aus vielen Hundert Kopien des Protein P8 (Rakonjac *et al.*, 2011). Die genaue Länge hängt dabei von der Länge des verpackten Genoms ab. Da das Kapsid um das Genom herum angelagert wird, können Sequenzen bis zu 12000 Basen verpackt werden (Marvin, 1998).

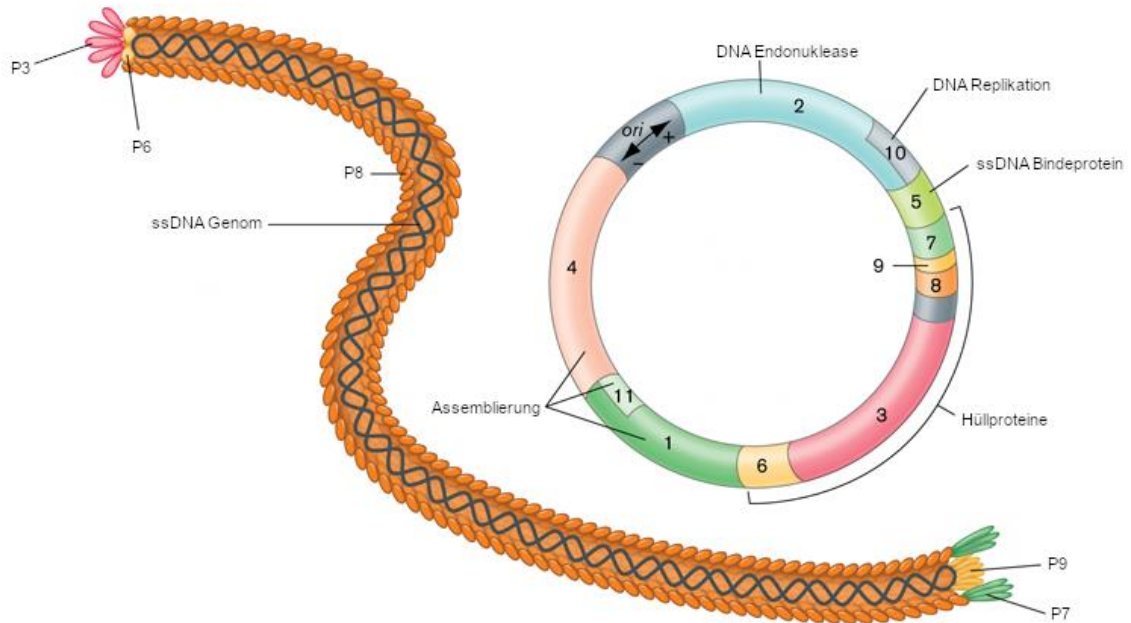


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung eines M13 Phagen und dessen Genoms. Die Gene sind durchnummeriert, wobei je ein Gen für das entsprechend nummerierte Protein (P1-11) kodiert (modifiziert nach Slonczewski & Foster, 2012).

Insgesamt besteht das Genom von M13 aus 11 Genen, wobei Gen 10 Teil von Gen 2 und Gen 11 Teil von Gen 1 ist. Die Genomlänge ist bei Wildtyp M13 etwa 6,4 kb (Slonczewski & Foster, 2012). Die Produkte der Gene 2 und 10 dienen der DNA Replikation. Das Protein 5 – Produkt des Gen 5 – bindet die entstehende ssDNA, um sie vor der Ergänzung zu dsDNA zu schützen. Die Gene 1, 4 und 11 kodieren für die Membranporen, durch die neu gebildete M13 Phagen aus der Zelle ausgeschleust werden (Mai-Prochnow *et al.*, 2015).

Tabelle 3.1: Proteine des M13 Bakteriophagen, sowie deren Funktion, entnommen aus Mai-Prochnow *et al.* (2015).

Protein	Funktion
P1	Assemblierung, Anteil des Phagen-sekretions-systems in der inneren Membran
P2	Replikation, Endonuklease, die die dsDNA der replikativen Form schneidet. Ligiert auch den entstandenen ssDNA-Strang, sodass er zirkulär ist.
P3	Kapsid Protein, schließt neu entstehende Phagen ab und sorgt für die Abkopplung von der Zellmembran. Bei Infektion vermittelt es die Adhäsion an den F-Pilus und den Sekundärrezeptor TolA.
P4	Assemblierung, Teil der Assemblierung und des Exports neuer Phagen, erzeugt einen verschließbaren Kanal durch die äußere Zellmembran.
P5	Replikation, bindet die neu entstehende ssDNA auf stark kooperative Art und Weise und verhindert so die Umwandlung in dsDNA.

- P6** Kapsid Protein, schließt zusammen mit P3 neu entstehende Phagen ab und sorgt für die Abkopplung von der Zellmembran.
- P7** Kapsid Protein, initiiert zusammen mit P9 neue Phagen, indem es mit dem Verpackungssignal auf der ssDNA interagiert.
- P8** Kapsid Protein, assembliert in ein helikales, Filament-artiges Kapsid, welches die genomische ssDNA einschließt. Dabei wird P5 verdrängt.
- P9** Kapsid Protein, initiiert zusammen mit P7 neue Phagen, indem es mit dem Verpackungssignal auf der ssDNA interagiert.
- P10** Replikation, Translationsprodukt eines in Gen 2 gelegenen Start-Kodons. Bindet dsDNA und verhindert deren Abbau.
- P11** Assemblierung, Translationsprodukt eines in Gen 1 gelegenen Start-Kodons. Teil des Transmembrankomplexes mit P1 und P4 zur Phagen-Assemblierung. Verhindert den Abbau von P1 durch endogene Proteasen.
-

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen des M13 Phagen (Abbildung 3.9) kann die filamentöse Struktur gut erkannt werden.

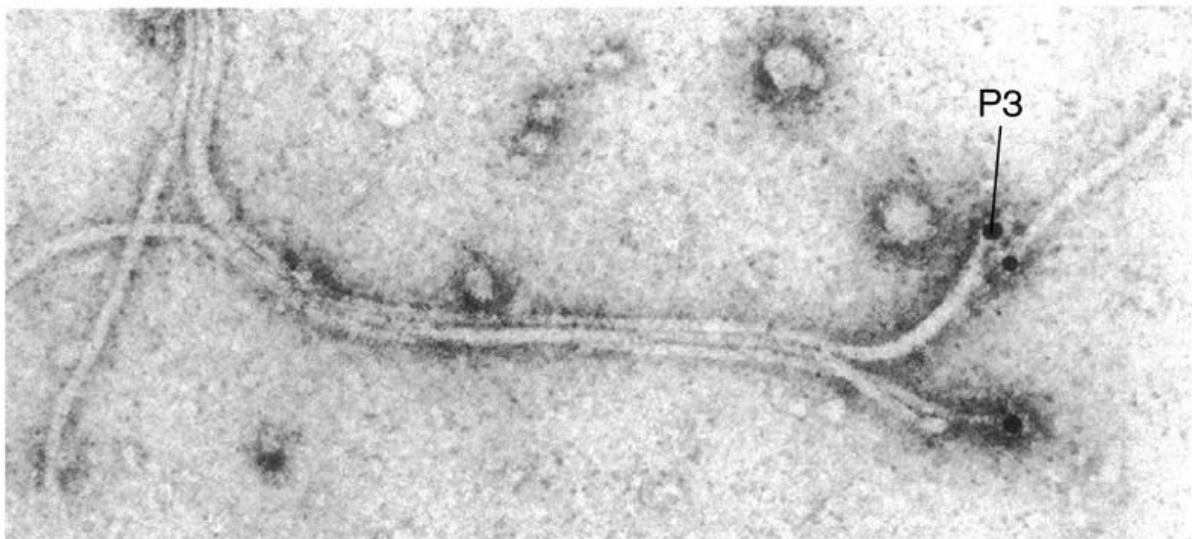


Abbildung 3.9: Elektronenmikroskopische Aufnahme von M13 Phagen. P3 markiert das „Kopf“-Protein des Phagen (Slonczewski & Foster, 2012).

Lebenszyklus des M13-Phagen

Die Vermehrung von M13 Phagen findet durch Infektion einer Wirtszelle statt. Anders als bei anderen Viren wird die Wirtszelle allerdings nicht bei Freisetzung der Nachkommen lysiert. Durch die Sekretion der Phagen über eine Membranpore, die auf dem Genom des Phagen kodiert ist, bleibt die Wirtszelle intakt und teilungsfähig. Lediglich die maximale

Wachstumsgeschwindigkeit wird reduziert (Rasched & Oberer, 1986; Kick, Behler, *et al.*, 2017).

Grundsätzlich beginnt der Vermehrungszyklus mit der Infektion der Wirtszelle. Dazu findet eine Adsorption der N2 Domäne des P3 an einen F-Pilus von *E. coli* statt. Dadurch wird eine oszillierende Verkürzung bzw. Verlängerung des F-Pilus ausgelöst, welche das Phagenpartikel an die Zelloberfläche bringt (Clarke *et al.*, 2008). Gleichzeitig verändert sich P3 konformationell, sodass die Domäne N1 freigegeben wird (Hoffmann-Thoms *et al.*, 2013). Bei Erreichen der Zelloberfläche bindet die N1 Domäne von P3 an TolA des Transmembrankomplexes TolQRA. Anschließend ist es wahrscheinlich, dass sich die hydrophobe Helix des C-Terminus von P3, wie in Abbildung 3.10 gezeigt, in die innere Membran einlagert, wobei das ssDNA Genom in das Cytosol der Zelle freigegeben wird (Rakonjac & Bennett, 2009). Die restlichen Hüllproteine werden dabei auch in die innere Membran eingelagert (Mai-Prochnow *et al.*, 2015).

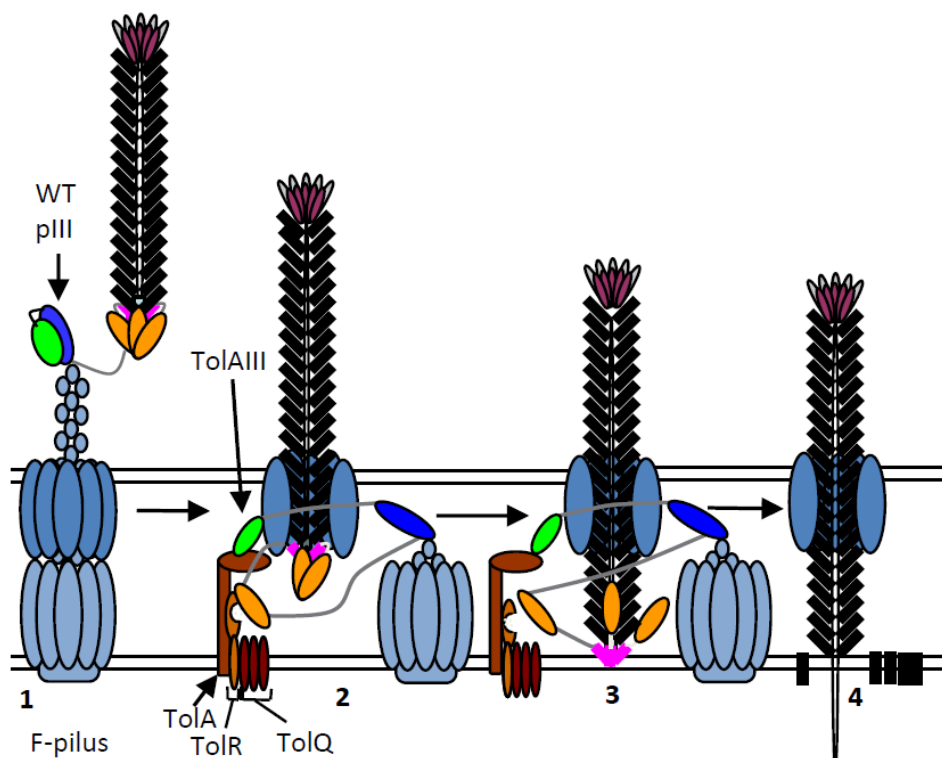


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des Infektionsmechanismus von M13 (Rakonjac & Bennett, 2009). 1: Bindung der N2 Domäne von P3 an den F-Pilus. 2: Binden der N1 Domäne von P3 an den Transmembrankomplex TolQRA. 3: Öffnen der C-Domäne von P3 und Einlagerung der C-terminalen, hydrophoben Helix in die innere Membran. 4: Genomische ssDNA wird ins Cytoplasma freigesetzt. Der genaue Vorgang in den Schritten 2 und 3 ist nicht sicher geklärt.

Im nächsten Schritt wird die ssDNA in doppelsträngige DNA umgewandelt. Dies geschieht mit Hilfe von wirtseigenen Enzymen und Polymerasen und führt zur Bildung der sogenannten Replikativen Form (RF) des Phagen (Mai-Prochnow *et al.*, 2015). Innerhalb der ersten 10 Minuten der Infektion werden so etwa 100 bis 200 Moleküle der doppelsträngigen RF Form der DNA gebildet (Hohn *et al.*, 1971). Durch die hohe Kopienzahl der RF werden schnell die

für die Bildung neuer Phagen notwendigen Proteine gebildet. P2 initiiert die DNA-Replikation über einen *rolling circle* Mechanismus. Dazu führt es einen Einzelstrangbruch des (+)-Stranges in der RF durch und bindet kovalent an das 5' Ende dieses Strangs (Rasched & Oberer, 1986; Asano *et al.*, 1999). Mit dem freien 3' Ende als Primer synthetisiert die wirtseigene DNA Polymerase III einen neuen (+)-Strang, der den alten verdrängt. Ist die DNA-Kopie vollständig, schneidet P2 die freie ssDNA ab und zyklisiert diese wieder (Asano *et al.*, 1999; Rakonjac *et al.*, 2011). Liegt ein ausreichend hohes Level des Protein P5 im Cytosol vor (bis zu 10^5 Kopien), wird der neu entstandene (+)-Strang gebunden und so vor der Maschinerie der Zelle geschützt. Dadurch wird der neue ssDNA Strang nicht zu doppelsträngiger DNA ergänzt (Rakonjac *et al.*, 2011; Mai-Prochnow *et al.*, 2015). Dieser Komplex aus ssDNA und etwa 1500 Kopien des Protein P5 liegt in einer Zelle mehrere hundert Mal vor und kann bereits 4 Minuten nach Infektion detektiert werden (Forsheit *et al.*, 1971; Marvin, 1998).

Die Freisetzung erfolgt im Anschluss über den Transmembrankomplex aus den Proteinen P4, P1 und P11. Dabei wird das neue Phagenpartikel extrudiert, wobei gleichzeitig die Proteinhülle assembliert wird. Die Wirtszelle wird dabei nicht geschädigt. Für die Freisetzung interagieren zunächst die Proteine P7 und P9 mit einer Haarnadelstruktur in der ssDNA, dem sogenannten Verpackungssignal (Russel & Model, 1989; Feng *et al.*, 1999). Außerdem interagiert das Verpackungssignal mit dem Transmembrankomplex aus P4, P1 und P11, woraufhin die Assemblierung des Phagen startet. Hierbei kann P1 über eine ATPase-Aktivität ATP zur Assemblierung der Phagen hydrolysieren (Feng *et al.*, 1997). Während der Assemblierung werden die Einheiten von P5 an der inneren Zellmembran verdrängt und durch Einheiten von P8 ersetzt, die sich helikal um die ssDNA anordnen (Marvin, 1998; Marvin *et al.*, 2014). Am Ende dieser Elongation wird das Kapsid mit einem membrangebundenen Komplex aus P3 und P6 abgeschlossen. Durch Änderung der Konformation wird der neu gebildete Bakteriophage von der Zellmembran abgelöst und freigesetzt (Rakonjac *et al.*, 1999). So entstehen, wie auch in Abbildung 3.11 schematisch dargestellt, innerhalb von etwa 15-20 Minuten nach Infektion die ersten neuen Bakteriophagenpartikel (Karlsson *et al.*, 2005).

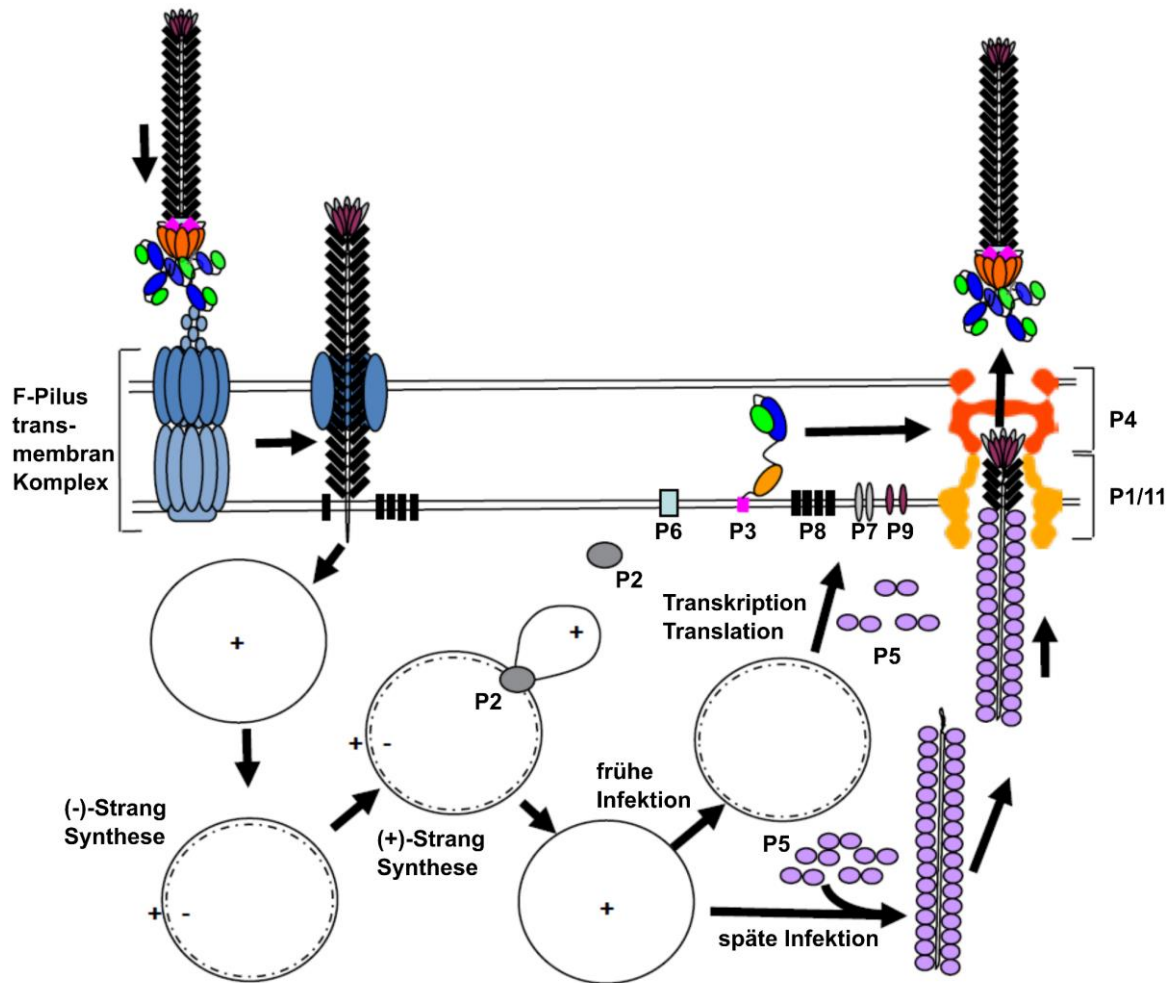


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der Replikation von M13-Phagen (modifiziert nach Rakonjac *et al.*, 2011).

3.2.3 Phagemid, Helferphage und Helferplasmid

Anfang der 80er Jahre des 20ten Jahrhunderts wurde die ssDNA, die mit Hilfe von M13 Phagen hergestellt werden konnte, zu verschiedenen Zwecken eingesetzt. Dabei wurden die *inserts* in das Phagengenom immer größer. Dies hatte den Nachteil, dass besonders große *inserts* im Genom relativ instabil waren, was die Arbeit damit deutlich erschwerte (Zinder & Boeke, 1982). Gleichzeitig wuchs das Verständnis über den Mechanismus, wie in der Zelle ssDNA hergestellt und verpackt wird. Besonders wurden Fortschritte beim Verständnis der dazu notwendigen regulatorischen Sequenzen im Bereich der sogenannten intergenen Region (IG) gemacht, die in Abbildung 3.12 dargestellt ist. Diese Region liegt im M13 Genom zwischen den Genen 4 und 2, kodiert selbst aber für kein Gen, sondern enthält funktionelle Sequenzen. Damit wurden auch erste chimäre Vektoren aus Phage und Plasmid hergestellt (Gian Paolo Dotto *et al.*, 1981; Dotto *et al.*, 1982, 1984; Dotto & Zinder, 1983).

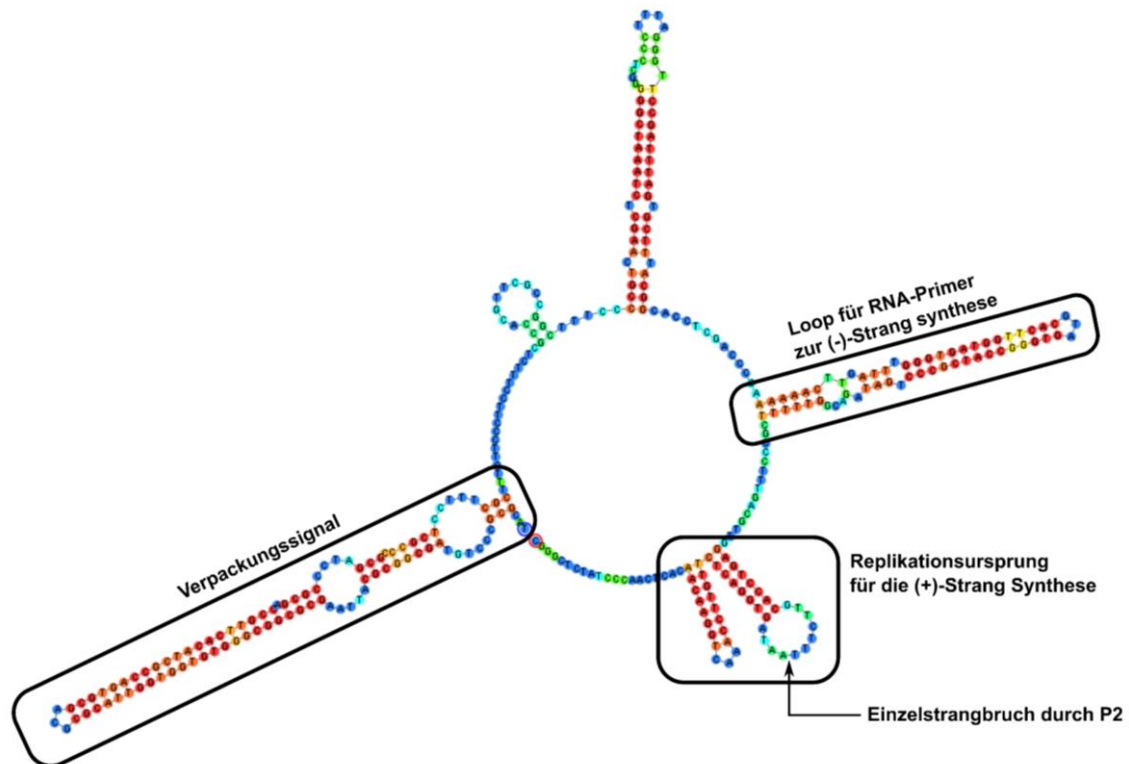


Abbildung 3.12: Theoretische Sekundärstruktur der intergenen Region (IG) des M13 Phagen. Wesentliche Sekundärstrukturmotive sind hervorgehoben und annotiert (Vieira & Messing, 1987; Specthrie *et al.*, 1992). Die B-Domäne des Replikationsursprungs ist hier nicht abgebildet, da sie keine Sekundärstruktur ausbildet. Die Farbe in der eine Base hinterlegt ist, symbolisiert hier die Wahrscheinlichkeit, mit der sie eine Interaktion mit einer anderen Base eingeht. Rot: sehr hohe Wahrscheinlichkeit, Blau: sehr niedrige Wahrscheinlichkeit.

Chimäre Vektoren aus Phage und Plasmid werden heute auch Phagemid genannt. Sie enthalten ein Plasmid-Rückgrat mit einem Plasmid-Replikationsursprung (*ori*) und einem Selektionsmarker sowie die gesamte IG des M13 Phagen oder Teile der davon (Vieira & Messing, 1987). Ein solcher Vektor kann durch seinen Plasmid-*ori* unabhängig von der Phagenmaschinerie intrazellulär als doppelsträngige DNA propagiert und vervielfältigt werden. In Anwesenheit eines M13 Phagen wird wegen des vorhandenen M13-*ori* auch ssDNA gebildet und dank des Verpackungssignals auch in Kapside verpackt aus der Zelle ausgeschleust. Dadurch können auch große *inserts* mit Hilfe der Plasmideigenschaften stabil propagiert und ihre ssDNA in großen Mengen produziert werden (Vieira & Messing, 1987).

Um das zu ermöglichen, wird ein Helferphage benötigt. Zunächst einmal handelt es sich dabei um einen normalen M13 Phagen, der nach Infektion einer Zelle, die ein Phagemid trägt, die notwendige Phagenmaschinerie mitbringt, um auch das Phagemid als ssDNA herzustellen und aus der Zelle auszuschleusen. Hierbei könnte erwartet werden, dass etwa die Hälfte der möglichen Phagenausbeute auf Phagemidpartikel angerechnet werden kann. Da das Phagemid allerdings mit der intrazellulären Vermehrung des Phagen konkurriert, ergibt sich eine deutlich verringerte Gesamtausbeute (Vieira & Messing, 1987).

Aus diesem Grund entwickelten Vieira und Messing (1987) den Helferphagen M13KO7, der sowohl die Gesamtausbeute verbessert als auch das Produktverhältnis zu Gunsten der Phagemidpartikel verändert. Dafür führten sie einige Änderungen im Genom des Bakteriophagen ein. Um auch das Genom des Bakteriophagen unabhängig von dem M13-ori intrazellulär stabil und die Kopienzahl hoch zu halten, führten sie einen Plasmid-ori ein. Zur Positivselektion wurde zusätzlich ein Kanamycinresistenzmarker eingefügt. Beide Motive wurden strategisch in der intergenen Region eingefügt. Im Detail besteht der etwa 140 Basen lange M13-ori aus einer A- (40 Basen) und einer B-Domäne (100 Basen). Während die A-Domäne essentiell ist, kann die B-Domäne fehlen. Dies resultiert in einer deutlich geringeren Replikationshäufigkeit (Dotto & Zinder, 1984). Bei M13KO7 wurde der Plasmid-ori sowie der Kanamycinresistenzmarker zwischen Domäne A und B eingefügt. Dadurch funktioniert in M13KO7 der M13-ori deutlich schlechter als der natürliche. Durch diesen Eingriff liegt das dsDNA-Genom des Helferphagen zwar ausreichend häufig in der Zelle vor, um ausreichend Protein zu produzieren, gleichzeitig wird allerdings deutlich verstärkt die ssDNA des Phagemids gebildet, wodurch mehr Phagemid-Partikel als Phagenpartikel entstehen. Dadurch, dass Helferphage und Phagemid kompatible Plasmid-ori haben, konkurrieren sie nicht in der Kopienzahl (Vieira & Messing, 1987).

Eine weitere Möglichkeit Phagemid-basiert ssDNA herzustellen, ist die Verwendung eines Helferplasmids. Solche Plasmide tragen das Genom des M13 Phagen mit Ausnahme der intergenen Region. Dadurch kodieren sie für die Gene des M13 Phagen, die entsprechend intrazellulär hergestellt werden. Helferplasmide enthalten zusätzlich zum M13-Genom ein Plasmidrückgrat, wodurch unabhängig ihre Kopienzahl und Propagation sichergestellt wird. Im Grunde agieren Helferplasmide bei der Produktion von Phagemidpartikeln genau wie Helferphagen. Der entscheidende Unterschied liegt darin, dass Helferplasmide kein Verpackungssignal und keinen M13-ori haben und somit nicht einmal in geringer Menge als Phagen produziert werden sondern gar nicht. Die Maschinerie zur Phagemidpartikelproduktion wird zur Verfügung gestellt, ohne überhaupt ssDNA aus dem Helferplasmid zu produzieren (Chasteen *et al.*, 2006). Um mit dieser Methode allerdings ssDNA herstellen zu können, müssen beide Plasmide, sowohl das Phagemid als auch das Helferplasmid künstlich in die Zelle eingebracht werden. Dazu können die Zellen entweder chemisch oder elektrisch transformiert werden (Praetorius *et al.*, 2017). Hierbei ist die Ausbeute an Zellen, die korrekt beide Plasmide aufnehmen, relativ gering.

3.3 Kultivierung von Mikroorganismen

Die Kultivierung von Mikroorganismen beschreibt im Kern jede Methode diese gezielt zu vermehren. Dazu werden äußere Bedingungen geschaffen, die die Zunahme von sowohl der

Zellzahl als auch der Zellmasse begünstigen. Dabei reichen die Verfahren von sehr einfachen, wie der Kultivierung auf Agarplatten, bis hin zu aufwändigen Verfahren, wie zum Beispiel der sogenannten Zulaufkultivierung im Rührkesselbioreaktor. Diese Methoden versuchen alle bestimmte Parameter wie Temperatur, pH und Verfügbarkeit verschiedener Nährstoffe möglichst konstant zu halten oder diese sogar zu regeln.

Die in dieser Arbeit verwendeten *Escherichia coli* nehmen dabei eine besondere Position ein, da ihre Kultivierung bereits sehr gut untersucht ist. Dieser Mikroorganismus benötigt neben Quellen für Stickstoff, Phosphat und Kohlenstoff für optimales Wachstum auch Sauerstoff. Werden geeignete Bedingungen zur Kultivierung von *E. coli* hergestellt, lässt sich deren Wachstum meist mit vereinfachenden Annahmen über mathematische Modelle berechnen. Dabei werden sowohl die Massenbilanzen der verwendeten Prozessführungen als auch formalkinetische Modelle eingesetzt. Die im folgenden beschriebenen Modelle sind soweit nicht anders angegeben aus Chmiel *et al.* (2018) entnommen.

3.3.1 Kinetik von Wachstum und Produktbildung

Das Wachstum von Mikroorganismen wird auch heute noch zumeist mit sogenannten unsegregierten und unstrukturierten Modellen beschrieben. Dabei wird vereinfacht angenommen, dass keine Heterogenität in der Zellpopulation vorliegt (unsegregiert) und gleichzeitig werden die Zellen als unkompartimentierte black-box Systeme (unstrukturiert) betrachtet. Dies lässt erstaunlich genaue Berechnungen des gesamten Ensembles zu, die im Vergleich zu stöchiometrischen Netzwerkmodellen für heterogene Zellpopulationen sehr einfach zu berechnen sind. Das Wachstum der Zellen wird hierbei als autokatalytische Reaktion betrachtet, wobei Wachstum als Massenzunahme beschrieben wird, die von einem mittleren Zellvolumen ausgeht und somit mit der Zellzahl übereinstimmt. Dadurch ergibt sich wie in Gleichung 3.1 gezeigt eine direkte Proportionalität zwischen Wachstumsrate und Biomassekonzentration.

$$r_X = \frac{dc_X}{dt} = \mu * c_X \quad \text{Gleichung 3.1}$$

r_X	Wachstumsgeschwindigkeit, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
t	Zeit, h
μ	Spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
c_X	Biomassekonzentration, g L^{-1}

Daraus ergibt sich die Definition der spezifischen Wachstumsrate μ :

$$\mu = \frac{1}{c_X} * \frac{dc_X}{dt} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Durch Integration über die Zeit ergibt sich die exponentielle Wachstumskinetik in Abhängigkeit der Anfangs-Biomassekonzentration c_{X0} , wobei allerdings μ konstant sein muss:

$$c_X = c_{X0} * e^{\mu * t} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

c_{X0} Biomassekonzentration zu Beginn der Reaktion, g L⁻¹

Bei der Kultivierung von Mikroorganismen werden Medien in der Regel so zusammengesetzt, dass das Wachstum lediglich von einem entscheidenden Substrat – meistens der Kohlenstoffquelle – abhängt. Alle anderen Substrate werden im Überschuss zugegeben, so dass sie weder limitierend noch inhibierend auf das Zellwachstum wirken. Unter diesen Bedingungen lässt sich, wie in Abbildung 3.13 dargestellt, ein formaler Zusammenhang zwischen der spezifischen Wachstumsrate und der Konzentration des limitierenden Substrats herstellen. Diesen beschrieb Monod (1949) analog der Michaelis-Menten-Kinetik einer Enzymreaktion mit einem Substrat (Gleichung 3.4).

$$\mu = \mu_{max} * \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

μ_{max} Maximale spezifische Wachstumsrate, h⁻¹

c_S Substratkonzentration, g L⁻¹

K_S Affinitätskonstante des Substrats, g L⁻¹

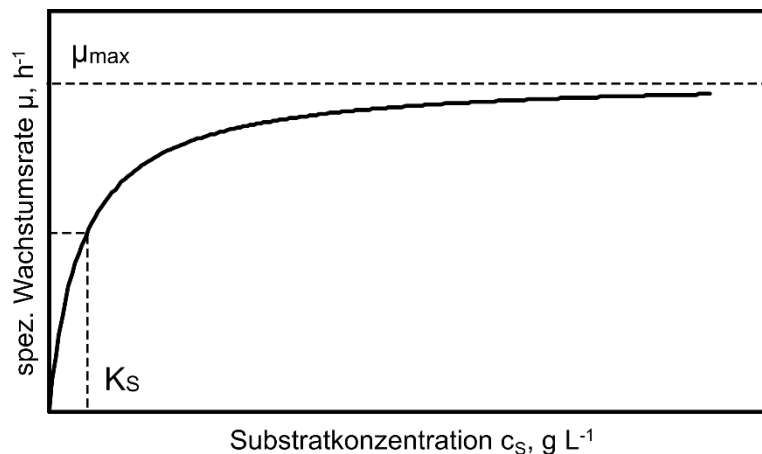


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Sättigungskinetik der spezifischen Wachstumsrate in Abhängigkeit des limitierenden Substrats nach Monod.

Das Modell nach Monod benutzt zwei Parameter. Die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} kann theoretisch bei sehr großem Substratüberschuss erreicht werden, wobei sich die tatsächliche Wachstumsgeschwindigkeit asymptotisch an die maximale annähert. Dieses Modell beachtet allerdings nicht, dass viele Substrate spätestens bei extremem Überschuss auch einen inhibierenden Effekt haben. Die Affinitätskonstante K_S beschreibt die Substratkonzentration bei halbmaximaler Wachstumsgeschwindigkeit. Diese Konstante ist

abhängig von der Affinität des kultivierten Mikroorganismus zu dem betrachteten Substrat. Bei dem verwendeten Mikroorganismus *E. coli* und dem Substrat Glukose ist die Affinitätskonstante relativ gering. K_s erreicht hier Werte zwischen $53 \mu\text{g L}^{-1}$ und 7mg L^{-1} bei 37°C (Senn *et al.*, 1994), wobei der genaue Wert stark vom *E. coli*-Stamm abhängt.

Ähnlich wie die Wachstumsgeschwindigkeit werden die volumetrischen und spezifischen Substrataufnahme- und Produktbildungsrate definiert.

$$r_S = \frac{dc_S}{dt} = q_S * c_X \quad \text{Gleichung 3.5}$$

r_S Substrataufnahmerate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
 q_S Spezifische Substrataufnahmerate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

$$r_P = \frac{dc_P}{dt} = q_P * c_X \quad \text{Gleichung 3.6}$$

c_P Produktkonzentration, g L^{-1}
 r_P Produktbildungsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
 q_P Spezifische Produktbildungsrate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

Um die Substrataufnahmerate und die Wachstumsgeschwindigkeit in Relation zu setzen wird der Biomasseertragskoeffizient Y_{XS} eingeführt.

$$Y_{XS} = \frac{dc_X}{dc_S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{\mu}{q_{S,\mu}} \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Y_{XS} Biomasseertragskoeffizient, g g^{-1}
 $q_{S,\mu}$ Spezifische Substrataufnahmerate für das Zellwachstum, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

Genauso wird die Produktselektivität Y_{PS} eingeführt, um Substrataufnahmerate und Produktbildungsrate in Relation zu setzen.

$$Y_{PS} = \frac{dc_P}{dc_S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{q_P}{q_S} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

Y_{PS} Produktselektivität, g g^{-1}

Die in Gleichung 3.8 verwendete spezifische Substrataufnahmerate q_S lässt sich wie bereits in Gleichung 3.7 gezeigt in weitere Terme aufteilen, bei denen zwischen Substrataufnahme für das Wachstum, Erhaltungstoffwechsel und Produktbildung unterschieden wird.

$$q_S = q_{S,\mu} + q_{S,m} + q_{S,P} = \frac{\mu}{Y_{XS}} + m_S + q_{S,P} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

m_S	Substrataufnahmerate des Erhaltungsstoffwechsels, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_{S,P}$	Substrataufnahmerate für die Produktbildung, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$

Damit erweitert sich das formalkinetische Modell nach Monod aus Gleichung 3.4 um einen Term für den Erhaltungsstoffwechsel.

$$\mu = \mu_{max} * \frac{c_S}{c_S + K_S} - m_S * Y_{XS} \quad \text{Gleichung 3.10}$$

3.3.2 Betriebsweisen mikrobiologischer Prozesse

Zur Vermehrung von Mikroorganismen gibt es eine Vielzahl möglicher Verfahren. Aufgrund ihrer außerordentlichen Bedeutung in der Kultivierung von *E. coli*, wurden in dieser Arbeit Produktionsprozesse nur in Rührkesselreaktoren durchgeführt. Mit ihren Scheibenblattrührern hatten die hier verwendeten Reaktoren vorwiegend radial fördernde Rührorgane. So kann die vorhandene Durchmischung als nahezu ideal beschrieben werden.

Zur Bilanzierung der Bioprozesse wurde demnach der Rührkesselreaktor als ideal angenommen. Räumlich sind dabei die Konzentrationen aller Reaktionskomponenten, die physikalischen Eigenschaften der Reaktionsmischung und alle Reaktionsgeschwindigkeiten gleich (Chmiel *et al.*, 2018). So lässt sich eine allgemeine Massenbilanzgleichung aufstellen:

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{d(c_i * V_R)}{dt} = F_{ein} * c_{i,ein} - F_{aus} * c_{i,aus} + r_i * V_R \quad \text{Gleichung 3.11}$$

m_i	Masse der Komponente i, g
c_i	Konzentration der Komponente i, g L^{-1}
F_{ein}	Zulaufvolumenstrom, L h^{-1}
$c_{i,ein}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf, g L^{-1}
F_{aus}	Ablaufvolumenstrom, L h^{-1}
$c_{i,aus}$	Konzentration der Komponente i im Ablauf, g L^{-1}
r_i	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
V_R	Reaktionsvolumen, L

Dadurch, dass von einem ideal durchmischten Reaktor ausgegangen wird, kann die Konzentration der Komponente i im Ablauf gleich der im Reaktor gesetzt werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird für Substrate als negativ und für Produkte und Biomasse als positiv definiert.

Je nach Verfahren können einzelne Terme der Bilanz gleich null gesetzt werden. So wird in einem Satzverfahren weder ein Zulauf noch ein Ablauf vorgesehen, während in einem reinen Zulaufverfahren kein Ablauf existiert. Nur im kontinuierlich betriebenen Verfahren werden sowohl Zu- als auch Ablauf benötigt. Da in dieser Arbeit nur mit Satz- und Zulaufverfahren gearbeitet wurde, werden diese im Folgenden genauer betrachtet.

Satzverfahren

Satzverfahren werden als vollständig geschlossene Systeme betrachtet, wobei kein Zu- oder Ablauf existiert. Die Begasung, die Zugabe von Stellmitteln oder auch die Entnahme von Proben wird dabei vernachlässigt. Es wird also von einem nahezu konstanten Reaktionsvolumen ausgegangen, wodurch sich die Massenbilanz stark vereinfacht.

$$\frac{dc_i}{dt} = r_i \quad \text{Gleichung 3.12}$$

Unter geeigneten Bedingungen lässt sich ein Satzverfahren in sechs Phasen unterteilen, die in Abbildung 3.14 schematisch dargestellt sind. Nach der Zugabe der Zellen (Inokulation) kommt es zunächst zu keiner Vermehrung, da sich die Zellen an das Medium anpassen (Adaptionsphase). Nach initialer Anpassung steigt langsam die Wachstumsrate (Beschleunigungsphase), bis die unter den gegebenen Bedingungen maximale spezifische Wachstumsrate erreicht wird (exponentielle Wachstumsphase). Werden ein oder mehrere Substrate knapp, so verlangsamt sich das Wachstum wieder, da der Term $\frac{c_S}{c_S + K_S}$ aus der Monod-Kinetik in Gleichung 3.4 wieder kleiner als 1 wird (Substratlimitierungsphase). Ist im Anschluss dann mindestens ein Substrat vollständig verbraucht, stellt sich ein Gleichgewicht zwischen wachsenden und sterbenden Zellen ein (stationäre Phase). Überwiegt die Sterberate, kommt es am Ende zur Absterbephase.

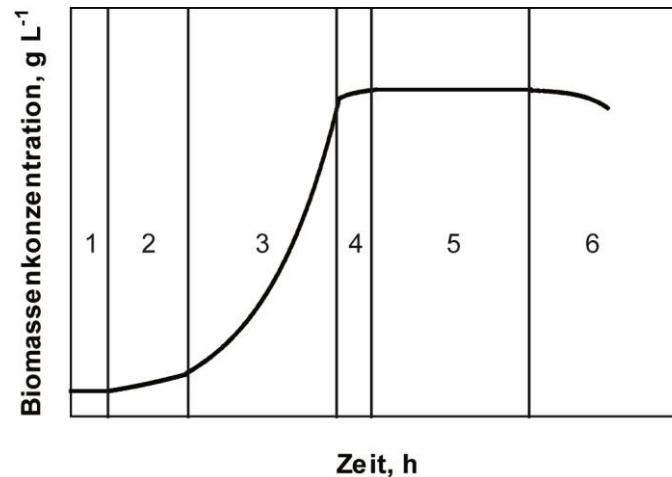


Abbildung 3.14: Schematisch dargestelltes Wachstum von Mikroorganismen im Satzverfahren. Es wird unterschieden zwischen Adaptionsphase (1), Beschleunigungsphase (2), exponentieller Wachstumsphase (3), Substratlimitierungsphase (4), stationärer Phase (5) und Absterbephase (6).

Zulaufverfahren

Bei Zulaufverfahren handelt es sich um halboffene Systeme. Hier wird nach einer Satzphase konzentrierte Substratlösung zu dosiert und so die Zulaufphase gestartet. Dabei existiert kein Ablauf, sodass das Reaktionsvolumen über die Zeit zunimmt. Durch die gezielt limitierende Zugabe von Substrat kann hier ein inhibierender Effekt durch Substrattoxizität bei hohen Substratkonzentrationen vermieden werden. Außerdem wird eine Sauerstofflimitierung umgangen, da nicht mehr Substrat zugegeben wird, als Sauerstoff eingetragen werden kann. Zusätzlich wird dadurch auch der Substratüberschussmetabolismus vermieden. Somit können in Zulaufprozessen hohe Biomassekonzentrationen erreicht werden und damit auch eine hohe volumetrische Produktivität. Deshalb sind solche Prozesse industriell sehr wichtig (Hewitt *et al.*, 2000; Weuster-Botz *et al.*, 2005).

Durch das Weglassen des Ablaufs verändert sich die Massenbilanz (Gleichung 3.11) im Zulaufverfahren folgendermaßen:

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{d(c_i * V_R)}{dt} = F_{ein} * c_{i,ein} + r_i * V_R \quad \text{Gleichung 3.13}$$

Durch den Zulauf entsteht auch eine zeitliche Änderung des Reaktionsvolumens. Mathematisch können die Zustandsgrößen c_i und V_R getrennt werden:

$$V_R * \frac{dc_i}{dt} + c_i * \frac{dV_R}{dt} = F_{ein} * c_{i,ein} + r_i * V_R \quad \text{Gleichung 3.14}$$

Gleichzeitig beschreibt der Zulaufvolumenstrom F_{ein} bereits die Änderung des Volumens:

$$\frac{dV_R}{dt} = F_{ein} \quad \text{Gleichung 3.15}$$

Somit ergibt sich aus Gleichung 3.14 und Gleichung 3.15 die zeitliche Änderung der Konzentration der Komponente i folgendermaßen:

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F_{ein}}{V_R} * (c_{i,ein} - c_i) + r_i \quad \text{Gleichung 3.16}$$

Innerhalb der Zulaufverfahren gibt es wiederum verschiedene Zulaufprofile. So kann zum Beispiel ein konstanter, ein linear ansteigender oder sogar ein exponentiell ansteigender Zulauf eingestellt werden (Shiloach & Fass, 2005). Außerdem können technische Lösungen eingesetzt werden um den Zulaufvolumenstrom anhand von Messdaten zu regeln. Hier kann zum Beispiel die Substratkonzentration im Reaktionsmedium *online* gemessen werden und auf einem Sollwert konstant gehalten werden (Horn *et al.*, 1996). Alternativ können auch andere *online* Prozessdaten wie zum Beispiel Werte der Abgasmessung zur Einstellung des Zulaufs genutzt werden (Shiloach & Fass, 2005). Soll allerdings ohne großen apparativen Aufwand die Wachstumsrate konstant und unter dem maximalen Wert gehalten werden, kann dies auch mit einem vorgegebenen exponentiellen Zulaufprofil erreicht werden. So wird auch die Substratakkumulation und die Nebenproduktbildung vermieden (Riesenberg, 1991). In diesen Strategien wird stets angenommen, dass die Substratkonzentration im Reaktionsgemisch zeitlich unverändert ist, wodurch der Volumenstrom folgendermaßen berechnet werden kann:

$$F_{ein} = \frac{-V_R * r_S}{(c_{S,ein} - c_S)} \quad \text{Gleichung 3.17}$$

Unter Berücksichtigung der Gleichungen für Substrataufnahme (Gleichung 3.5 & Gleichung 3.9), wobei nur von Wachstum ausgegangen wird, können Stoffbilanz und Formalkinetik gekoppelt werden. Bei allen Zulaufstrategien wird die Substratkonzentration im Reaktionsgemisch relativ gering gehalten, um Nebeneffekte zu vermeiden. Gleichzeitig ist die Substratkonzentration im Zulauf sehr hoch, um möglichst wenig Volumen zugeben zu müssen. Dadurch kann angenommen werden, dass die Substratkonzentration im Zulauf viel größer ist als die im Reaktor ($c_{S,ein} \gg c_S$). Da das Zulaufvolumen so gering gehalten wird wie möglich, kann ferner die Annahme getroffen werden, dass das Reaktionsvolumen konstant bleibt. Dadurch, dass es in dem Fall zu nahezu keiner Verdünnung kommt, kann auch die Biomassezunahme während des exponentiellen Zulaufs als exponentielles Wachstum wie im Satzprozess (Gleichung 3.3) beschrieben werden. Somit lässt sich der notwendige Zulaufvolumenstrom für eine konstante Wachstumsrate berechnen:

$$F_{ein} = \frac{\mu_{set}}{c_{S,ein} * Y_{XS}} * c_X * e^{\mu_{set} * \Delta t} * V_{R,0} \quad \text{Gleichung 3.18}$$

μ_{set} vorgegebene spezifische Wachstumsrate, h⁻¹
 $V_{R,0}$ Initiales Reaktionsvolumen, L

Ist die Substrataufnahme für den Erhaltungsstoffwechsel sowie die Produktbildung bekannt, kann der Term noch darum ergänzt werden:

$$F_{ein} = \left(\frac{\mu_{set}}{Y_{XS}} + m_S + q_{S,P} \right) * \frac{c_X * V_{R,0}}{c_{S,ein}} * e^{\mu_{set} * \Delta t} \quad \text{Gleichung 3.19}$$

Ein so berechnetes exponentielles Zulaufprofil ermöglicht eine konstante Wachstumsrate, solange kein anderes Substrat im Reaktionsgemisch limitierend wird oder Stoffwechselnebenprodukte oder gar die erwünschten Produkte inhibierend werden. Der wichtigste Faktor bei einer solchen Kultivierung ist der Sauerstoffeintrag, da dieser meist die größte technische Herausforderung darstellt. Daher werden in der Praxis oft Zulaufverfahren mit mehreren Phasen eingesetzt, wobei sich lineare oder konstante Zulaufprofile an eine exponentielle Phase anschließen (Chmiel *et al.*, 2018).

4 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Materialien und Methoden vorgestellt. Die standardmäßig verwendeten Geräte und Chemikalien sind im Anhang zu finden.

4.1 Medien

4.1.1 Lysogeny broth Medium

Das *Lysogeny broth* Medium (LB-Medium) wurde zum Zweck der Stammhaltung und für molekularbiologische Klonierungsarbeiten eingesetzt. Da das Medium in seiner herkömmlichen Formulierung nur sehr geringe Mengen an zweiwertigen Ionen enthält, wurden hier Zusätze zugegeben, die das Wachstum von *E. coli* unterstützen sollen. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung des *Lysogeny broth* Mediums

Chemikalie	Summenformel	Endkonzentration, g L ⁻¹
Pepton aus Casein		10
Hefeextrakt		5
Natriumchlorid	NaCl	5
Magnesiumsulfat Heptahydrat	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,13 (0,5 mM)
Calciumchlorid	CaCl	0,06 (0,5 mM)
Diammoniumhydrogenphosphat	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,13 (1 mM)
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	5

Das Pepton, der Hefeextrakt und das Natriumchlorid werden in vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) gelöst und mit 10 M Kaliumhydroxidlösung auf einen pH von 7,0 eingestellt. Diese Lösung wird bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die restlichen Salze werden als sterile Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 M jeweils einzeln vorbereitet und entsprechend zugegeben. Analog wird eine sterile Glukoselösung (500 g L⁻¹) entsprechend zugegeben.

Für die Herstellung von Agarplatten mit diesem Medium wurden der Grundlösung vor dem autoklavieren 20 g L⁻¹ Agar zugegeben, wohingegen die Zusätze nach dem Autoklavieren weggelassen wurden. Für Selektionsplatten wurde 0,1% (v/v) sterile Antibiotikalösung bei 50°C unter der Sterilwerkbank zugegeben. Von der fertigen Lösung wurden je ca. 25 mL in

Petrischalen gegossen und bis zum Aushärten unter der Sterilwerkbank stehen gelassen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Platten bei 4°C gelagert.

4.1.2 2xYT Medium

Das Komplexmedium 2xYT wurde vor allem zur Herstellung von Phagemid-Partikeln in Vorkulturröhrchen und Schüttelkolben verwendet. Seine Zusammensetzung ist in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung des 2xYT Mediums

Chemikalie	Summenformel	Endkonzentration, g L ⁻¹
2xYT Fertigmischung		31
Magnesiumsulfat Heptahydrat	MgSO ₄ *7H ₂ O	1,2

Die Fertigmischung (2xYT Medium, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wird in VE-Wasser gelöst und anschließend 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird das Magnesiumsulfat aus einer Stammlösung steril zugegeben.

4.1.3 Mineralmedium nach Riesenberg

Das für die Hochzelldichtekultivierung entwickelte Medium nach Riesenberg *et al.* (1991) wird in seiner Zusammensetzung in Tabelle 4.3 aufgeführt. Die ersten drei Komponenten in Tabelle 4.3 ergeben das Grundmedium dem die restlichen Komponenten als Stammlösungen zugegeben werden. Dabei wurden die Spurenelemente, als 50-fach konzentrierte Lösung, getrennt in VE-Wasser gelöst und 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Das Grundmedium wurde für Vorkulturen als 10-fach Lösung vorbereitet und dampfsterilisiert, wobei das Medium nach Zugabe aller Komponenten mit sterilem VE-Wasser aufgefüllt wurde. Für Kultivierungen im Reaktor wurde das Grundmedium direkt mit allem notwendigen VE-Wasser bereitet und dann im Reaktor sterilisiert. In jedem Fall wurde das Grundmedium vor dem Sterilisieren mit 10 M Kalilauge auf einen pH von 6,7 eingestellt.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung des Mineralmediums nach Riesenberg

Chemikalie	Summenformel	Endkonzentration, g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	13,3
Diammoniumhydrogenphosphat	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4
Zitronensäure	C ₆ H ₈ O ₇	1,7
Zusätze als sterile Stammlösung nach dem Autoklavieren zugegeben		
Magnesiumsulfat Heptahydrat (250 g L ⁻¹)	MgSO ₄ *7H ₂ O	1,2
Glucose (500 g L ⁻¹)	C ₆ H ₁₂ O ₆	variabel
Thiamin-HCl (1 M)	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS	0,38

Spurenelemente (als 50x Stammlösung verwenden)		
Kobalt(II)chlorid-Hexahydrat	CoCl ₂ 6 H ₂ O	0,0025
Mangan(II)chlorid-Tetrahydrat	MnCl ₂ 4 H ₂ O	0,015
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	CuCl ₂ 2 H ₂ O	0,0015
Borsäure	H ₃ BO ₃	0,003
Dinatriummolybdat-Dihydrat	Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0,0025
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	0,0084
Zinkacetat-Dihydrat	ZnC ₄ H ₆ O ₄ 2 H ₂ O	0,008
Eisen(III)citrat	FeC ₆ H ₅ O ₇	0,06

Für Agarplatten wurden 10 g Agar in etwa 431 mL VE-Wasser gelöst und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden 50 mL 10-fach Grundlösung in die noch heiße Agarlösung gegeben. Nach Abkühlen auf etwa 60°C erfolgte die Zugabe der Zusätze, so dass ein Gesamtvolumen von 500 mL erreicht wurde. Die Agarplatten wurden wie Agarplatten mit LB-Medium bereitet.

4.1.4 Zulaufmedium für die Hochzelldichtekultivierung

Das Zulaufmedium für das Zulaufverfahren wurde aus den Komponenten in Tabelle 4.4 hergestellt.

Tabelle 4.4: Zusammensetzung des Zulaufmediums für die Hochzelldichtekultivierung

Chemikalie	Summenformel	Endkonzentration, g L ⁻¹
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	750
Zusätze als sterile Stammlösung nach dem Autoklavieren zugegeben		
Magnesiumsulfat Heptahydrat (250 g L ⁻¹)	MgSO ₄ *7H ₂ O	20
Diammoniumsulfat (370 g L ⁻¹)	(NH ₄) ₂ SO ₄	18,5

Dafür wurden 200 mL VE-Wasser in einen 1 Liter Messkolben vorgelegt, anschließend wurden 825,7 g Glucose-Monohydrat eingewogen und für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Der resultierenden Lösung wurden die beiden Salze steril, als Stammlösungen, zugegeben und das Volumen mit sterilem VE-Wasser auf einen Liter angepasst.

4.2 Lösungen und Puffer

In der nachfolgenden Tabelle werden die verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt. Soweit nicht anders beschrieben wurden alle Lösungen in VE-Wasser angefertigt.

Tabelle 4.5: In dieser Arbeit eingesetzte wässrige Lösungen und Puffer.

Lösung / Puffer	Chemikalie	Konz. / Zugabe / Zielwert
Tris-EDTA (TE)-Puffer	Tris-Base	10 mM
	HCl	pH = 8,5
	EDTA	1 mM
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	NaCl	80 g L ⁻¹
	KCl	2 g L ⁻¹
	Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	0,1 M
	KH ₂ PO ₄	0,02 M
	NaOH	pH = 7,4
0,5-fach Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	10x TBE-Puffer	50 mL L ⁻¹
	MgCl ₂	5,5 mM
1-fach Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	10x TAE-Puffer	100 mL L ⁻¹
Lysepuffer	NaOH	8 g L ⁻¹
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 g L ⁻¹
Lysepuffer L1 (Pilotmaßstab)	NaOH	35,6 g L ⁻¹
Lysepuffer L2 (Pilotmaßstab)	SDS	44,45 g L ⁻¹
Neutralisationspuffer	Essigsäure	29,12 mL L ⁻¹
	Kaliumacetat	249,12 g L ⁻¹
	KOH / Essigsäure	pH = 5,5
Neutralisationspuffer (Pilotmaßstab)	Essigsäure	147 mL L ⁻¹
	Kaliumacetat	0,489 kg L ⁻¹
	HCl	pH = 6
Präzipitationslösung	NaCl	180 g L ⁻¹
	Polyethylenglycol (PEG) 8000	240 g L ⁻¹
10-fach DNazym-Reaktionspuffer	HEPES	0,1 M
	NaCl	1 M
	NaOH/HCl	pH = 7,0
Faltungspuffer	EDTA	1 mM
	Tris-Base	5 mM
	NaCl	5 mM
Kaliumhydroxidlösung	KOH	10 M
Kanamycinsulfatlösung	Kanamycinsulfat	50 g L ⁻¹

Lösung / Puffer	Chemikalie	Konz. / Zugabe / Zielwert
Carbenicillinlösung	Carbenicillin	50 g L ⁻¹
	Ethanol	50% (v/v)
Chloramphenicolösung	Chloramphenicol	30 g L ⁻¹
	Ethanol	100% (v/v)
Thiamin-HCL Lösung	Thiamin-HCL	1 M
Natronlauge	NaOH	10 M
Calciumchloridlösung	CaCl ₂	0,1 M

4.3 Mikroorganismen und Plasmide

4.3.1 *Escherichia coli* Stämme und M13-Varianten

In dieser Arbeit wurden für die Herstellung von ssDNA vor allem die *E. coli* Stämme JM109 und NEB-turbo genutzt. Diese beiden Stämme tragen das für die Infektion notwendige Fertilitätsplasmid (F-Plasmid). Durch das F-Plasmid wird die Bildung eines F-Pilus möglich, der beim horizontalen Gentransfer notwendig ist. Hierbei dienen F-Plasmid tragende Stämme als Spender (Berg *et al.*, 2018). Bei der Infektion durch M13 Bakteriophagen ist der F-Pilus notwendig, da die Phagen zunächst an diesen adsorbieren, bevor ein Kontakt zur Zelloberfläche hergestellt wird, woraufhin die ssDNA in die Zelle injiziert wird (Mai-Prochnow *et al.*, 2015). Bei beiden Stämmen handelt es sich um Klonierungsstämme, wobei JM109 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) besonders für die Arbeit mit M13-Phagen entwickelt wurde (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) und NEB-turbo (New England Biolabs, Ipswich, USA) besonders für schnelle Klonierungsarbeiten eingesetzt werden kann. Beide Stämme sind Endonuklease I defizient (*endA1*), was, um Veränderungen zu vermeiden, für das Arbeiten mit ssDNA wichtig ist. JM109 ist zudem defizient für eine Rekombinase (*recA1*), was zusätzlich zur Sequenzstabilität beiträgt.

Für spezielle Klonierungsarbeiten wurden darüber hinaus die *E. coli* Stämme XL1-blue MRF⁺ (Stratagene, San Diego, USA) und NEB-stable (New England Biolabs, Ipswich, USA) eingesetzt. Die Genotypen aller Stämme sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Tabelle 4.6: Verwendete *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp
JM109	<i>recA1 endA1 gyr96A thi-1 hsdR17 supE44 relA1 λ Δ(lac-proAB) (F' traD36 proAB lacI^qZ ΔM15)</i>
NEB-turbo	<i>F' proA+B+ lacI^q ΔlacZM15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10) Tet^R endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>
NEB-stable	<i>F' proA+B+ lacI^q Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (Tet^R) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>
XL1-blue MRF [']	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn5 (Kan^r)]</i>

Die Arbeitsstämme JM109 und NEB-turbo wurden auf Riesenberg-Agarplatten als Einzelkolonieausstrich angezogen, wobei das Minimalmedium nötig war, um einen Selektionsdruck für das F-Plasmid aufrechtzuerhalten. Da das F-Plasmid ein Gen aus der Prolinsynthese enthält, kann mit Minimalmedium hierauf selektiert werden, während in Komplexmedium die Gefahr besteht, dass das F-Plasmid verloren geht. Von den Agarplatten wurden Flüssigkulturen (Schüttelkolben) in Riesenbergmedium angelegt (37°C, 250 rpm), die bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6-0,8 in einem Verhältnis von 4:1 mit 60% (w/v) Glycerin (Endkonzentration 15%) gemischt wurden. Die fertige Lösung wurde in 1mL Reaktionsgefäße aliquotiert und anschließend bei -80°C eingefroren und gelagert.

In dieser Arbeit wurden zwei Varianten des M13 Phagen als Ausgangsmaterial genutzt, um daraus Helferplasmide zu konstruieren. Bei den eingesetzten Phagen handelt es sich um Spezialvarianten aus dem Labor von Joachim Messing. Einerseits M13mp18 (New England Biolabs, Ipswich, USA) (Norlander *et al.*, 1983) der bereits in früheren Arbeiten in verschiedenen Varianten eingesetzt wurde, um sein Genom als Gerüststrang für DNA-Origami herzustellen. Außerdem um M13KO7 (New England Biolabs, Ipswich, USA) (Vieira & Messing, 1987), einen Helferphagen der entwickelt wurde um bevorzugt Phagemid DNA herstellen zu können.

Zusätzlich wurde der Bakteriophage M13mp18 mit einer Expressionskassette für das rot fluoreszierende Protein (RFP) als Reporter-Phage eingesetzt. Dieser Phage wurde selbst kloniert, wobei RFP in die *multiple cloning site* eingebaut wurde.

4.3.2 Helferplasmide und Phagemide

In dieser Arbeit fanden eine Vielzahl verschiedener Helferplasmide (engl.: *phage free helper plasmid*, kurz: pfhp) Einsatz. Diese wurden zunächst *in silico* designt und anschließend

physisch assembliert. In Tabelle 4.7 sind alle im Rahmen dieses Forschungsvorhabens entwickelten Helferplasmide mit ihren wichtigsten Eigenschaften aufgeführt. Dabei wird der Urheber der Helferplasmide angegeben, sofern sie nicht im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden.

Tabelle 4.7: Auflistung aller in dem gesamten Forschungsvorhaben entwickelten Helferplasmide

Fort- laufende Nummer	Rückgrat	Replikations- ursprung	Selektions- marker	Ursprung des Phagen- genoms	Besonderheit	Urheber
1	pSB4K5	psc101	Kan	M13mp18	Gen 3 deletiert.	Florian Praetorius (FP)
2	pSB4K5	psc101	Kan	M13mp18	Gen 3 teilweise deletiert.	FP
3	pSB4K5	psc101	Kan	M13mp18	Gen 3 teilweise deletiert.	FP
4	pSB4K5	psc101	Kan	M13mp18	Vollständig.	FP
5	pSB1K3	pMB1	Kan	M13mp18	Gen 3 teilweise deletiert.	FP
6	pSB1K3	pMB1	Kan	M13mp18	Gen 3 teilweise deletiert.	FP
7	pSB1K3	pMB1	Kan	M13mp18	Vollständig.	FP
8	pSB1K3	pMB1	Kan	M13mp18	Vollständig.	FP
9	pSB1A3	pMB1	Amp	M13mp18	Vollständig.	FP
10	pSB4A5	psc101	Amp	M13mp18	Gen 2 bis 5 induzierbar.	FP
11	pColA	colA	Kan	M13mp18	Gen 2 bis 5 induzierbar.	FP
12	pColA	colA	Kan	M13mp18	Gen 2 bis 5 induzierbar und zusätzlicher Terminator vor Gen 2.	FP
13	pColA	colA	Kan	M13mp18	Genom Gen für Gen sortiert.	
14	pColA	colA	Kan	M13KO7	Genom Gen für Gen sortiert.	Nie erfolgreich gebaut.
15	pColA	colA	Kan	M13mp18	Wie 13 und 2 Lac- Operatoren an jedem Promotor.	
16	pColA	colA	Kan	M13KO7	Wie 14 und 2 Lac- Operatoren an jedem Promotor.	
17	pSB4K5	psc101	Kan	M13KO7	Vollständig.	Benjamin Kick

Fort- laufende Nummer	Rückgrat	Replikations- ursprung	Selektions- marker	Ursprung des Phagen- genoms	Besonderheit	Urheber
18	pSB4K5	psc101	Kan	M13KO7	Kombination aus 17 und den Genen 2, 10 und 5 aus 16.	
19	pSB4K5	psc101	Kan	M13KO7	Kombination aus 17 und den Genen 7, 9, 8, 3, 6 aus 16.	
20	pSB4K5	psc101	Kan	M13KO7	Kombination aus 17 und den Genen 1, 11 und 4 aus 16.	
21	pSB4K5	psc101	Kan	M13KO7	Induzierbares Gen 3 und zusätzlicher Terminator vor Gen 3.	
22	pSB4K5	psc101	Kan	M13KO7	Gen 3 deletiert.	
23	M13KO7	p15A	Kan	M13KO7	Genaue Sequenz von M13KO7 nur der F1-ori wurde deletiert und mit dem Doppelterminator BBa_B0015 ersetzt.	
24	M13KO7	p15A	Kan	M13KO7	Wie 23 nur Gen 3 Kodierende Sequenz wurde deletiert.	
24.2	M13KO7	p15A	Kan	M13KO7	Wie 24 nur eine homologe Sequenz, die auch auf dem Phagemid vorhanden ist wurde deletiert.	
24.3	M13KO7	p15A	Kan	M13KO7	Wie 24 nur ein Teil der homologen Sequenz wurde deletiert.	
25	M13KO7	p15A	Kan	M13KO7	Wie 23 nur alle Promotoren wurden durch den Lac-Promotor ersetzt.	Nie gebaut.
26	M13KO7	p15A	Kan	M13KO7	Wie 24 lediglich wurde Gen 3 erneut insertiert als Expressionskassette mit Lac-Promotor.	

Fort- laufende Nummer	Rückgrat	Replikations- ursprung	Selektions- marker	Ursprung des Phagen- genoms	Besonderheit	Urheber
27	M13KO7	p15A	Kan	M13KO7	Wie 24, Gen 3 wurde erneut insertiert als Expressions-kassette mit dem Lambda-Schalter als Promotor.	
27.2	M13KO7	p15A	Kan	M13KO7	Wie 27 Homologie wie in 24.2 entfernt.	
27.3	M13KO7	p15A	Kan	M13KO7	Wie 27, 5'UTR des Gen 3 hinter dem Lambda- Schalter wurde für stärkere Expression optimiert.	
28	M13KO7/pColA	colA	Kan	M13KO7	Wie 24, p15A ori durch colA ori von 12 ersetzt	
29	M13KO7/pColA	colA	Kan	M13KO7	Wie 28, vor Gen 2 wurde ein starker Promotor und eine Kodon-optimierte Sequenz von Gen 6 eingesetzt.	
30	M13KO7	p15A	Kan	M13KO7	Wie 24, vor Gen 2 wurde ein starker Promotor und eine Kodon-optimierte Sequenz von Gen 6 eingesetzt.	
31	M13KO7	p15A	Kan	M13KO7	Wie 27, vor Gen 2 wurde ein starker Promotor und eine Kodon-optimierte Sequenz von Gen 6 eingesetzt.	

Grundsätzlich leiten sich die Helferplasmide aus der Publikation von Chasteen *et al.* (2006) ab. Dabei wurden die Helferplasmide dieser und vorangegangener Arbeiten allerdings komplett neu designt und assembliert. Hierbei ist wichtig, dass alle Sequenzen, die später auf dem Phagemid vorhanden sein sollen, vollständig entfernt werden. Mögliche Sequenzhomologien zwischen Helferplasmid und Phagemid führen durch die hohe Zahl an Nachkommen der Phagemidpartikel sehr häufig zu unerwünschter Rekombination.

Ein Helferplasmid sollte zwei Eigenschaften erfüllen: (I) Es benötigt einen Plasmid-Replikationsursprung, welcher kompatibel mit dem des Phagemids ist. Da der M13 Phage, pro infizierter Zelle, etwa 40 Exemplare seiner DNA in der replikativen Form vorliegen hat (Pratt & Erdahl, 1968), sollte auch die Kopienzahl des Plasmids ähnlich sein. (II) Ein Selektionsmarker sollte so gewählt sein, dass das Plasmid gut kloniert und sicher in der Zelllinie aufrechterhalten werden kann. Auch hier ist es wichtig, einen zum Phagemid orthogonalen Marker einzusetzen.

Das Phagemid ist wie der Name sagt ein Hybrid aus Phage und Plasmid (zur klaren Unterscheidung zwischen Helferplasmid und Phagemid: engl.: *chimeric plasmid*, kurz: cp). Es ergänzt das Helferplasmid, so dass eine Zelle, die sowohl das eine, als auch das andere enthält neue Partikel produziert.

Das Phagemid benötigt, genau wie das Helferplasmid, einen Replikationsursprung und einen Selektionsmarker. Hierfür gelten die gleichen Bedingungen wie für das Helferplasmid. Zusätzlich wird auf dem Phagemid der Replikationsursprung des M13 Phagen sowie das Verpackungssignal benötigt.

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 4.8 Aufgelisteten Phagemide genutzt. Dabei wurden alle Phagemide entweder am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik oder am Institut für Biomolekulare Nanotechnologie entworfen und assembliert.

Tabelle 4.8: In dieser Arbeit eingesetzte Phagemide

Benennung in dieser Arbeit	Name	Länge (bp)	Replikations- ursprung	Selektions- marker	Absorptions- koeffizient (mM ⁻¹ mm ⁻¹)	Eigenschaften
cp1S	CS3S	4536	pMB1	Carbenicillin	43306700	Teil der De Bruijn Sequenz 8ter Ordnung.
cp1M	CS3M	6048	pMB1	Carbenicillin	57733400	Teil der De Bruijn Sequenz 8ter Ordnung.
cp1L	CS3L	7560	pMB1	Carbenicillin	46128400	Teil der De Bruijn Sequenz 8ter Ordnung.
cp2	CS3CM	7495	pMB1	Chloramphenicol	71573400	CS3L, Resistenz ausgetauscht
cp3	48HT_v2	9059	pMB1	Carbenicillin	86976600	Origami 48 Helix- Tube.

Benennung in dieser Arbeit	Name	Länge (bp)	Replikations- ursprung	Selektions- marker	Absorptions- koeffizient (mM ⁻¹ mm ⁻¹)	Eigenschaften
cp4(G3)	CS3CMG3	7560	pMB1	Chloramphenicol	72148900	CS3CM. Teil der De Bruijn Seq entfernt und G3 Expressionskassette eingefügt.
cp5(G3)	CSF1	4348	pMB1	Chloramphenicol	46128400	F1 ori in De Bruijn 5ter Ordnung eingebettet, G3 Expressionskassette.
cp6(G3)	CSMB	3253	pMB1	Chloramphenicol	31094800	Minimalrückgrate eines Phagemids mit Expressionskassette für Gen 3
cp7(G3)	CSMB48HT	9054	pMB1	Chloramphenicol	86880000	Origami 48 Helix- Tube.
cp8(G3)	CSMB- 2xSAM	5399	pMB1	Chloramphenicol	51716500	2 mal 1033b Scaffold als Insert.
cp9(CRO)	CSF1cro	3802	pMB1	Chloramphenicol	36385500	CSF1, G3 entfernt und durch CRO ersetzt.

4.4 Molekularbiologische Arbeiten

4.4.1 Design von Plasmiden

Für alle Molekularbiologischen Arbeiten wurden die jeweiligen Gene, Expressionskassetten und Plasmide zunächst *in silico* unter Verwendung der Software Geneious (Geneious 7.1, Biomatters Ltd, Auckland, Neuseeland) designt. *Primer* wurden entweder automatisch mit der Software, oder händisch nach den üblichen Kriterien erstellt. In letzterem Fall wurden die *Primer* mit Hilfe der NuPack Toolbox auf Sekundärstrukturen untersucht (Zadeh *et al.*, 2011).

4.4.2 Amplifikation und Reinigung

DNA-Fragmente wurden zur Vorbereitung für anschließende Assemblierungsmethoden mit Hilfe von Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Dazu wurden die entsprechenden Anlagerungstemperaturen der *Primer* mit dem *NEB TM calculator* berechnet (tmcalculator.neb.com, New England Biolabs, Ipswich MA, USA) und die entsprechenden

Elongationszeiten, in Abhängigkeit der Länge des Fragments, passend zu der jeweiligen Polymerase berechnet. Alle Polymerasen wurden bei NEB (New England Biolabs, Ipswich MA, USA) erworben. Die PCR wurde in einem *Cycler* der Firma SensoQuest (SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Die Amplifikate wurden anschließend entweder direkt, oder mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt. Zur direkten Reinigung wurde das PCR-Reinigungs-Kit (FastGene Gel/PCR Extraction Kit) der Firma Nippon Genetics (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland) genutzt. Für die Reinigung der Amplifikate aus einer Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 4.9.6) wurde das Gelextraktions-Kit (Monarch DNA Gel Extraction Kit) der Firma NEB (New England Biolabs, Ipswich MA, USA) verwendet.

4.4.3 Assemblieren von Plasmiden

Die Assemblierung verschiedener Fragmente zu neuen Plasmiden wurde mittels zwei unterschiedlicher Verfahren durchgeführt. Eingesetzt wurde die Assemblierung nach Gibson *et al.* (2009) oder die sogenannte *Golden-Gate-Assemblierung* (Engler *et al.*, 2008).

Die isothermale Assemblierung nach Gibson wurde mit Hilfe des Enzym-Mix (NEBuilder HiFi Assembly Master Mix) der Firma NEB (New England Biolabs, Ipswich MA, USA) durchgeführt. Sie wurde dann eingesetzt, wenn nicht modular gearbeitet werden sollte und gleichzeitig keine Ligations-Überreste in der Sequenz zu erkennen sein sollten. Als Protokoll wurde die Folgende Zusammensetzung gewählt:

Tabelle 4.9: Zusammensetzung einer isothermalen Assemblierung nach Gibson.

Bestandteil	<i>Insert</i> << Rückgrat	<i>Insert</i> <= Rückgrat
Rückgrat	100ng	100ng
<i>Insert</i> (1-3)	5-fach molarer Überschuss zum Rückgrat	2-fach molarer Überschuss zum Rückgrat
Nuklease freies Wasser	Auf 5 μ L	Auf 5 μ L
NEBuilder	5 μ L	5 μ L
Gesamtvolumen	10 μ L	10 μ L

Die Reaktion wurde zur Assemblierung für mindestens 60 min, jedoch maximal 4 Stunden bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze entweder im Kühlschrank gelagert oder direkt weiterverwendet.

Die *Golden-Gate-Assemblierung* wurde mit Hilfe der T4 DNA Ligase und dem Restriktionsenzym Esp3I durchgeführt. Alle Enzyme und Puffer wurden von NEB (New England Biolabs, Ipswich MA, USA) gekauft und grundsätzlich nach deren Protokoll für die *Golden-Gate-Assemblierung* benutzt. Diese Methode wurde ausschließlich für modulare

Plasmide genutzt, bei denen Rückgrate und *Inserts* in verschiedenen Kombinationen variiert werden sollten.

4.4.4 Transformation von *E. coli* mit Plasmiden

E. coli wurde nach dem folgenden Protokoll chemisch kompetent gemacht:

Die Zellen wurden in dem jeweils passenden Medium (JM109, NEB-turbo: Riesenberg-Medium; XL1Blue MRF', NEB-stable: LB-Medium) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,6 angezüchtet (50 mL Medium in 500 mL Schüttelkolben ohne Schikanen, 37°C, 250 upm). Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis gekühlt und dann abzentrifugiert (5 min, 3260 rzb). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 10 mL eisgekühlter Calciumchloridlösung (0,1M CaCl₂) resuspendiert. Nach weiteren 30 min auf Eis wurde erneut wie oben zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde in 5 mL Kryolösung (0,1M CaCl₂ 20% Glycerin) resuspendiert und anschließend in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu je 90 µL aliquotiert. Die Aliquote wurden dann bei -80°C im Gefrierschrank eingefroren.

Für die Transformation werden die kompetenten Zellen 5 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden mindesten 1 µL jedoch maximal 2 µL der Plasmid-DNA-Lösung zugegeben. Daraufhin wurden die Zellen weitere 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 45 Sekunden in einem 42°C warmen Wasserbad hitzegeschockt und gleich wieder auf Eis gestellt. Nach höchstens 3 min wurden 500 µL LB-Medium zugegeben und die Zellen für 45-60 min bei 37°C, 250 upm inkubiert. Abschließend wurden die Zellen auf dem passenden Agarnährmedium (mit dem jeweiligen Antibiotikum) ausgestrichen und mindestens über Nacht bei 37°C inkubiert, bis Kolonien eindeutig sichtbar waren.

4.4.5 Evaluation von Plasmiden

Um initial den korrekten Einbau von *Inserts* in Plasmide zu überprüfen wurde die Kolonie-PCR genutzt. Dafür wurden Kolonien von den Agarplatten gepickt und in 10 µL entionisiertem Wasser resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurden diese für 15 min bei 98°C inkubiert. Anschließend wurde eine Standard PCR durchgeführt, der 1 µL des Zellysats als DNA-template zugegeben wurde. Die PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und wenn die Größe des PCR Fragments der Zielgröße entsprach, wurde mit dieser Kolonie weitergearbeitet.

Zur Präparation von Plasmiden wurde die Kolonie von Interesse mit einer Sterilen Pipettenspitze von der jeweiligen Agarplatte gepickt und in 5 mL LB-Medium (inklusive entsprechender Antibiotika) in einem Vorkulturröhrchen für mindestens 8 Stunden bei 37°C (250 upm) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 3260 rzb abzentrifugiert und die Plasmid DNA mit Hilfe des Fast Gene Plasmid Mini Kits (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland) nach dem vorgegebenen Protokoll extrahiert.

Zur weiteren Validierung der Plasmide erfolgte zunächst ein Verdau *in silico*. Dazu wurde die Software Geneious (Geneious 7.1, Biomatters Ltd, Auckland, Neuseeland) verwendet und nach einzelnen Restriktionsenzymen gesucht, die die Sequenz zwischen 2- und 4-mal schneiden. Der tatsächliche Verdau wurde anschließend mit dem passenden Enzym durchgeführt. Die Enzyme und Puffer hierfür wurden von NEB (New England Biolabs, Ipswich MA, USA) gekauft. Aufgrund teilweise geringer Konzentrationen der Plasmide wurde das übliche Protokoll des Restriktionsverdaus folgendermaßen abgewandelt:

Bestandteil	Menge, μL
Plasmid	8,8
CutSmart	1
Restriktionsenzym	0,2
Gesamtvolumen	10 μL

Der Ansatz wurde jeweils 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend 2 μL Auftragspuffer (*Purple Dye*, no-SDS, NEB) zugegeben. Die so vorbereiteten Proben wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und das resultierende Bandenmuster mit dem *in silico* erzeugten verglichen. Wenn das Bandenmuster übereinstimmte, wurden die Plasmide als korrekt assembliert angenommen.

Um auch kleinere Mutationen auszuschließen, wurden die als korrekt assembliert erkannten Plasmide Sequenziert. Dies wurde als Service, entweder durch die Firma Eurofins (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland) oder die Firma Genewiz (GENEWIZ Germany GmbH, Leipzig, Deutschland) durchgeführt.

4.4.6 Herstellung von Kryokulturen

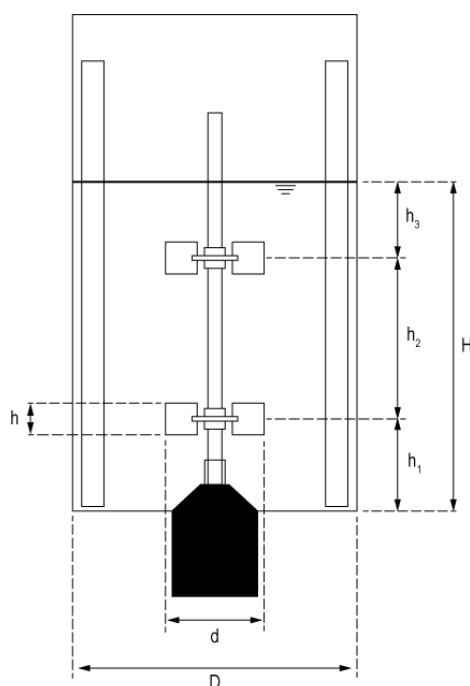
Zur Herstellung von Kryokulturen wurden zunächst Stämme mit dem entsprechenden Plasmid transformiert (Kapitel 4.4.4). Von der so erstellten Agarplatte wurden 1-6 Kolonien gepickt und in Vorkulturröhrchen mit 5 mL des entsprechenden Mediums (Mineralmedium bei Helferplasmiden, 2xYT Medium in allen anderen Fällen, jeweils mit dem entsprechenden Antibiotikum) überführt. Anschließend wurden die Röhrchen über Nacht bei 37°C und 250 upm in einem Schüttelinkubator (Wisecube) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden Schüttelkolben mit einem Nennvolumen von 500 mL mit 50 mL des gleichen Mediums wie zuvor vorbereitet. Diese wurden mit einem Milliliter der Vorkulturröhrchen inokuliert und bei 37°C und 200 upm (Wisecube) inkubiert. Sobald die Kulturen eine optische Dichte zwischen 0,6 und 1 aufwiesen wurde die Kultur mit steriler 60% Glycerin Lösung vermischt. Dabei wurde auf drei Teile Kultur ein Teil Glycerin Lösung gegeben. In diesem Zustand wurde die Kultur in 1 mL Aliquots aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

4.5 Verwendete Reaktorsysteme

Zum allgemeinen Energieeintrag und damit in erster Linie zur ausreichenden Durchmischung des Reaktionsmediums, wurden in dieser Arbeit für die Hochzelldichtekultivierung ausschließlich Rührkesselreaktoren eingesetzt. In allen eingesetzten Rührkesselreaktoren konnten pH, Temperatur und Sauerstoffsättigung geregelt werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Systeme vom Liter- bis zum Pilotmaßstab eingesetzt. Details zu den Einzelnen Systemen sind im Folgenden beschrieben.

4.5.1 Rührkesselreaktor im Litermaßstab

Für Kultivierungen im Litermaßstab wurde der Kleinlaborfermenter (KLF 2000 3.7L, W30522, 2013) der Firma Bioengineering AG (Wald, Schweiz) eingesetzt. Dieser *in situ* sterilisierbare Rührkesselreaktor kann bei einem maximalen Arbeitsvolumen von 2,5 Litern und einem Systemüberdruck von 1,5 bar betrieben werden. Die Reaktionskammer besteht aus einem zylindrischen Glaskörper, der mit einer planen Boden- bzw. Kopfplatte aus Edelstahl abgeschlossen wird. Die Rührwelle, der Heiz- (800 W) und Kühlstab sowie der Temperaturfühler (pt100) werden über die Bodenplatte eingeführt. Ebenso ist ein federgelagerter Bodenablass vorgesehen. Die Rührwelle ist über eine Gleitringdichtung steril gedichtet, an ihr wurden zwei 6-Blatt-Scheibenrührer angebracht. Die Welle wird von einem stufenlos regelbaren Elektromotor (250 W) angetrieben. Die Rührer waren wie in Abbildung 4.1 gezeigt angeordnet, um optimale Durchmischung zu gewährleisten.



Komponente	Abmessung, mm
D	125
d	48
H	131
h	12
h ₁	50
h ₂	66
h ₃	15

Abbildung 4.1: Schematische Abbildung des KLF Rührkesselreaktors mit seinen charakteristischen Abmessungen.

In die Reaktionskammer des Reaktors wurden vier senkrecht angeordnete Strömungsbrecher eingebaut, um turbulente Strömung zu gewährleisten. An die Strömungsbrecher wurde ein Begasungsrohr befestigt, welches über einen Begasungsring unterhalb der Rührer die Gasphase in die Flüssigkeit einleitete. Prozessluft wurde zur Begasung mit einem Überdruck von 1,5 bar bereitgestellt und konnte in Bodennähe in die Flüssigphase dispergiert werden. Weitere Einbauten (pH- / pO₂-Sonde, Manometer, Probenahmerohr, Sicherheitsventil, Abluftkühler, Antischaumsonde) und alle Zuströme wurden bei dem Reaktor über den Deckel eingeführt. Dazu sind dort entsprechende Bohrungen mit Innengewinde vorgesehen.

Der Zuluftvolumenstrom wurde mittels Schwebekörper-Durchflussmesser manuell eingestellt. Die in der Abluft enthaltene Feuchtigkeit wurde durch den Abluftkühler kondensiert und rückgeführt, die trockene Abluft wurde zur Desinfektion durch eine Waschflasche mit 0,02 % (v/v) Formaldehyd (enthalten in Pursept FD) geleitet und abschließend von der Sonderabluft abgezogen. Der Betriebsüberdruck im Reaktor wurde dabei manuell durch partielles Verschließen des Abluftventils eingestellt und konnte am Manometer abgelesen werden. Mit Hilfe der pH- und der amperometrischen pO₂-Sonde konnten pH und Gelöstsauerstoffkonzentration *online* gemessen werden. Mittels Antischaumsonde konnte bei übermäßiger Schaumbildung Antischaumagens zu dosiert werden. Hierzu misst die Sonde einen Strom, der bei Berühren von Schaum oder der Flüssigkeit fließt. So kann die Antischaumsonde allerdings nicht zwischen Schaum und dem aktuellen Füllstand unterscheiden. Sie musste manuell so eingestellt, bzw. im Prozess umgestellt werden, dass sie sich stets über dem Flüssigkeitslevel befand.

Über ein Tauchrohr im Deckel des Reaktors, welches während der Sterilisierphase durch ein Septum verschlossen blieb, konnte Probe aus dem Reaktor entnommen werden. Mit einer Anstechgarnitur konnte ein Probenahmeventil angeschlossen werden. Dies bestand aus einem kurzen Silikonschlauch, an dessen Ende ein y-Stück montiert war. Dieses hat an einem Ende einen selbstverschließenden Luer-Adapter und am anderen Ende ein Rückschlagventil mit Steril-Spritzenvorsatzfilter getragen. Über die Apparatur konnte mit einer Spritze sterile Luft in das Tauchrohr geblasen werden, um den Totraum zu spülen. Anschließend konnte über den selbstverschließenden Port mit einer Spritze Probe aus dem Reaktor entnommen werden. Im Überdruckbetrieb wurde der Silikonschlauch zusätzlich mit einer Schlauchklemme verschlossen, solange nicht am Probenahmesystem gearbeitet wurde.

Mit Hilfe von Peristaltikpumpen, die an der Steuereinheit des Reaktors angebracht sind, konnten Stellmittel und Zulaufmedium gefördert werden. Diese wurden über den Deckel in den Reaktor gefördert. Die Deckeldurchführungen waren auch hier mit Septen verschlossen und die Förderschläuche konnten mit Anstechgarnituren angeschlossen werden. So wurde auch Antischaummittel oder Phagensuspension in den Reaktor dosiert.

Mit Hilfe der Software BioScada lassen sich Steuereinheit und Reaktor bedienen. In der Software wird quasi ein RI-Fließbild des Reaktors abgebildet, in dem die Möglichkeit besteht alle Steuergrößen einzustellen und alle Messwerte auszulesen. Darüber hinaus können Profile für die Zulaufpumpe erstellt werden und Abläufe über Schrittketten programmiert werden. Für die Regelung einzelner Werte mit Hilfe von PID-Reglern, können Regel Kaskaden erstellt werden, mittels derer die PID-Ausgabewerte in Regelwerte übersetzt werden. Die Software ermöglicht die Aufzeichnung aller erfassten Prozessparameter im .csv Format.

Der Reaktor ist *in situ* sterilisierbar und gewährleistet so hohe Sicherheit im Umgang mit selbstreplizierenden Phagen. Für die Sterilisierung wurde in der Software BioScada die entsprechende Schrittkette gestartet, wodurch das Medium mit Hilfe des 800 W Heizstabs zunächst auf 99°C erhitzt wurde. Anschließend musste das Abluftventil geschlossen werden, um einen Überdruck im Reaktor zu ermöglichen. Im nächsten Schritt wurde der Reaktor weiter auf 121°C erhitzt. Nach Erreichen von mindestens 117°C wurde manuell ein Schleichdampf durch die Abluftstrecke eingestellt. Anschließend wurde der Reaktor für mindestens 20 Minuten autoklaviert. Während des Abkühlens musste abschließend sichergestellt werden, dass kein Unterdruck im Reaktor entsteht, da dieser hierfür nicht ausgelegt ist.

4.5.2 Rührkesselreaktor im Pilotmaßstab

Um Bioprozesse vom Labor bis in die Produktion weiter zu entwickeln, muss der Maßstab übertragen werden. Dazu werden die Prozesse häufig zunächst in den sogenannten Pilotmaßstab übertragen. Hier wird eine Anlage genutzt, deren Maßstab nah genug an einem Produktionsmaßstab ist, um von Vergleichbarkeit zu sprechen und gleichzeitig kostenoptimiert zu arbeiten.

Hierfür wurde in dieser Arbeit die Pilotanlage am Forschungszentrum für Weiße Biotechnologie genutzt. Diese Anlage bietet alle Möglichkeiten, die auch in einer modernen Produktionsanlage zur Verfügung stehen, bei einem Fermentationsvolumen von maximal 1000 Litern. Entsprechend sind auch die Möglichkeiten für Vorkultur und Produktreinigung gegeben.

Das Technikum besitzt zwei Rührkesselbioreaktoren der Firma Bioengineering, wobei ein 50 Liter Reaktor zur Erstellung der Vorkultur bereitsteht und ein 1000 Liter Reaktor für die Hauptkultur. Bei beiden Reaktoren wird der Energieeintrag mit drei Sechsblasscheibenrührern sichergestellt. Mit Hilfe von Strömungsbrechern wird ein axiales Mischungsverhalten erzielt.

Beide Reaktoren werden wie im Labormaßstab über die Software BioScada gesteuert. Es können auch alle Sollwerte und Regelparameter eingestellt werden, sowie alle Messwerte gezeigt und dokumentiert werden.

Die Reaktoren werden über einen Doppelmantel sowohl geheizt als auch gekühlt. Dabei erfolgt die Energiezufuhr sowie -abfuhr über externe Plattenwärmetauscher. Als Prozessmedien

werden Prozesskühlwasser sowie Reinstdampf eingesetzt. Diese werden über zusätzliche Anlagen zur Verfügung gestellt. Die Temperatur im Reaktormedium wird über einen Thermosensor gemessen und an die Steuersoftware weitergegeben. So können beide Reaktoren unabhängig *in situ* sterilisiert werden. Dabei werden bestimmte Toträume wie die Probenahme, Abluftfilter und Gleitringdichtung zusätzlich mit Heißdampf überlagert um eine vollständige Sterilisation sicherzustellen.

Die Zugabe aller Stellmittel erfolgte während des Prozesses über externe Peristaltikpumpen. Auch diese wurden von der Systemsoftware gesteuert. Der pH wurde online mit einer pH-Sonde bestimmt und konnte so über die Software durch Titration mit Ammoniak oder Phosphorsäure geregelt werden. Über eine Leitfähigkeitsmessung im Kopfraum des Reaktors wurde Schaumbildung detektiert und bei Bedarf Antischaummittel zu gepumpt. Für alle Prozesse wurde hier Antifoam 204 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt.

In beiden Reaktoren lässt sich die Begasungsrate sowie der Systemdruck zentral über die Software steuern. Hier können sowohl höhere Überdrücke als auch höhere volumetrische Begasungsraten als im Labormaßstab eingestellt werden, wodurch eine Maßstabsübertragung in Hinblick darauf möglich ist. Mit Hilfe der amperometrischen Gelöstsauerstoffsonde kann auch hier der relative Sauerstoffgehalt des Mediums gemessen werden. Da die Software sowohl Rührer als auch Druck und Begasung steuern kann, wurde hier der Gelöstsauerstoff über alle drei Stellgrößen geregelt. Dabei wurde darauf geachtet, dass nie mehr als eine Stellgröße gleichzeitig verändert wurde, da sonst ein überschwingen der Regelung wahrscheinlich ist.

Bei beiden Reaktoren können Sauerstoff und CO₂ im Abgas gemessen werden. Die Abgasanalytik erfolgt mit Hilfe einer Messanlage der Firma BlueSens (BlueSens gas sensor GmbH, Herten, Deutschland), wobei die Daten an die Steuersoftware weitergegeben werden. Die Abgasanalytik wurde allerdings in dieser Arbeit nicht eingesetzt, da im Labormaßstab keine Abgasanalytik vorhanden war.

Die Probenahme erfolgte über ein Ventilsystem am unteren Ende der Reaktoren. Hier wurde durch ein selbstschließendes Rohrsystem Probe fast Totraumfrei aus dem Reaktor entnommen. Vor und nach der Probenahme konnte das System mit Heißdampf sterilisiert werden, um Verfälschungen der Probe zu vermeiden.

4.6 Kultivierung von *Escherichia coli* zur Herstellung von ssDNA

In dieser Arbeit wurden verschiedene Kultivierungsstrategien zur Herstellung von ssDNA eingesetzt. Diese reichten von Schüttelkolben bis hin zum Pilotmaßstab in 1000 Litern.

4.6.1 Kultivierung nach Doppeltransformation im Schüttelkolben

Chemisch kompetente *E. coli* wurden wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben transformiert. Dabei wurde zur Transformation sowohl 1 μL Helferplasmid als auch 1 μL Phagemid zugegeben. Die so erzeugten Kolonien wurden einzeln in Vorkulturröhrchen mit 5 mL 2xYT Medium überführt. Das Medium enthielt Antibiotika spezifisch für beide Plasmide. Die Röhrchen wurden für mindestens 6 und maximal 10 Stunden bei 37°C und 250 upm in einem Schüttelinkubator (Wisecube) inkubiert.

Schüttelkolben mit einem Nennvolumen von 500 mL wurden mit 50 mL 2xYT Medium (mit beiden Antibiotika) vorbereitet. Zu dem Medium wurde je ein tropfen Antischaum zugegeben. Nach Inkubation der Vorkulturröhrchen wurde jeweils einer der vorbereiteten Schüttelkolben mit dem Inhalt eines ganzen Vorkulturröhrchens inokuliert. Die Schüttelkolben wurden bei 37°C und 200 upm in einem Schüttelinkubator (Wisecube) über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen erfolgte die Isolation der ssDNA (wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben) aus entweder dem gesamten Volumen oder aus 10 mL je nachdem ob die erzeugten Phagemid-Partikel noch für weitere Experimente benötigt wurden. Dabei wurde die entsprechende Menge Fällungsmittel zu dem jeweiligen Volumen zugegeben und nach Inkubation die Phagemidpartikel abzentrifugiert. Die Phagemidpartikel wurden anschließend in 200 μL TE-Puffer resuspendiert und mit dem üblichen Protokoll fortgefahren.

4.6.2 Kultivierung nach Doppeltransformation im Rührkesselreaktor

Satzkultivierung in Komplexmedium

Bei der Kultivierung in Komplexmedium im Rührkesselreaktor wurde ähnlich vorgegangen wie bei der Kultivierung im Schüttelkolben. Für die Vorkulturröhrchen wurde genau wie in Kapitel 4.6.1 vorgegangen. Der Rührkesselreaktor wurde mit 2xYT Medium vorbereitet, wobei dem Medium beide Antibiotika und 5 g L⁻¹ Glukose zugegeben wurden. Für die pH-Reglung wurden die Stellmittel Ammoniak (25%) und Phosphorsäure (26%) eingesetzt. Die Schaumbildung wurde im Prozess mit der Antischaumsonde gemessen und mit einer 10% Antischaumlösung reduziert.

Zur Inokulation wurde je ein Vorkulturröhrchen pro 0,5 L Reaktionsvolumen zugegeben. Anschließend wurde bei 37°C und einem pH von 7,0 inkubiert. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde mit Hilfe des Rührers (500-1500 upm) auf über 30% geregelt, wobei ein Überdruck von 0,5 bar herrschte und mit 200 NL/h Luft begast wurde. Nach etwa 16 Stunden, wenn der Gelöstsauerstoffgehalt wieder stark angestiegen war und konstant über 80% lag, wurde die Kultur geerntet.

Zur Isolierung der ssDNA wurde wie in Kapitel 4.7.2 vorgegangen. Sollten die Phagemidpartikel weiter genutzt werden, wurde die ssDNA Qualität lediglich aus 2 mL Reaktorvolumen bestimmt. Zur Verwendung der Phagemidpartikel wurden die Zellen mittels Zentrifugation (min. 1h, min. 3260rcf) abgetrennt.

Hochzelldichte-Zulaufkultivierung in Mineralmedium

Für die Hochzelldichtekultivierung in Mineralmedium wurden ebenfalls zunächst Vorkulturröhrchen wie in Kapitel 4.6.1 angefertigt. Diese wurden über Nacht inkubiert.

Im Anschluss wurden zwei Schüttelkolben mit einem Nennvolumen von 1000 mL mit je 100 mL Mineralmedium nach Riesenberg mit einer Satzglukose von 5 g L⁻¹ vorbereitet. Dem Medium wurden die entsprechenden Antibiotika zur Selektion beider Plasmide zugegeben sowie ein Tropfen Antischaum. Zur Inokulation wurde je 1 mL Röhrchen Vorkultur zugegeben. Anschließend wurden die Kolben bei 37°C und 200 upm im Schüttelinkubator (Wisecube) für etwa 8 h inkubiert. Durch den Medienwechsel kann es zu einer verlängerten lag-Phase kommen.

Der Reaktor (KLF 2000) wurde mit einem Startvolumen von 1,6 Litern Mineralmedium nach Riesenberg befüllt. Dabei wird hier zunächst nur eine Salzlösung in den Reaktor gegeben und autoklaviert und die restlichen Komponenten nach dem Autoklavieren steril über ein Silikonseptum zugegeben, wobei dem Medium auch wiederum beide Antibiotika sowie 25 g L⁻¹ Satzglukose zugegeben wurden. Für die Inokulation wurde die Vorkultur bei 12000 rcf für 5 Minuten in 50 mL Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Anschließend wurde das gesamte Zellpellet in etwa 15 mL Überstand resuspendiert. Die optische Dichte der entstandenen Lösung wurde gemessen und die Dosierung zur Inokulation des Reaktors so bestimmt, dass dieser auf eine optische Dichte von 0,2 eingestellt wurde.

Über den gesamten Prozess wurde die Temperatur auf 37°C geregelt und der pH einseitig mit Ammoniaklösung (25%) geregelt. Der Gelöstsauerstoff wurde über die Rührergeschwindigkeit (500-1500 upm) auf über 30% geregelt. Dabei betrug der Systemüberdruck 0,5 bar und wurde im Laufe der Zulaufphase nach Bedarf schrittweise bis auf 1 bar erhöht. Begast wurde dabei mit 200 NL/h Luft.

Das Ende der Satzphase wurde automatisch über einen starken Anstieg im Gelöstsauerstoffsignal erkannt und anschließend auf Zulaufbetrieb umgestellt. Dabei wurde für 14,5 Stunden ein exponentielles Zulaufprofil mit einer gesetzten Wachstumsrate von $\mu_{\text{set}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Im Anschluss wurde konstant Zulaufmedium zugeführt mit einem Volumenstrom von 25 mL h⁻¹. Nach insgesamt etwa 40 Stunden wurde der Reaktorlauf beendet und die ssDNA wie in 4.7.2 beschrieben aus dem gesamten Reaktionsvolumen isoliert.

4.6.3 Kultivierung mit „Reverser Infektion“ im Schüttelkolben

Für die Herstellung von ssDNA mit Hilfe der „Reversen Infektion“ wurden Zellen zunächst, wie in Kapitel 4.4.4 beschrieben, mit einem entsprechenden Helferplasmid transformiert. Die so entstandenen Kolonien wurden in Vorkulturröhrchen mit 5 mL Medium inkubiert. Hier wurde je nach Stamm entweder Mineralmedium nach Riesenberg (JM109) oder 2xYT Medium (NEB-stable) verwendet, das Medium enthielt Antibiotikum spezifisch für das Plasmid. Auch für die weiteren Schritte der Kultivierung wurden die jeweiligen Medien stammabhängig beibehalten. Die Röhrchen wurden für mindesten 6 und maximal 16 Stunden bei 37°C und 250 upm in einem Schüttelinkubator (Wisecube) inkubiert.

Schüttelkolben mit einem Nennvolumen von 500 mL wurden mit 50 mL Medium (mit dem Antibiotikum) vorbereitet. Zu dem Medium wurde je ein Tropfen Antischaum gegeben. Nach Inkubation der Vorkulturröhrchen, wenn diese eine mit dem Auge sichtbare Trübung aufwiesen, wurde jeweils ein mL aus einem Vorkulturröhrchen in einen der Vorbereiteten Schüttelkolben gegeben. Die Schüttelkolben wurden bei 37°C und 200 upm in einem Schüttelinkubator (Wisecube) inkubiert, bis die Kultur eine optische Dichte von 0,4 erreichte. Anschließend wurden Phagemidpartikel zugegeben, so dass etwa eine Multizipalität der Infektion von 1 tfu cfu^{-1} erreicht wird. Anschließend wurde die Kultur weiter Inkubiert bis zum nächsten Morgen.

Am nächsten Morgen erfolgte die Isolation der ssDNA (wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben) aus entweder dem gesamten Volumen oder aus 10 mL, je nachdem ob die erzeugten Phagemid-Partikel noch für weitere Experimente benötigt wurden. Dabei wurde die entsprechende Menge Fällungsmittel zu dem jeweiligen Volumen zugegeben und nach Inkubation die Phagemidpartikel abzentrifugiert. Die Phagemidpartikel wurden anschließend in 200 μL TE-Puffer resuspendiert und mit dem üblichen Protokoll (Kapitel 4.7.1) fortgefahren.

4.6.4 Kultivierung mit „Reverser Infektion“ im Rührkesselreaktor

Litermaßstab

Für die Vorkultur wurde zunächst ein Schüttelkolben mit 500 mL Nennvolumen mit 50 mL Mineralmedium nach Riesenberg vorbereitet. Dem Medium wurden 5 g L^{-1} Glukose und das Antibiotikum Kanamycin zugegeben. Im nächsten Schritt wurde ein Aliquot Kryokultur des gewünschten Stammes mit dem entsprechenden Helferplasmid bei Raumtemperatur aufgetaut. Das gesamte Aliquot (1 mL) wurde zur Inokulation in den Kolben gegeben und dieser über Nacht bei 37°C und 200 upm (Wisecube) inkubiert.

Im Anschluss wurden zwei Schüttelkolben mit einem Nennvolumen von 1000 mL mit je 100 mL Mineralmedium nach Riesenberg mit einer Satzglukose von 5 g L^{-1} vorbereitet. Dem Medium wurden ebenfalls Kanamycin zugegeben sowie ein Tropfen Antischaum. Zur

Inokulation wurden je 10 mL über-Nacht Vorkultur zugegeben. Anschließend wurden die Kolben bei 37°C und 200 upm im Schüttelinkubator (Wisecube) für etwa 7 h inkubiert.

Während die zweite Vorkulturstufe inkubierte, wurde der Reaktor (KLF 2000) vorbereitet und mit einem Startvolumen von 1,6 Litern Mineralmedium nach Riesenberg befüllt. Dabei wurde hier zunächst nur die Grundlösung in den Reaktor gegeben und autoklaviert und die restlichen Komponenten nach dem Autoklavieren steril über ein Silikonseptum zugegeben, wobei dem Medium auch wiederum Kanamycin sowie 25 g L⁻¹ Satzglukose zugegeben wurden.

Zum Ende der Inkubation der zweiten Vorkulturstufe, wenn die Kultur eine optische Dichte zwischen 2 und 4 erreicht hatte, wurde diese bei 12000 rcf für 5 Minuten in 50 mL Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Anschließend wurde das gesamte Zellpellet in etwa 15 mL Überstand resuspendiert. Die optische Dichte der entstandenen Lösung wurde gemessen und die Dosierung zur Inokulation des Reaktors so bestimmt, dass dieser auf eine optische Dichte von 0,2 eingestellt wurde.

Über den gesamten Prozess wurde die Temperatur auf 37°C (bzw. 30°C kurz vor Infektion bei bestimmten Prozessen) geregelt und der pH einseitig mit Ammoniaklösung (25%) geregelt. Der Gelöstsauerstoff wurde auf über 30% über die Rührergeschwindigkeit (500-1500 upm) geregelt. Dabei betrug der Systemüberdruck 0,5 bar und wurde im Laufe der Zulaufphase nach Bedarf schrittweise bis auf 1 bar erhöht. Begast wurde dabei mit 200 – 400 NL/h Luft.

Das Ende der Satzphase wurde automatisch über einen starken Anstieg im Gelöstsauerstoffsignal erkannt und anschließend auf Zulaufbetrieb umgestellt. Dabei wurde für 14,5 Stunden ein exponentielles Zulaufprofil mit einer gesetzten Wachstumsrate von $\mu_{\text{set}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Im Anschluss wurde konstant Zulaufmedium zugeführt mit einem Volumenstrom von 25 mL h⁻¹. Nach insgesamt etwa 40 Stunden wurde der Reaktorlauf beendet und die ssDNA wie in 4.7.2 beschrieben aus dem gesamten Reaktionsvolumen isoliert.

Pilotmaßstab

Für die Vorkultur wurden zunächst zwei Schüttelkolben mit 1000 mL Nennvolumen mit 100 mL Mineralmedium nach Riesenberg vorbereitet. Dem Medium wurden 5 g L⁻¹ Glukose und das Antibiotikum Kanamycin zugegeben. Im nächsten Schritt wurde je ein Aliquot Kryokultur des gewünschten Stammes mit dem entsprechenden Helferplasmid bei Raumtemperatur aufgetaut. Jeweils das gesamte Aliquot (1 mL) wurde zur Inokulation in jeden Kolben gegeben und dieser über Nacht bei 37°C und 200 upm (Wisecube) inkubiert.

Ein Rührkesselreaktor des Typs Labfors 2 (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) mit einem Nennvolumen von 5,5 Litern wurde vorbereitet und sterilisiert. Anschließend wurden 4 Liter Mineralmedium nach Riesenberg mit einer Satzglukose von 10 g L⁻¹ und dem Antibiotikum

Kanamycin steril in den Reaktor gepumpt. Für den so vorbereiteten Reaktor wurde die Schüttel-Vorkultur bei 12000 rcf für 5 Minuten in 50 mL Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Anschließend wurde das gesamte Zellpellet in etwa 15 mL Überstand resuspendiert. Die Zellsuspension wurde vollständig als Inokulum in den Vorkulturreaktor gegeben. Während der Kultivierung wurde mit etwa 2 vvm Luft begast, wobei die Gelöstsauerstoffkonzentration über die Rührergeschwindigkeit geregelt wurde ($> 40\%$). Der pH wurde einseitig mit 25% Ammoniaklösung auf pH 6,7 titriert. Nach Ende der Satzphase wurde ein exponentieller Zulauf mit 750 g L^{-1} Glucose (Zulaufmedium Kapitel 4.1.4) für eine Wachstumsrate von $\mu_{\text{set}} = 0,2 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Zehn Stunden nach Zulaufstart wurde auf einen konstanten Zulauf mit $0,02 \text{ L h}^{-1}$ umgestellt. Nach einer Kultivierungszeit von insgesamt etwa 20 h wurde die Kultur steril aus dem Reaktor in eine Transportflasche überführt.

Der 1000 Liter Reaktor für die Hauptkultur wurde parallel zur Vorkulturbereitung vorbereitet. Dafür wurde er mit 750 Litern Mineralmedium nach Riesenberg vorbereitet. Hier wurde eine Satzglukose von 20 g L^{-1} zugegeben und wie zuvor auch das Antibiotikum Kanamycin. Parallel dazu wurden 300 Liter Zulaufmedium in einem Vorlagetank vorbereitet. Für die Kultivierung im Pilotmaßstab wurde die Konzentration aller Komponenten im Zulaufmedium um einen Faktor 0,8 heruntersetzt. Dadurch hatte das Zulaufmedium nur eine Glukosekonzentration von 600 g L^{-1} , was zwar im Prozess zu einer stärkeren Verdünnung führt, die Gefahr von Infarkten im Leitungssystem durch Auskristallisieren der Glukose jedoch senkt. Als Titrationsmittel wurde auch hier mit 25% Ammoniaklösung gearbeitet und zur Schaumverringerng wurde Antischaum 204 unverdünnt eingesetzt.

Die Inokulation sollte eine optische Startdichte von 0,2 bis 0,3 erzielen. Dafür wurde die entsprechende Menge Vorkultur in den Reaktor gepumpt. Die Gelöstsauerstoffsättigung wurde über den Prozess auf über 30% geregelt, wobei Begasung, Druck und Rührergeschwindigkeit gesteuert wurden. Die Maximale Begasungsrate lag bei 2 vvm und der maximale Überdruck bei 2 bar. Die maximale Rührergeschwindigkeit betrug 350 upm. Die Temperatur wurde bis 2,5 h nach Zulaufstart auf 37°C geregelt, anschließend auf 30°C reduziert. Der pH wurde auf 6,7 geregelt.

Nach Ende der Satzphase wurde direkt auf Zulaufbetrieb umgeschaltet und bereits 3 Stunden nach Zulaufstart Phagemidpartikel zugegeben. Dabei wurde für 14 Stunden ein exponentielles Zulaufprofil mit einer gesetzten Wachstumsrate von $\mu_{\text{set}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Im Anschluss wurde konstant Zulaufmedium zugeführt, zunächst mit einem Volumenstrom von 15 L h^{-1} , während der Ernte nur noch mit $9,2 \text{ L h}^{-1}$. Nach insgesamt etwa 16 Stunden wurde der Reaktorlauf beendet und der Reaktorüberstand mit Hilfe eines Tellerseparators geerntet. Die anschließende Isolierung der ssDNA ist in Kapitel 4.7.3 beschrieben.

4.6.5 Kultivierung im Schüttelkolben mit M13 Phagen Infektion

Schüttelkolbenkultivierungen zur Untersuchung der Auswirkungen einzelner M13-Gene wurden in unbewehrten Schüttelkolben mit 500 mL Nennvolumen durchgeführt. Die Kolben wurden mit 50 mL Mineralmedium nach Riesenberg mit 5 g L^{-1} Glukose und dem Antibiotikum Chloramphenicol befüllt und mit 1 mL Zellsuspension bei $\text{OD}_{600} = 0,3$ inokuliert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bis $\text{OD}_{600} = 0,2$ bei 37°C und 200 upm in einem Schüttelinkubator (Wisecube). Es folgte eine Induktion mit 100 mM Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) und weitere Inkubation. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,4 nach ~ 1 h wurde die Infektion mit den entsprechenden Phagen mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von über 1 tfu cfu^{-1} initiiert und über Nacht weiter inkubiert. Schließlich wurde die Fluoreszenz von 200 μL Zellsuspension in einer 96-Well-Platte mit einem Photometer (Infinite M2000, Tecan, Männedorf, Schweiz) bestimmt, die Zelldichte wurde wie zuvor in einem Photometer gemessen, und die ssDNA-Konzentration wurde nach der Isolierung von 10 ml Überstand in einem Nanovolumenphotometer (N120, Implen, München, Deutschland) ermittelt.

4.7 Isolieren von Einzelstrang DNA

Die in den Prozessen hergestellten Phagemidpartikel müssen nach Prozessende aus dem Reaktorüberstand gereinigt werden, um im Anschluss die ssDNA aus den Phagenkapsiden zu isolieren. Dazu wurden in erster Linie klassische Methoden der selektiven Fällung und Sedimentation angewendet. Je nach Maßstab der Reinigung wurde dabei leicht unterschiedlich vorgegangen.

4.7.1 Isolierung der Einzelstrang DNA im Millilitermaßstab

Für Analysen der ssDNA im Verlauf einer Kultivierung wurden Proben zu je 2 mL aus dem jeweiligen Kultivierungssystem entnommen. Zur Isolierung der ssDNA wurden zunächst die Zellen durch Zentrifugation bei 14500 rzb für 10 Minuten abgetrennt. Der Überstand wurde mit 300 μL Präzipitationslösung versetzt, um dann die Makromolekularen Phagen- oder Phagemid-partikel zu fällen. Durch erneutes Zentrifugieren bei 14500 rzb für 10 min wurden die Partikel pelletiert, woraufhin der Überstand entfernt wurde. Anschließend wurde das Pellet in 200 μL TE-Puffer resuspendiert und die Partikel durch Zugabe von 400 μL Lysepuffer für 30-60 Sekunden lysiert. Durch Zugabe von 300 μL Neutralisationspuffer wurde die Lösung neutralisiert und unerwünschte Makromoleküle gefällt. Die gefällten Moleküle wurden durch erneute Zentrifugation bei 14500 rzb für 10 min abgetrennt. Der ssDNA-haltige Überstand wurde daraufhin mit 900 μL Ethanol (100%) versetzt, um nun auch diese zu fällen. Durch weitere Zentrifugation (10 min, 14500 rzb) wurde die ssDNA pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen. Um das Pellet verlustfrei zu gewinnen,

wurde das Ganze ein weiteres Mal zentrifugiert (10 min, 14500 rzb) und vom Überstand befreit. Anschließend wurde das ssDNA Pellet in 200 µL TE-Puffer gelöst.

4.7.2 Isolierung der Einzelstrang DNA im Litermaßstab

Um die Gesamtmenge an ssDNA aus dem Kultivierungsmedium zu gewinnen wurde wie im Folgenden beschrieben vorgegangen.

Das gesamte Kultivierungsmedium wurde zunächst für eine Stunde bei 3260 rzb zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in frische Zentrifugationsgefäße überführt und für eine weitere Stunde bei 14250 rzb zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem frischen Zentrifugationsgefäß mit 30 g L⁻¹ NaCl und 25 g L⁻¹ Polyethylenglycol (PEG) 8000 versetzt und unter Rühren (800 upm) für mindestens eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde erneut für 20 Minuten bei 3260 rzb zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 50 bis maximal 100 mL TE-Puffer gelöst. Durch Zugabe des doppelten Volumens an Lysepuffer wurde die Hülle der Phagen oder Phagemide für 30-60 Sekunden lysiert. Weitere Zugabe des 1,5-fachen Volumens an Neutralisationspuffer neutralisierte die Lösung, die für weitere 15 min auf Eis inkubiert wurde. Daraufhin wurde für 20 min bei 3260 rzb zentrifugiert. Und der Überstand zu je 25 mL in 50 mL Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Lösung wurde in den Zentrifugationsröhrchen 1 zu 1 mit 100% Ethanol (vergällt) versetzt und für mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert. Die gefällte DNA wurde anschließend für 10 min bei 3260 rzb zentrifugiert. Die Pellets wurden zum Waschen mit 75% Ethanol in einem Zentrifugationsröhrchen zusammengeführt. Abschließend wurde alles erneut für 10 min bei 12000 rzb zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 20-50 mL TE-Puffer gelöst.

4.7.3 Isolierung der Einzelstrang DNA im Pilotmaßstab

Die Isolierung der ssDNA aus dem Reaktionsgemisch unterscheidet sich im Pilotmaßstab noch einmal wesentlich, da hier vor allem bei der Sedimentation teilweise mit kontinuierlichen Verfahren gearbeitet werden musste.

Im ersten Schritt wurden die Zellen kontinuierlich mit Hilfe eines Tellerseparators (CSA 8-06-476, GEA Westfalia Separator AG, Oelde, Deutschland) von der Flüssigphase abgetrennt und diese in einem 600 Liter Auffangbehälter zwischengelagert. Die Zellen wurden in einen autoklavierbaren Tank überführt, wo sie inaktiviert wurden. Dabei wurde der Tellerseparator bei seiner maximalen Drehzahl (9210 upm) mit einem Volumenstrom von etwa 200 L h⁻¹ betrieben. Im Anschluss wurde die Klarphase weiter bei einem Volumenstrom von etwa 150 L h⁻¹ im Kreislauf durch den Tellerseparator geführt, bis kein nennenswerter Unterschied zwischen der optischen Dichte des Vorlaufs und Klarlaufs mehr zu erkennen war. Dabei wurde die Teilentleerungszeit schrittweise erhöht um große Volumenverluste zu vermeiden.

Anschließend wurde der Flüssigkeit Polyethylenglycol 8000 sowie NaCl zugegeben, bis eine Konzentration von 25 g L^{-1} PEG und 40 g L^{-1} NaCl erreicht waren. So wurde die Lösung bei etwa 15°C über Nacht inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurden die gefällten Partikel wieder mit Hilfe des Tellerseparators abgetrennt. Dafür wurde die Flüssigkeit bei zunächst 250 L h^{-1} und später 150 L h^{-1} im Kreislauf durch den Separator geführt, bis wieder kein nennenswerter Unterschied zwischen der optischen Dichte des Vorlaufs und Klarlaufs zu erkennen war.

Die so gesammelten Partikel wurden auf ein Volumen von 126 Litern mit Trinkwasser aufgefüllt und auf etwa 15°C gekühlt. Durch 20-minütiges Rühren wurde alles gut vermischt. Anschließend wurden der Lösung je 20 Liter Lysepuffer L1 und Lysepuffer L2 zugegeben. Die Komponenten des Lysepuffers aus dem Labormaßstab mussten getrennt werden, da sie sich in den notwendigen Konzentrationen für den Pilotmaßstab nicht gemeinsam lösen lassen. Nach etwa 5 Minuten Inkubation unter ständigem Rühren wurden 34 Liter Neutralisationspuffer (Variante für den Pilotmaßstab) zugegeben. So wurde das Gemisch weiter unter Rühren bei etwa 15°C inkubiert.

Nach etwa 30 min Inkubation wurde erneut der ausgefallene Feststoff mit Hilfe des Separators abgetrennt. Dabei wurde wie im letzten Tellerseparator-Schritt vorgegangen.

Die so gewonnene Klarphase wurde mit 200 Litern kaltem (4°C) Ethanol (96%) vermischt und bei 15°C nach nur initialem Rühren unbewegt über das Wochenende inkubiert.

Da bei dieser langen Inkubation die ausfallende ssDNA sedimentiert, konnte mit Hilfe einer Kreiselpumpe im Anschluss der Überstand dekantiert werden. Das übrigbleibende Sediment, mit einem Volumen von etwa 30 Litern, wurde anschließend in einen kleineren Tank überführt.

Um die Verbliebene Flüssigphase und damit auch das Ethanol von der ssDNA zu entfernen, wurde das Sediment absatzweise in einer Becherzentrifuge bei 3260 rcf für je 15 Minuten zentrifugiert. Die so gewonnenen festen Pellets wurde zusammengeführt und in insgesamt 10 Litern TE-Puffer gelöst. Die Lösung wurde zur Lagerung in 0,5 Liter Kunststoffflaschen überführt und bei -20°C eingefroren.

4.8 Faltung von DNA-Origami-Strukturen

Die Faltung von DNA-Origami Strukturen ist eine Methodik, die besonders in Veröffentlichungen aus dem Bereich der DNA-Nanotechnologie beschrieben wird. Dabei existieren unterschiedlichste Vorgehensweisen, die an anderer Stelle (Sobczak *et al.*, 2012; Wagenbauer *et al.*, 2017) im Detail erklärt sind. In diesem Kapitel sollen nur die in dieser Arbeit genutzten Protokolle und Vorgehensweisen erläutert werden.

4.8.1 Schneiden der DNAzyme mit Zn²⁺

In dieser Arbeit wurden unter anderem ssDNA Sequenzen produziert, die sowohl für den Gerüststrang als auch für die Klammernukleotide kodieren. Um mit dieser zirkulären ssDNA DNA-Origami Strukturen falten zu können, muss sie zunächst in ihre einzelnen Sequenzen zerschnitten werden. Zu diesem Zweck waren die Sequenzen mit DNAzym-Kassetten untertrennt wie bereits an anderer Stelle beschrieben (Praetorius *et al.*, 2017).

Um die Sequenzen zu zerschneiden musste die DNA unter fest vorgegebenen Reaktionsbedingungen bei 37°C inkubiert werden.

Zn²⁺ Hydrolyse im µL Maßstab

Für die Hydrolyse im kleinen Maßstab wurden Reaktionen mit einem Volumen von 200 µL und einer finalen ssDNA Konzentration von 50 nM angesetzt. Die finale Zn²⁺ Konzentration betrug immer 2 mM. Die Komponenten wurden wie in Tabelle 4.10 aufgeführt zusammengegeben.

Tabelle 4.10: Zusammensetzung der Zn²⁺-Hydrolyse mit DNAzymen im µL-Maßstab

Bestandteil	Zugabe	Konzentration final
10-fach DNAzym-Reaktionspuffer	20 µL	1-fach
Zinkchlorid Lösung 100 mM	4 µL	2 mM
ssDNA	X µL	50 nM
Nuklease freies Wasser	X µL	-
Gesamtvolumen	200 µL	-

Die Reaktionsansätze wurden in 200 µL Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend für mindestens 12 Stunden bei 37°C in einem PCR-Cycler inkubiert.

Für die Reinigung der geschnittenen ssDNA wurde der Reaktionsansatz in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit mindestens 1,5 mL Fassungsvermögen überführt. Dazu wurden 60 µL Neutralisationspuffer und 7 µL MgCl₂ (1M) gegeben und gut gemischt. Anschließend wurden 800 µL kalter (-20°C) Ethanol (100%) dazugegeben, kurz vermischt und direkt die gesamte Reaktion bei -20°C inkubiert. Nach Inkubation über Nacht wurde die Reaktionsmischung mindestens 30 Minuten bei 14500 rcf zentrifugiert. Das entstandene Pellet (teilweise sehr schwer zu sehen) wurde mit kaltem (-20°C) 75% Ethanol gewaschen, erneut für 10 min zentrifugiert und der Überstand sauber entfernt. Das gereinigte Pellet wurde für etwa 20 min offen getrocknet und anschließend in 50 µL TE-Puffer gelöst.

Zn²⁺ Hydrolyse im mL Maßstab

Der wichtigste Unterschied zur Hydrolyse im kleinen Maßstab ist, dass bei der Hydrolyse im mL Maßstab mit einer finalen ssDNA Konzentration von 500 nM gearbeitet wurde. So können auch größere Mengen ssDNA noch verhältnismäßig kleinvolumig verarbeitet werden. Da bei einer Konzentration von 500 nM allerdings der Anteil an ssDNA Lösung in der Reaktion deutlich größer ist, muss folgende Besonderheit beachtet werden. Durch den Anteil an EDTA in dem TE-Puffer, in dem die ssDNA gelöst ist, kann sich die effektive Zn²⁺ Ionenkonzentration verändern. Auch die negativ geladene ssDNA kann die Zn²⁺ Ionen komplexieren. Aus diesem Grund muss zunächst die optimale Zn²⁺ Konzentration für die jeweilige Reaktion ermittelt werden, bevor größere Hydrolysereaktionen angesetzt werden. Dazu wurde ähnlich wie im µL Maßstab vorgegangen, wobei Reaktionen mit lediglich 50 µL Reaktionsvolumen angesetzt wurden. Hier wurde entsprechend mit einer finalen ssDNA Konzentration von 500 nM gearbeitet und die Zn²⁺ Konzentration von 2 bis 6 mM in 0,5 mM Stufen variiert. Der Reaktionspuffer wurde dabei nicht verändert. Die so hydrolysierten Proben wurden nicht weiter gereinigt, sondern direkt, wie in Abbildung 4.2 dargestellt, mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

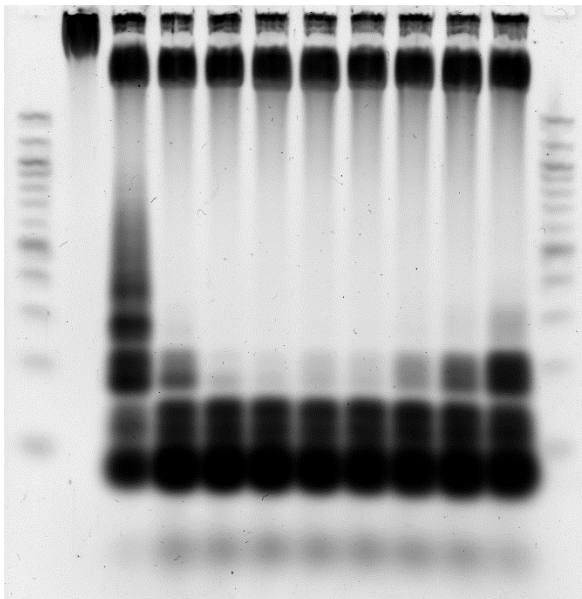


Abbildung 4.2: Agarosegelelektrophorese von Zn²⁺ hydrolysiertem ssDNA. Auf allen Spuren ist je eine Hydrolysereaktion bei unterschiedlichen Zn²⁺-Konzentrationen zu sehen. Spuren von links nach rechts: 1kb Leiter; 1 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM, 4 mM, 4,5 mM, 5 mM, 5,5 mM, 6 mM, 8 mM; 1kb Leiter. Bei 3,5 mM liegt das Optimum, da bei dieser Konzentration fast keine ungeschnittenen Fragmente zu erkennen sind.

Die optimalen Hydrolysebedingungen wurden dann für einen Reaktionsansatz mit 10-50 mL Reaktionsvolumen angewendet. Dafür wurden die notwendigen Komponenten im gleichen Verhältnis wie in der entsprechenden Screening-Reaktion in einem Falcon Zentrifugenröhrchen zusammengegeben. Zur Inkubation wurde das Röhrchen verschlossen und

freischwimmend in ein temperiertes Wasserbad gegeben und bei 37°C für mindestens 12 Stunden inkubiert.

Im Anschluss wurde die geschnittene ssDNA gereinigt. Dies erfolgte zunächst über einen Fällungsschritt, für den die in Tabelle 4.11 aufgeführten Komponenten in dem entsprechenden Mengenverhältnis zur Probe zugegeben wurden. Dazu wurde die Probe bei Bedarf zunächst in ein größeres Gefäß überführt.

Tabelle 4.11: Zusammensetzung der Fällung nach Zn²⁺-Hydrolyse im mL Maßstab.

Bestandteil	Beispielzugabe	Anteile
Reaktionsansatz	3 mL	1
Neutralisationspuffer	900 µL	0,3
MgCl ₂ -Lösung (1M)	100 µL	0,033
Isopropanol (100%, -20°C)	6 mL	2
Gesamtvolumen	10 mL	3,333

Nach Zugabe aller Fällungsreagenzien wurde die Probe bei -20°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Fällungsansatz für 45 min bei 3260 rcf zentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss mit 75% Ethanol (-20°C) gewaschen und nochmals für 30 min bei 3260 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich entfernt und das Pellet für 20 Minuten offen getrocknet. Abschließend wurde das Pellet wahlweise in wenig TE-Puffer (Zielkonzentration zwischen 500 nM und 1 µM) oder direkt in Faltungspuffer gelöst.

4.8.2 Falten von DNA-Origami-Strukturen

Die Faltungsreaktionen wurden bei einer Konzentration von 50 nM des Gerüststrangs angesetzt. Bei Faltungen mit chemisch synthetisierten Klammernukleotiden wurden diese je mit einer Konzentration von 200 nM zur Reaktion zugegeben. Die Faltung fand in Faltungspuffer bei einer MgCl₂ Konzentration von 20 mM statt.

Für die eigentliche Faltungsreaktion wurde die Lösung zunächst für 15 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurde die Lösung schnell von 65°C auf 60°C abgekühlt und danach langsam, 1°C pro Stunde weitergekühlt bis auf 44°C. Die so gefalteten Strukturen wurden anschließend im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Für die analytische Faltung wurden Faltungsansätze in insgesamt 100 µL Volumen durchgeführt. Dafür wurde die Lösung in PCR-Reaktionsgefäße gegeben und die Temperierung mit einem PCR-cycler bewerkstelligt.

Für Faltungen im Litermaßstab kann ein herkömmlicher Rührkesselbioreaktor genutzt werden. Da die Kühlung nur sehr langsam erfolgt ist keine turbulente Durchmischung notwendig.

Leichtes Rühren ist ausreichend (Praetorius *et al.*, 2017). Im KLF 2000 wurde mit einer Rate von 100 min^{-1} gerührt.

4.9 Analytische Methoden

4.9.1 Bestimmung der Zellkonzentration

Die Zellkonzentration wurde *at-line* über die Messung der optischen Dichte bestimmt und *offline* über die gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration. Die optische Dichte wurde gegen eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) in einem Einstrahlphotometer (Genesys™ 10S UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) bestimmt. Da der lineare Messbereich des Instruments zwischen 0,0 und 0,3 angenommen wurde, wurde die Zellsuspension bei Bedarf mit PBS verdünnt. Die Analysen wurden im Dreifachansatz durchgeführt.

Die Zellzahl wurde nach Gleichung 4.1 aus der optischen Dichte bei 600 nm berechnet. Die Korrelation wurde mit Hilfe eines *Cell-sorters* bestimmt.

$$c_{Zellen} = OD_{600} * 10^9 \quad \text{Gleichung 4.1}$$

c_{Zellen} Konzentration der Zellen, cfu mL^{-1}
 OD_{600} Optische Dichte bei 600 nm, -

Die Biotrockenmassekonzentration wurde *offline* bestimmt indem 2mL Probe in einem getrockneten (mindestens 48 h, 80°C) und gewogenen 2mL Eppendorfreaktionsgefäß bei 13000 rcf für 10 Minuten abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde entfernt und die Pellets bei 80°C für mindestens 48 h bis zur Massenkonstanz getrocknet. Nach Bestimmen des finalen Gewichts der Reaktionsgefäße konnte die Biotrockenmassekonzentration aus der Gewichts Differenz und dem eingesetzten Volumen berechnet werden. Auch hier wurde in Triplikaten gearbeitet.

4.9.2 Bestimmung der Einzelstrang DNA Konzentration

Die Konzentration der ssDNA wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Absorption bei 260 nm gemessen und über das Lambert Beer'sche Gesetz die Konzentration berechnet. Gemessen wurde die Konzentration in einem Mikrovolumen UV-Vis-Photometer (N120, Implen, München, Deutschland) dabei konnte die Messstrecke zwischen 1 mm und 0,125 mm variiert werden, um auch bei hohen ssDNA Konzentrationen im linearen Bereich des Messgeräts zu bleiben. Die Absorption wurde durch das Gerät immer direkt auf den entsprechenden Wert für eine Messstrecke von 10 mm umgerechnet. Bei allen Proben wurde

tatsächlich ein ganzes Spektrum zwischen 200 nm und 900 nm aufgezeichnet, um Verunreinigungen der Probe mit Proteinen oder Zuckern auszuschließen.

Die Molaren Absorptionskoeffizienten ϵ der verschiedenen ssDNA-Spezies (wurden mit dem Online-DNA-Kalkulator der Webseite www.molbiotools.com berechnet) sind in Tabelle 4.8 aufgeführt, berechnet nach Tataurov *et al.* (2008).

4.9.3 Bestimmung der Qualität der Einzelstrang DNA

Zur Bestimmung der Qualität von Proben wurde zunächst die ssDNA mittels Agarosegelelektrophorese nach Fragmentlängen aufgetrennt. Anschließend wurde von dem Gel ein Bild gemacht, wobei die ssDNA mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffs (MIDORI Green Advance, NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland) sichtbar gemacht wurde.

Mit der Software Photoshop CC (Adobe Inc., San José, Kalifornien, USA) wurde die Bildgröße auf die Gelfläche zugeschnitten und Belichtung und Kontrast für das gesamte Bild angepasst.

Um abschließend die Menge an Produkt im Verhältnis zur gesamt aufgetragenen DNA Menge zu bestimmen wurde das Bild je Spur ausgewertet. Dazu wurde die Software Fiji (open source, fiji.sc) genutzt, die eine Analyse der Gel-Spuren mit dem eingebauten Tool zur Gelanalyse möglich macht.

4.9.4 Bestimmung der Qualität der DNA-Origami-Strukturen

Zur Bestimmung der Qualität von DNA-Origami-Strukturen wurde sowohl Agarosegelelektrophorese genutzt als auch Bildgebung mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM). Für die AGEP wurde wie für ungefaltete ssDNA vorgegangen, beschrieben in Kapitel 4.9.6. Für die TEM-Aufnahmen wurde wie folgt vorgegangen.

TEM-Grids wurden durch Inkubation von 5 μ L der gereinigten oder ungereinigten Proben auf *formvar-supported carbon-coated Cu400 Grids* (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) für 30-40 s hergestellt. Überschüssige Probe wurde mit Filterpapier abgetupft und die *Grids* mit einer wässrigen 2%igen Uranylformiatlösung für 30 s fixiert. Nach dem Trocknen wurden die Gitter mit einem Transmissionselektronenmikroskop (FEI Tecnai 120, FEI, Hillsboro, USA) bei 120 kV und einer Vergrößerung von 30000 abgebildet, was zu einer endgültigen Pixelgröße von 3,56 Å pro Pixel führte. Die Bilder wurden mit der SerialEM-Software (Mastrorade, 2005) aufgenommen und mit der Software Fiji (Open Source, fiji.sc) analysiert. 2D-Klassifikationen wurden mit Relion 3.0 (Scheres, 2012) erstellt. Diese Arbeiten wurden durch Maximilian Honemann am Institut für Biomolekulare Nanotechnologie durchgeführt.

4.9.5 Bestimmung der Phagen bzw. Phagemidkonzentration

Die Konzentration der Phagen bzw. Phagemidpartikel wurde indirekt aus der Konzentration der ssDNA nach Reinigung errechnet. Dabei wurde die Grundannahme getroffen, dass jedes

ssDNA-Molekül aus einem Phagen bzw. Phagemidpartikel stammt. So konnte, wie in Gleichung 4.2 über die molare Konzentration der ssDNA mit Hilfe der Avogadrokonstante auf eine Partikelzahl rückgeschlossen werden.

$$n_{\text{Partikel}} = c_{\text{ssDNA}} * N_A \quad \text{Gleichung 4.2}$$

n_{Partikel}	Anzahl der Phagen- bzw. Phagemidpartikel in einem Milliliter, mL ⁻¹
c_{ssDNA}	Konzentration der ssDNA in der Probe, mol mL ⁻¹
N_A	Avogadrokonstante, ~6,0221*10 ²³ mol ⁻¹

4.9.6 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse von DNA jeglicher Art wurde zunächst mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Zusammensetzungen gewählt, je nach Art der DNA.

dsDNA

Für die Analyse von dsDNA-Fragmenten wurden 1% Agarosegele mit 1-fach Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer mit 0,001% Fluoreszenzfarbstoff (MIDORI Green Advance, NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland) verwendet. Die Arbeitsspannung betrug 120 Volt für 45-60 Minuten. Die Gele wurden mit Hilfe einer Intas Fluoreszenzfotokammer (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) fotografiert. Dabei wurde wahlweise eine Canon EOS 70D Kamera (Canon Inc., Tokyo, Japan) oder ein Typhoon 9500 FLA Laserscanner (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) für die Bildgebung genutzt. Die Bilder wurden im Ganzen nachbearbeitet (Adobe Photoshop CC). Grundsätzlich wurde die Fragmentlänge mit Hilfe der 1kb Plus DNA Ladder von NEB (New England BioLabs, Ipswich MA, USA) bestimmt. Sofern verfügbar, wurden 1000 ng DNA-Probe pro Spur aufgetragen. Wenn keine 1000 ng der DNA-Probe verfügbar waren, so wurde die maximal mögliche Menge aufgetragen.

ssDNA

Für die Analyse von zirkulärer ssDNA wurden 2% Agarosegele mit 0,5-fach Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer mit 0,002% Fluoreszenzfarbstoff (MIDORI Green Advance, NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland) verwendet. Die Arbeitsspannung betrug 90 Volt für 1-1,5 Stunden. Die Gele wurden mit Hilfe einer Intas Fluoreszenzfotokammer (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) fotografiert. Dabei wurde wahlweise eine Canon EOS 70D Kamera (Canon Inc., Tokyo, Japan) oder ein Typhoon 9500 FLA Laserscanner (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) für die Bildgebung genutzt. Die Bilder wurden im Ganzen nachbearbeitet (Adobe Photoshop CC). Grundsätzlich

wurde die Größe der ssDNA mit Hilfe der 1kb Plus DNA Ladder von NEB (New England BioLabs, Ipswich MA, USA) geschätzt. Sofern verfügbar, wurden 1000 ng DNA-Probe pro Spur aufgetragen. Wenn keine 1000 ng der DNA-Probe verfügbar waren, so wurde die maximal mögliche Menge aufgetragen.

4.10 Berechnung

4.10.1 Mathematische Beschreibung der Produktbildung nach Gompertz

Zur mathematischen Beschreibung der Produktbildung wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten die Gompertz-Funktion genutzt (Kick, Hensler, *et al.*, 2017). Hiermit konnte die ssDNA Konzentration in Abhängigkeit der Zeit nach Infektion dargestellt werden. Dazu müssen die Parameter a, b und c entlang der gemessenen Konzentrationswerte gefittet werden. Der Fit wurde in MATLAB (The MathWorks Inc., Natick MA, USA) mit Hilfe der curve-fitting-toolbox durchgeführt. Dabei wurden die 95% Konfidenzbänder als nicht-simultane Funktionsgrenzen berechnet.

$$c_{ssDNA}(t) = a * e^{-e^{-\frac{t-c}{b}}} \quad \text{Gleichung 4.3}$$

c_{ssDNA}	Konzentration der ssDNA im Reaktormedium, mg L ⁻¹
t	Zeit nach Infektion, h
a	Maximal erreichbare ssDNA Konzentration, mg L ⁻¹
b	x-Achsenverschiebung, -
c	Maximale Steigung am Wendepunkt, -

4.10.2 Berechnung der Multiplizität der Infektion

Die Multiplizität der Infektion beschreibt das Verhältnis von Phagen bzw. Phagemidpartikeln zu den Zellen. Sie ist wie in Gleichung 4.4 als Anzahl der Phagen bzw. Phagemidpartikel pro Anzahl Kolonie-formender-Einheiten (cfu) definiert. Dabei werden die Anzahl der Phagen als Plaque-formende-Einheiten (pfu) und die der Phagemidpartikel als transformierende Einheiten (tfu) bezeichnet.

$$MOI = \frac{c_{Phagen/Phagemide}}{c_{Zellen}} \quad \text{Gleichung 4.4}$$

MOI	Multiplizität der Infektion, pfu cfu ⁻¹
$c_{Phagen/Phagemide}$	Konzentration der Phagen bzw. Phagemidpartikel, pfu mL ⁻¹ bzw. tfu mL ⁻¹
c_{Zellen}	Konzentration der Zellen, cfu mL ⁻¹

Die Konzentration der Phagen bzw. der Phagemidpartikel wurde entweder experimentell bestimmt oder aus der Konzentration der isolierten ssDNA berechnet. Dazu wurde auf Basis dessen, dass pro Phagen-Hülle eine Kopie des Genoms enthalten ist angenommen, dass pro Mol ssDNA auch $6,0221 \cdot 10^{23}$ Partikel in der Lösung vorhanden sind.

5 Phagen-freie Herstellung von ssDNA mit induzierbaren Helferplasmiden

Zur Herstellung von ssDNA für die Ergebnisse in diesem Kapitel, wurde *E. coli* stets mit Helferplasmid und Phagemid doppelt transformiert. Die Experimente erfolgten in Schüttelkolben und im Rührkesselbioreaktor im Litermaßstab.

5.1 ssDNA Herstellung mit Hilfe doppelt transformierter *E. coli*

Bei der Verwendung doppelt transformierter *E. coli* – mit Helferplasmid und Phagemid – zur Herstellung von ssDNA besteht das Problem, dass die Zellen direkt nach der Transformation mit der Produktion von ssDNA beginnen. Da gleichzeitig die Produktion nach einigen Generationen wieder beendet wird, kann dies aus technischen Gründen nicht in den Produktionsmaßstab übertragen werden.

In diesem Kapitel werden Ergebnisse gezeigt, die als Vorversuch dienen. Hier wird gezeigt, dass mit der Doppeltransformation die ssDNA-Herstellung im Labormaßstab in einem Rührkesselreaktor technisch nur im Satzverfahren, bereits aber nicht mehr in einem Zulaufverfahren möglich ist.

Für die Untersuchungen wurde der Stamm JM109 ausgewählt. Er wurde speziell zur Herstellung von ssDNA mit M13 entwickelt und bereits in vorangegangenen Arbeiten zur Herstellung von M13 in Hochzelldichtekultivierung eingesetzt.

Zunächst wurde mit Helferplasmiden gearbeitet, die bereits in vorangegangenen Arbeiten erstellt wurden. Das Helferplasmid Nr. 4 (pfhp4 siehe Kapitel 4.3.2) wurde von Florian Praetorius erstellt und besteht aus einem pSB4K5 Plasmidrückgrat und dem Genom des Bakteriophagen M13mp18, wobei der größte Teil der intergenen Region deletiert wurde. Das Helferplasmid Nr. 17 (pfhp17 siehe Kapitel 4.3.2) wurde von Benjamin Kick erstellt und ist genauso aufgebaut wie pfhp4, wobei das Genom des Bakteriophagen M13KO7 eingesetzt wurde.

Vorversuche wurden in Schüttelkolben durchgeführt (siehe Kapitel 4.6.1).

Zunächst wurde mit dem Komplexmedium „2xYT“ gearbeitet, welches mit Hefeextrakt und Pepton alle notwendigen Substrate für das Wachstum von *E. coli* enthält. Zusätzlich wurden $1,2 \text{ g L}^{-1}$ Magnesiumsulfat Heptahydrat zugegeben, wobei die Mg^{2+} -Ionen bei der Stabilisierung negativer Ladungen auf der Zelloberfläche helfen. Bei den Satzprozessen im

Schüttelkolben wurden doppelt transformierte Kolonien von einer Agarplatte in Vorkulturröhrchen mit 5 mL Medium gegeben und diese nach Inkubation über Tag in einen Schüttelkolben mit 50 mL Medium überführt. Diese Kulturen wurden daraufhin über Nacht inkubiert und anschließend die ssDNA aus dem Überstand isoliert.

Mit der Kombination aus dem Helferplasmid pfhp4 und dem Phagemid cp2 konnte zum Beispiel bei einer finalen optischen Dichte $OD_{600} = 0,9$ eine maximale ssDNA-Konzentration von $1,51 \text{ mg L}^{-1}$ erreicht werden oder bei Kombination von Helferplasmid pfhp4 und Phagemid cp3 bei einer finalen optischen Dichte $OD_{600} = 0,59$ eine maximale ssDNA-Konzentration von $0,88 \text{ mg L}^{-1}$. Genauso bei Kombination von Helferplasmid pfhp17 mit den gleichen Phagemiden wie oben, wobei mit cp2 z.B. eine finale $OD_{600} = 1,3$ und eine maximale Produktkonzentration $1,76 \text{ mg L}^{-1}$ und mit cp3 z.B. eine finale $OD_{600} = 0,98$ und eine maximale Produktkonzentration $0,66 \text{ mg L}^{-1}$ erreicht wurde. Die Produktreinheit, analysiert mittels Agarosegelelektrophorese, ist dabei üblicherweise hoch, wie für die aufgeführten Beispiele in Abbildung 5.1 gezeigt, mit einer deutlichen Produktbande und wenig Nebenprodukten.

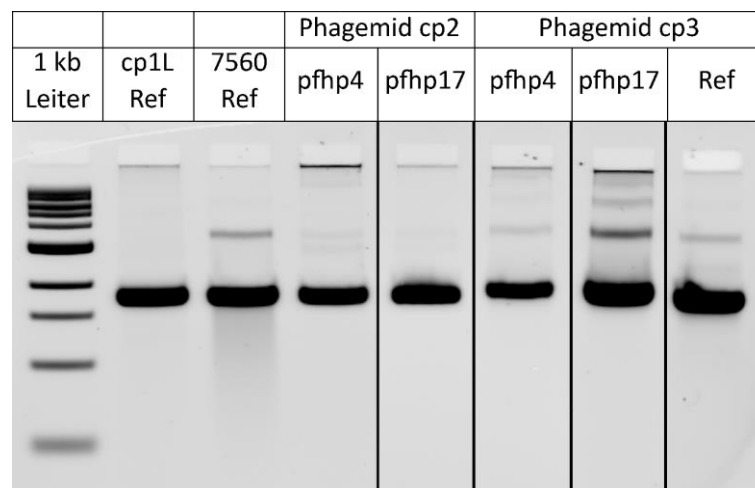


Abbildung 5.1: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus verschiedenen Schüttelkolbenkultivierungen mit doppelt transformierten *E. coli* JM109 in „2xYT“ Medium. Bei den Referenzen (Ref) links handelt es sich um die ssDNA des Phagemids cp1L und eine M13 ssDNA mit 7560 Basen. Rechts davon ist die ssDNA der Satzprozesse in Schüttelkolben aufgetragen. Die Kombination von Helferplasmid und Phagemid ist oberhalb der Spuren angegeben. In der rechtesten Spur ist die ssDNA des Phagemids cp3 als Referenz aufgetragen. Bei dem Gelbild wurde der Kontrast gleich über das ganze Bild eingestellt, hier unwichtige Gelspuren wurden allerdings ausgeschnitten und das Gel wieder ohne Verschieben der Spuren zusammengesetzt. Die Schnitte sind durch schwarze Linien markiert.

Im unkontrollierten Satzprozess in Schüttelkolben schwanken Wachstum und maximale Produktkonzentration teilweise stark, was allerdings nicht mit der Auswahl von Helferplasmid und Phagemid korreliert.

Das Satzverfahren wurde anschließend in einem Rührkesselbioreaktor durchgeführt. Dabei wurde wie zuvor im Schüttelkolben mit dem Komplexmedium „2xYT“ und dem *E. coli* Stamm JM109 gearbeitet. Da im Rührkesselreaktor ein besserer Sauerstoffeintrag möglich ist, wurden

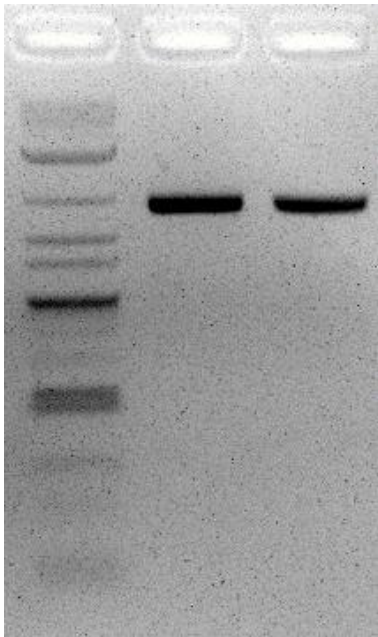


Abbildung 5.2: Agarosegelelektrophorese der ssDNA hergestellt im Satzverfahren in einem Rührkesselreaktor. Spuren von links nach rechts: 1kb plus Leiter; CS3L Referenz; Produkt-ssDNA

zusätzlich 5 g L^{-1} Glukose vorgelegt. Um die Generationszahlen möglichst nah an dem zu halten, was bereits in den Vorversuchen in Schüttelkolben durchgeführt wurde, wurden 8 Kolonien doppelt transformierter *E. coli* in je einem Vorkulturröhrchen angezogen und damit die 6 Liter Medium in dem Rührkesselreaktor inokuliert. So wurde zwar mit einer geringeren Zellkonzentration inokuliert als bei den Schüttelkolben (die optische Dichte lag lediglich bei $\text{OD}_{600} = 0,013$), jedoch die Anzahl an Generationen in der Vorkultur nicht verändert. In dem Satzprozess wurde, nach etwa 16 Stunden Prozesszeit, final eine optische Dichte $\text{OD}_{600} = 16,4$ erreicht.

Nach Isolierung der ssDNA konnte die maximale Konzentration an Produkt-ssDNA im Reaktormedium berechnet werden. Diese lag bei $8,85 \text{ mg L}^{-1}$.

Durch Agarosegelelektrophorese konnte, wie in Abbildung 5.2 zu sehen, auch gezeigt werden, dass die so produzierte ssDNA qualitativ sehr gut war. Sie entspricht in ihrer Länge der Referenz von 7560 Basen. Außerdem sind keine anderen Banden außer der Produktbande im Gel zu erkennen. Verunreinigungen sind also nicht im Produkt enthalten.

Um zu zeigen, dass grundsätzlich durch ein Zulaufverfahren die ssDNA-Konzentration gesteigert werden kann, wurde dies im Schüttelkolbenmaßstab bei einem Arbeitsvolumen von lediglich 50 mL etabliert. Dazu wurde das kommerziell erhältliche Medium „EnPresso B“ (Enpresso GmbH, Berlin, Deutschland) eingesetzt. Bei diesem Medium wird durch Zugabe des Enzyms *EnZ I'm* Glukose langsam freigesetzt, indem ein lösliches Glukose-Polysaccharid in seine Monomere aufgespalten wird. So konnte im Schüttelkolben ein Zulaufverfahren mit doppelt transformierten *E. coli* durchgeführt werden. Vorkulturröhrchen wurden über Nacht inkubiert und die Schüttelkolben morgens inokuliert. Nach etwa 6-7 Stunden im Zulaufverfahren wurden weiter Komplexbestandteile (Pepton und Hefeextrakt) zugegeben. Dabei erfolgte der Prozess im Schüttelkolben komplett nach Herstellervorgaben (alle Zutaten wurden vom Hersteller als Tabletten zur Verfügung gestellt, die genaue Zusammensetzung ist unbekannt), wobei nach Zugabe der weiteren Komplexbestandteile bei 30°C inkubiert wurde. Außerdem wurden hierfür Schikanenkolben an Stelle der unbewehrten Schüttelkolben eingesetzt.

Durch das Zulaufverfahren mit „EnPresso B“ Medium konnte sowohl das Wachstum von *E. coli* als auch die maximale ssDNA-Konzentration im Schnitt um mehr als das zehnfache gesteigert

werden. Dabei konnte, wie in Abbildung 5.3 gezeigt, bei verschiedenen Phagemiden eine gute Produktqualität erreicht werden.

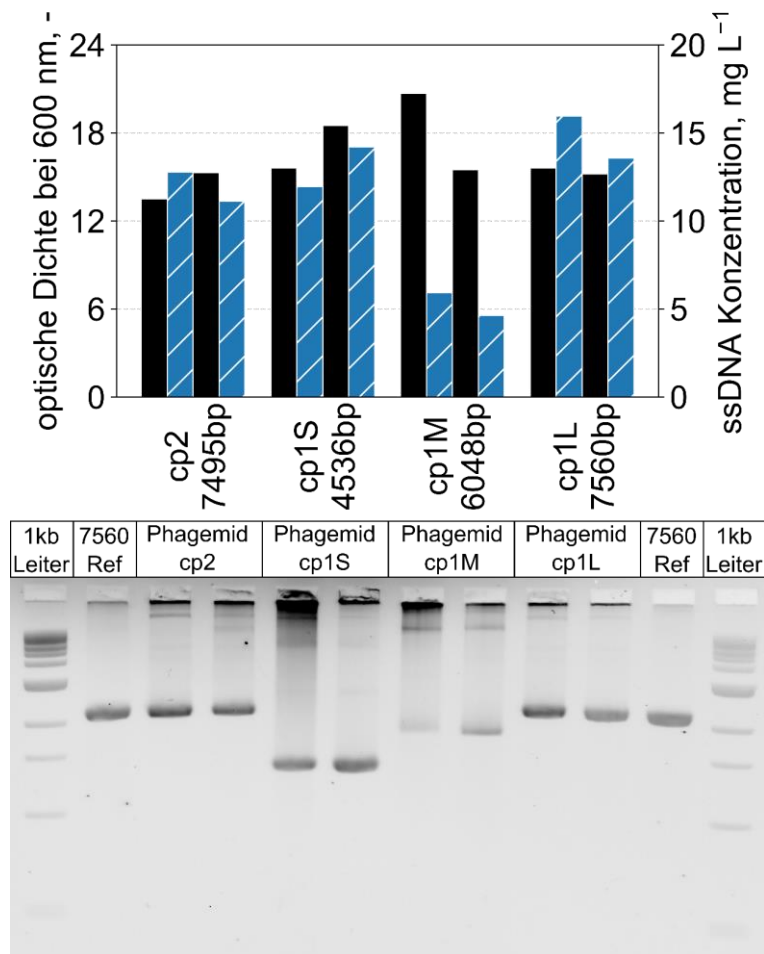


Abbildung 5.3: Kultivierung von *E. coli* JM109 doppelt transformiert mit dem Helferplasmid pfp17 und einem von 4 Phagemiden in bewehrten Schüttelkolben in dem Medium „EnPresso B“. Je Phagemid-Variante wurden zwei Kultivierungen durchgeführt. Oben: Darstellung der finalen optischen Dichte (schwarze Balken) bzw. der maximalen ssDNA Konzentration (blaue, schraffierte Balken) in Abhängigkeit der Phagemid-Variante. Unten: Agarosegelelektrophorese der produzierten ssDNA.

Ein Zulaufverfahren mit doppelt transformierten *E. coli* wurde anschließend auch im Rührkesselreaktor im Litermaßstab durchgeführt. Dabei wurde das Verfahren an die bereits etablierte Hochzelldichtekultivierung zur Herstellung von M13 Phagen angelehnt. Es wurde mit Mineralmedium nach Riesenberg gearbeitet, wobei die Komplexbestandteile des „2xYT“ Mediums zugegeben wurden, um eine Nährstofflimitierung zu vermeiden. Für die Satzphase wurden 10 g L⁻¹ Glukose vorgelegt. Da es schon für diesen Maßstab schwierig ist, ausreichend Biomasse zur Inokulation direkt aus Doppeltransformation und Vorkulturröhrchen zu gewinnen, wurden die *E. coli* zunächst in einem Satzverfahren im Schüttelkolben vermehrt. Dabei wurde bereits das Mineralmedium eingesetzt, um die Zellen an dieses zu gewöhnen.

Wie in Abbildung 5.4 gezeigt, endete die Satzphase bereits nach etwa 6 Stunden. Im Anschluss wurde ein Zulauf mit exponentiellem Profil gestartet, um die Wachstumsrate auf

$\mu = 0,15 \text{ h}^{-1}$ einzustellen. Diese Wachstumsgeschwindigkeit wurde allerdings nicht erreicht. Stattdessen geht aus den Daten hervor, dass nach weiteren 6 Stunden Glukose im Reaktormedium akkumulierte. Es kann auch erkannt werden, dass bereits nach Ende der Satzphase Acetat akkumulierte und dessen Konzentration im folgenden Prozessverlauf bis auf $14,6 \text{ g L}^{-1}$ stieg. Durch das sehr geringe Wachstum wurde eine Glukosekonzentration im Medium von rund 175 g L^{-1} nach etwa 20 Stunden im Zulaufbetrieb erreicht.

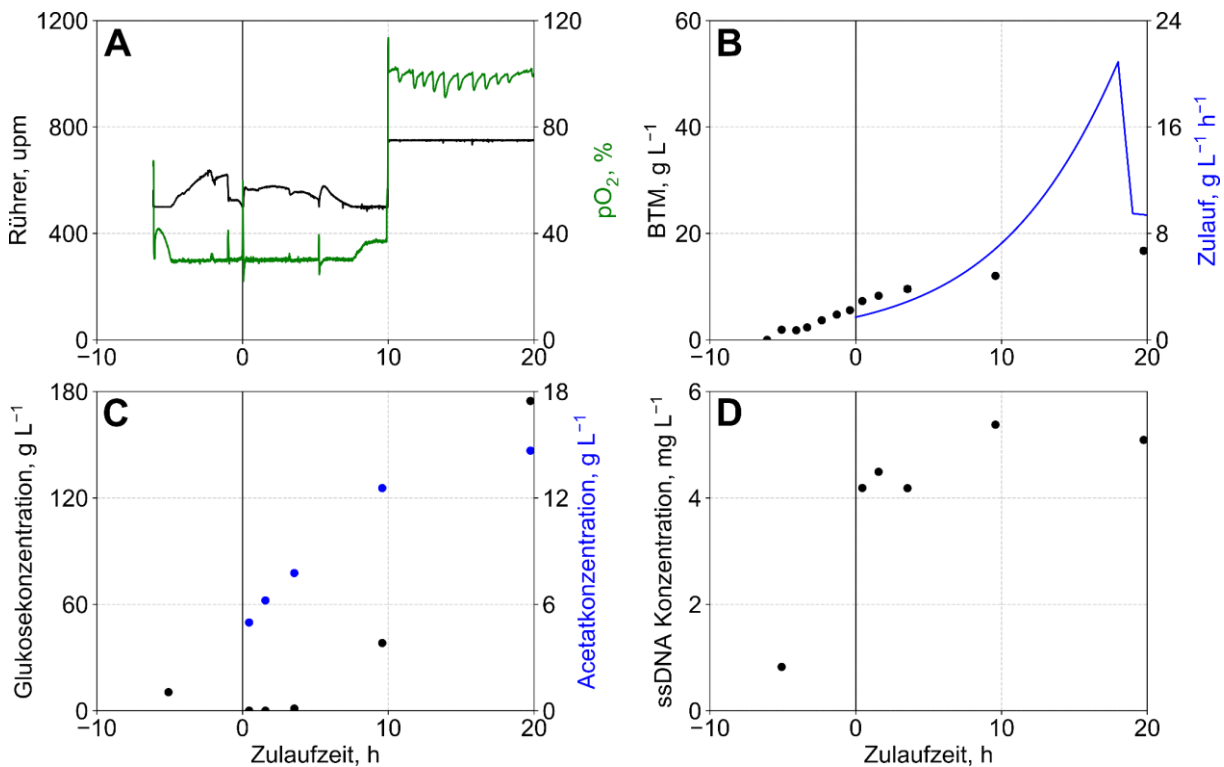


Abbildung 5.4: Zulaufkultivierung von *E. coli* JM109 im Rührkesselreaktor. Der Stamm ist doppelt transformiert mit Helferplasmid p_{fhp17} und Phagemid cp2. Dargestellt sind ausgewählte Prozessparameter gegen die Zeit nach Start des Zulaufs (**A**: Rührergeschwindigkeit, schwarze Linie; Gelöstsauerstoffkonzentration, grüne Linie / **B**: Biotrockenmassekonzentration, schwarze Punkte; Zulaufmassenstrom, blaue Linie / **C**: Glukosekonzentration im Reaktormedium, schwarze Punkte; Acetatkonzentration im Reaktormedium, blaue Punkte / **D**: ssDNA Konzentration im Reaktormedium nach Isolation der ssDNA aus den gebildeten Phagemidpartikeln).

Trotz des schlechten Wachstums kann in Abbildung 5.4 die Bildung einer geringen Menge an ssDNA über den Prozess erkannt werden. Dabei stieg die ssDNA Konzentration während der Satzphase an, bleibt allerdings in der Zulaufphase nahezu konstant.

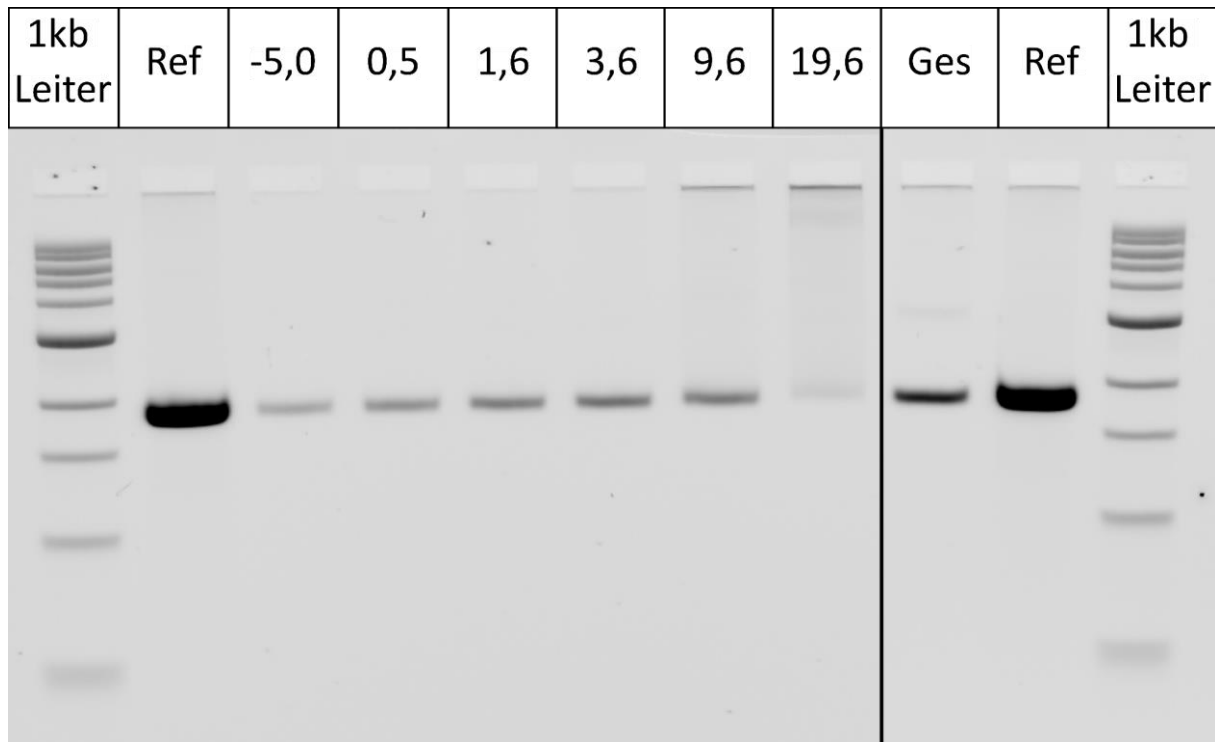


Abbildung 5.5: Agarosegelelektrophorese (AGEP) der ssDNA aus Proben aus der Zulaufkultivierung im Rührkesselreaktor. Die Referenz entspricht der ssDNA von cp2, dem Phagemid, das produziert werden sollte. Die Spuren im Kultivierungsverlauf (beschriftet mit der jeweiligen Zulaufzeit in Stunden) zeigen, dass die produzierte ssDNA die gleiche Laufweite erzielt wie die Referenz. Auch bei Reinigung des gesamten Reaktorvolumens nach Beendigung der Kultivierung (Ges) wird eine einzelne, saubere ssDNA-Spezies erhalten, die die gleiche Laufweite wie die Referenz aufweist. Bei dem Gelbild wurde der Kontrast gleich über das ganze Bild eingestellt, hier unwichtige Gelspuren wurden allerdings ausgeschnitten und das Gel wieder ohne Verschieben der Spuren zusammengesetzt. Die Schnitte sind durch schwarze Linien markiert.

Die maximal erreichte ssDNA Konzentration ist mit $5,4 \text{ mg L}^{-1}$ ähnlich wie bei einer Satzkultivierung mit dem Medium „2xYT“. In Abbildung 5.5 kann erkannt werden, dass in einer Agarosegelelektrophorese die gebildete ssDNA eine einzelne saubere Bande ohne nennenswerte Nebenprodukte bildet. Zum Ende des Prozesses ist erkennbar, dass der Anteil an Verunreinigungen zunimmt, da bei Auftrag der gleichen Menge an ssDNA die Intensität der Bande nachlässt. Bei Aufreinigung des gesamten Reaktorvolumens am Ende der Kultivierung kann die ssDNA allerdings auch wieder sauber gewonnen werden.

Diskussion

Die Herstellung von ssDNA mit Hilfe von doppelt transformierten *E. coli* in einem Satzprozess in Schüttelkolben sollte zeigen, dass bereits publizierte Ergebnisse reproduziert werden können. Dabei wurde gezeigt, dass die Kombination aus *E. coli* JM109 und verschiedenen Helferplasmiden beziehungsweise Phagemiden, die in diese Arbeit verwendet wurden, vergleichbare Ergebnisse liefert. Die hier beispielhaft gezeigten maximalen Produktkonzentrationen zwischen $0,66$ und $1,76 \text{ mg L}^{-1}$ sind mit den in der Literatur beschriebenen Konzentrationen vergleichbar (Chasteen *et al.*, 2006; Shepherd *et al.*, 2019). So konnte ein

Ausgangspunkt für alle weiteren Experimente und für verschiedene Helferplasmid- sowie Phagemid-Varianten geschaffen werden.

In einem Satzverfahren in einem Rührkesselreaktor konnte gezeigt werden, dass auch mit geringer Inokulationsdichte erfolgreich ssDNA hergestellt werden konnte. Dabei wurden mehrere Kolonien doppelt transformierter *E. coli* zur Inokulation verwendet und so eine ssDNA-Konzentration von $8,85 \text{ mg L}^{-1}$ erreicht. Diese lag sogar höher als in der Literatur für Satzprozesse im Rührkesselreaktor beschrieben (Shepherd *et al.*, 2019). In dem in dieser Arbeit gezeigten Prozess wurde die Zahl der Generationen zwischen Transformation und Produktion im Rührkesselreaktor geringgehalten, indem die *E. coli* Zellen direkt nach Anzucht in Vorkulturröhrchen eingesetzt wurden und nicht zusätzlich in einem Satzprozess in Schüttelkolben vermehrt wurden. Da *E. coli*, infiziert mit M13 Phagen, nach einer gewissen Anzahl an Generationen die Produktion neuer Phagen einstellt (Smeal *et al.*, 2017a, 2017b), war die Generationszahl hier ein wichtiges Kriterium für die Übertragung von Schüttelkolben in der Rührkesselreaktor.

Auch die Herstellung von ssDNA mit Hilfe eines Zulaufverfahrens wurde untersucht. Dabei wurde in Schüttelkolben das Medium „EnPresso B“ eingesetzt, welches einen Zulauf simuliert, indem Glukose aus einem Glukose-Polysaccharid freigesetzt wird. Hier konnte auch wieder die Zahl an Generationen zwischen Transformation und Produktion geringgehalten werden. Gleichzeitig wurde das Wachstum von *E. coli* in dem Zulaufprozess deutlich verbessert, verglichen zu den Satzprozessen in Schüttelkolben. Bei gleicher Kombination aus Helferplasmid und Phagemid wurde die finale optischen Dichte von $OD_{600} = 1,3$ auf $OD_{600} = 13,5$ erhöht. Genauso konnte die maximale ssDNA-Konzentration von $1,76 \text{ mg L}^{-1}$ auf bis zu $12,77 \text{ mg L}^{-1}$ gesteigert werden. Demnach kann die Produktmenge durch die Prozessführung mit Zulauf grundsätzlich gesteigert werden.

Mit einem Zulaufverfahren im Rührkesselreaktor war das Ziel die maximale ssDNA-Konzentration weiter zu steigern. Dazu wurde der Prozess so vorbereitet, dass Hochzelldichtekultivierung ermöglicht wird. Der Prozess wurde auch so angelegt, dass eine spätere Maßstabsübertragung in einen größeren Maßstab möglich wäre. Deshalb wurden die *E. coli* nach der Doppeltransformation zunächst in einem Satzverfahren in Schüttelkolben vermehrt, um ausreichend Biomasse für die Inokulation zu erhalten. Dieser Schritt ist bei einem größeren Maßstab notwendig, da es technisch sehr schwierig ist, die große Anzahl an doppelt transformierten Kolonien zur Verfügung zu stellen, die für die Inokulation notwendig wären.

In diesem Prozess konnte allerdings nur schlechtes Wachstum in der Zulaufphase verzeichnet werden. Trotz der bewusst niedrig eingestellten Wachstumsrate von $\mu_{\text{set}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ ist hier eine deutliche Akkumulation von Acetat zu erkennen. Die daraus hervorgehende Wachstumsinhibierung sorgte auch dafür, dass etwa 6 Stunden nach Zulaufstart Glukose stark

akkumulierte. Da Acetat bereits ab 2 g L^{-1} inhibierend auf Wachstum und Bildung rekombinanter Proteine wirkt (Shiloach & Fass, 2005), könnte die Akkumulation von Acetat für das schlechte Wachstum sowie die geringe maximale ssDNA-Konzentration verantwortlich gewesen sein.

Auch wenn eine geringe ssDNA-Bildung gezeigt werden konnte, liegt diese doch kaum über der in einfachen Schüttelkolbenkultivierungen. Sie ist dabei schlechter als die Produktion im Rührkesselreaktor in einem reinen Satzprozess. Für M13 Phagen konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass die Produktion dieser zwar wachstumsassoziiert stattfindet, nicht aber an die Wachstumsrate gekoppelt ist (Kick, Behler, *et al.*, 2017). Bei dem Zulaufprozess sollte demnach angesichts der höheren absoluten Biomassekonzentration auch eine höhere Produktkonzentration erzielt werden. Hier könnte auch die Anzahl an Generationen zwischen Transformation und Produktion zu dem Einbruch der Produktion in der Satzphase führen. Laut Smeal *et al.* (2017b) endet die Phagen-Produktion bereits nach 10 Generationen fast vollständig. Die Satzkultivierung in einem Schüttelkolben, die hier zur Vermehrung der *E. coli* für die Inokulation, durchgeführt wurde, umfasst bereits rund 5 Generationen, was aus der Zunahme der Biomasse berechnet werden kann. Allein während der Satzphase der anschließenden Zulaufkultivierung wurden dann weitere rund 6 Generationen erreicht. Im Vergleich dazu umfasste die reine Satzkultivierung im Rührkesselreaktor ohne Vorkultur insgesamt rund 10 Generationen. Die Ergebnisse zeigen, dass höhere ssDNA-Konzentrationen erreicht werden können, wenn alle dieser 10 Generationen auch tatsächlich zur Produktbildung genutzt werden. Es liegt also nahe, dass während einer Satzkultivierung, die ohne zusätzliche Vorkulturstufe auskommt mehr ssDNA gebildet wird, als in einem Zulaufverfahren, für das eine Vorkultur im Satzverfahren in einem Schüttelkolben angelegt werden muss. Auch wenn bei dem Zulaufverfahren lediglich weitere rund zwei Generationen nach Zulaufstart erreicht werden, werden keine neuen Phagemidpartikel gebildet. Es könnte also sein, dass im eigentlichen Produktionsprozess nur noch wenig oder sogar keine ssDNA mehr produziert werden kann, wenn zu viele Generationen nur der Vermehrung der Zellen dienen, um ausreichend Biomasse zur Inokulation zu erhalten.

Unklar ist lediglich, warum die *E. coli* Zellen nicht schon vorher die Produktion einstellen, da bereits zwischen der einzelnen doppelt transformierten Zelle und der Kolonie auf der Agarplatte einige Generationen durchschritten werden.

5.2 Trennung von Biomasse- und Produktbildung durch induzierbare Helferplasmide

Um das Maximum an produktiven Generationen nutzen zu können, muss die Bildung von Biomasse und die Produktion neuer Phagemidpartikel getrennt werden.

Dementsprechend wurden Helferplasmide entwickelt, die es ermöglichen, alle Gene des M13 Phagen durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zu induzieren. Da allerdings das Genom des M13 Phagen stark kondensiert ist, wodurch sich die kodierenden Sequenzen einiger Gene aber auch deren Promotoren überschneiden, musste hier zunächst ein Helferplasmid entworfen werden, welches alle Gene des Phagen einzeln enthält. Dafür wurden die Gensequenzen sowie die Sequenzen aller regulatorischen Einheiten genau annotiert und vereinzelt aufgereiht. Die neue Sequenz, die dadurch entstand, wurde in Abschnitten durch die Firma Integrated DNA Technologies (IDT) synthetisiert. Anschließend wurden die Abschnitte zu einem Helferplasmid zusammengesetzt.

Das in Abbildung 5.6 gezeigte Helferplasmid ist damit allerdings noch nicht induzierbar. Hiermit wurde lediglich untersucht, inwieweit die vorgenommenen Veränderungen die Funktion des Helferplasmids beeinträchtigen.

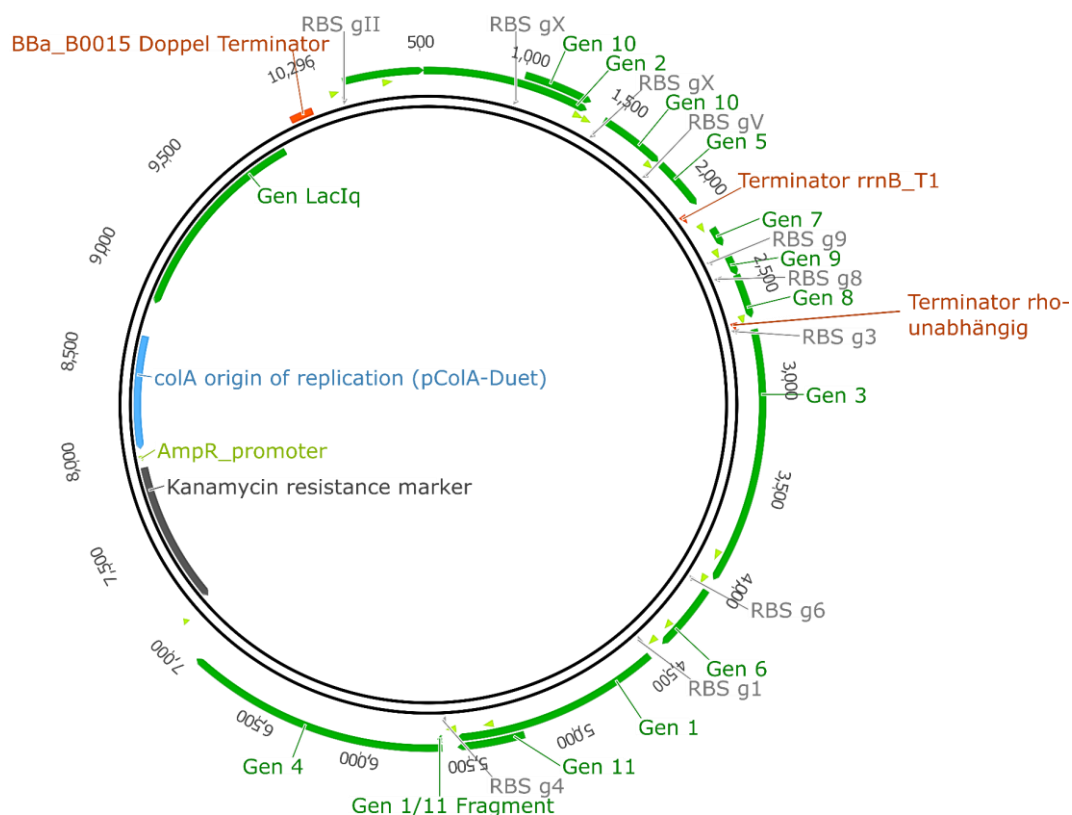


Abbildung 5.6: Plasmidkarte des Helferplasmids mit sortiertem M13 Genom. Die hellgrünen Pfeile ohne Beschriftung stellen die Promotoren dar. Helferplasmide pfhp13 und pfhp14 teilen den gleichen Aufbau, wobei pfhp13 die Gene des Phagen M13mp18 enthält, während pfhp14 die Gene des Phagen M13KO7 enthält.

Damit im Anschluss alle Gene induzierbar sind, wurde dann ein weiteres Helferplasmid entworfen, synthetisiert und zusammengesetzt, welches nach jedem Promotor eine doppelte Repressorbindestelle des Lac-Operator-Systems enthielt (Abbildung 5.7). Es war angedacht, durch Verwendung von zwei Lac-Operatoren die Basalexpression, die im Lac-Operon üblich ist, zu unterbinden. Durch das zuvor sortierte Design, bei dem alle Gene tatsächlich einzeln vorliegen, konnte jeder Promotor mit Lac-Repressor-Bindestellen ausgestattet werden. Die Promotoren, die zuvor innerhalb einer kodierenden Sequenz eines der Gene lagen, wurden einzeln neu in die Sequenz integriert, so dass die Lac-Operatoren nicht die jeweilige kodierende Sequenz zerstören. Gleichzeitig wurden die Promotoren innerhalb der Gensequenzen durch Kodonoptimierung so weit verändert, dass sie dem Konsensus für *E. coli* Promotoren so wenig wie möglich entsprachen.

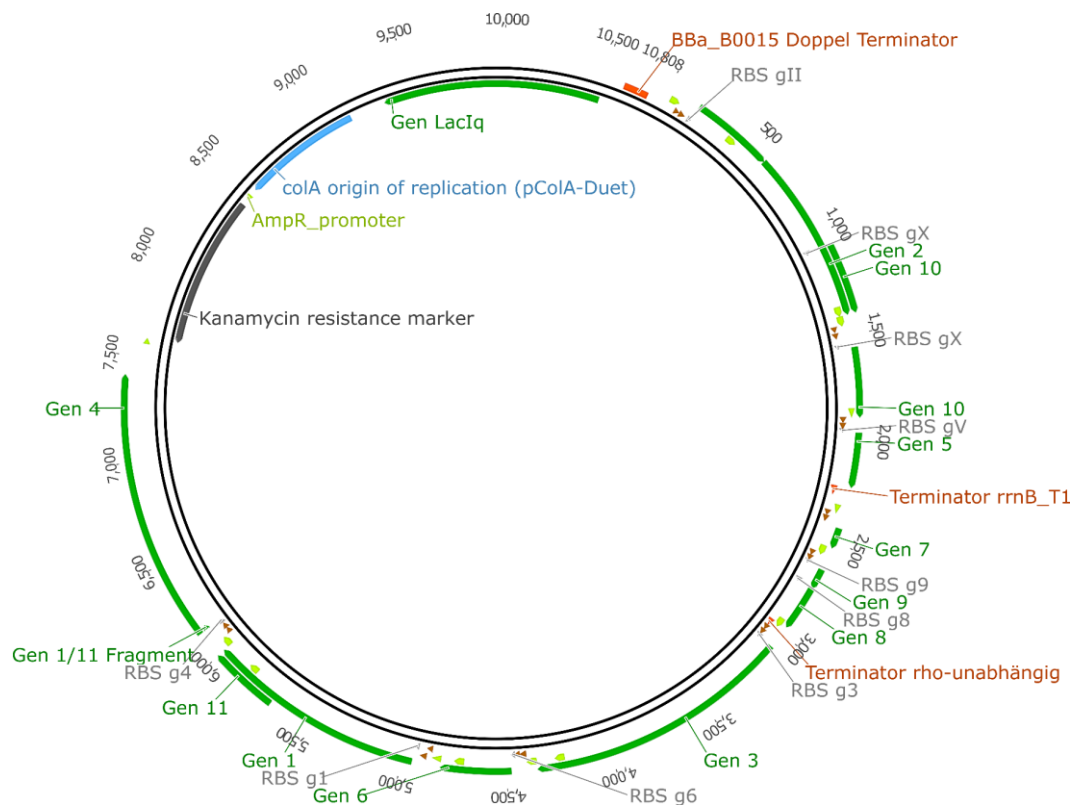


Abbildung 5.7: Plasmidkarte des Helferplasmids mit sortiertem, induzierbarem M13 Genom. Die hellgrünen Pfeile ohne Beschriftung stellen die Promotoren dar, die hellbraunen Pfeile ohne Beschriftung die doppelten Lac-Repressor Bindestellen. Helferplasmide pfh15 und pfh16 teilen den gleichen Aufbau, wobei pfh15 die Gene des Phagen M13mp18 enthält, während pfh16 die Gene des Phagen M13KO7 enthält.

Auf Grundlage dieser beiden Designs wurden insgesamt vier Helferplasmide erstellt. Jeweils einer auf Basis des Genoms von M13mp18 und einer auf Basis des Genoms von M13KO7. Dabei konnte pfh14, die nicht induzierbare Variante auf Basis von M13KO7, nicht erfolgreich zusammengesetzt werden. Alle anderen wurden erstellt und mittels Sequenzierung auf korrekten Aufbau geprüft.

Anschließend wurden zunächst Satzkultivierungen in Schüttelkolben durchgeführt, wobei mit doppelt transformierten *E. coli* gearbeitet wurde. Die Zellen waren mit jeweils einem

Helferplasmid und dem Phagemid cp2 transformiert. Dabei wurde zu den entsprechenden Kulturen, die einen der beiden induzierbaren Helferplasmide nutzten, 100mM IPTG zugegeben, sobald eine optische Dichte von $OD_{600} = 0,4$ erreicht war. Bei Ende des Satzverfahrens wurde aus allen Reaktionsüberständen die ssDNA isoliert und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 5.8 dargestellt, dass mit keiner der hergestellten Helferplasmidvarianten ssDNA hergestellt werden konnte. Dieses Ergebnis konnte auch mit dem Phagemid cp3 reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

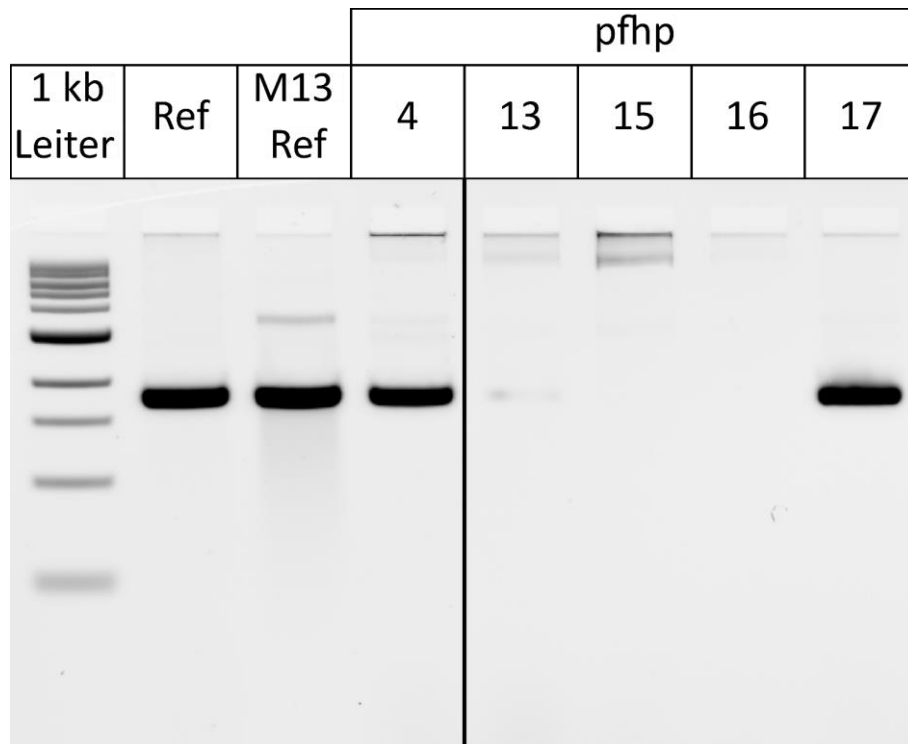


Abbildung 5.8: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus verschiedenen Schüttelkolbenkultivierungen mit doppelt transformierten *E. coli* JM109 in „2xYT“ Medium. Die Zellen waren transformiert mit einem der angegebenen Helferplasmide und dem Phagemid cp2. Die erste Referenz (Ref) von links ist die ssDNA des Phagemids cp1L, die zweite Referenz ist M13mp18 ssDNA mit einer Länge von 7560 Basen. Die beiden Referenzen haben damit nahezu die gleiche Länge, die auch der Länge des produzierten Phagemids cp2 entspricht. Bei dem Gelbild wurde der Kontrast gleich über das ganze Bild eingestellt, hier unwichtige Gelspuren wurden allerdings ausgeschnitten und das Gel wieder ohne Verschieben der Spuren zusammengesetzt. Die Schnitte sind durch schwarze Linien markiert.

Um zu untersuchen, weshalb keine ssDNA gebildet wurde, wurden weitere Helferplasmide erstellt. Dazu wurden einzelne Untereinheiten des Helferplasmids pfhp16 in den Helferplasmid 17 eingebaut, wobei die entsprechenden Gene in pfhp17 ausgetauscht wurden. Dabei wurden drei Untereinheiten gebildet. Die erste mit den Genen 2, 10 und 5 die zweite mit den Genen 7, 9, 8, 3, und 6 und die dritte mit den Genen 1, 11 und 4. Die resultierenden Helferplasmide waren pfhp18, pfhp19 und pfhp20. Die entsprechenden Satzverfahren in Schüttelkolben wurden anschließend ergänzt. Dabei wurde wie zuvor vorgegangen. Es zeigte sich, wie in Abbildung 5.9 dargestellt, dass nur mit Helferplasmid pfhp20 ssDNA gebildet werden konnte.

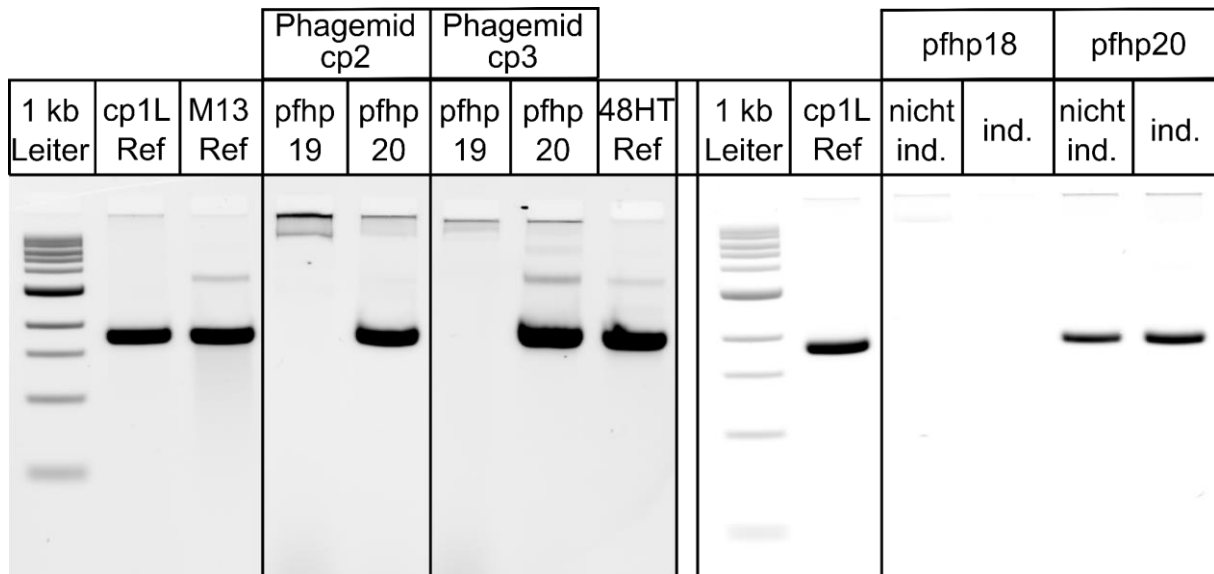


Abbildung 5.9: Agarosegelelektrophoresen der ssDNA aus verschiedenen Satzprozessen im Schüttelkolben mit doppelt transformierten *E. coli* JM109 in „2xYT“ Medium. Dargestellt sind zwei Gelbilder nebeneinander, getrennt durch einen Doppelstrich. Im linken Gelbild waren die Zellen transformiert mit einem der angegebenen Helferplasmide und entweder dem Phagemid cp2 oder cp3. Alle Kulturen wurden hier mit IPTG induziert. Die erste Referenz (Ref) von links ist die ssDNA des Phagemids cp1L, die zweite Referenz ist M13mp18 ssDNA mit einer Länge von 7560 Basen. Die beiden Referenzen haben damit die gleiche Länge, die auch nahezu der Länge des produzierten Phagemids cp2 entspricht. Die letzte Referenz in diesem Gelbild in der Spur ganz rechts entspricht der ssDNA des Phagemids cp3. Im rechten Gelbild wurden die Zellen mit einem der angegebenen Helferplasmide und jeweils dem Phagemid cp2 transformiert. Hier wurde jeweils eine Kultivierung mit IPTG induziert (ind.) und eine nicht induziert (nicht ind.). Die Referenz hier ist wieder cp1L. Bei beiden Gelbildern wurde der Kontrast jeweils gleich über das ganze Bild eingestellt, hier unwichtige Gelspuren wurden allerdings ausgeschnitten und das Gel wieder ohne Verschieben der Spuren zusammengesetzt. Die Schnitte sind durch schwarze Linien markiert.

Dabei wurde die ssDNA allerdings auch gebildet, wenn die Expression der Gene 4, 1 und 11 nicht mittels IPTG induziert wurde.

Diskussion

Das Erstellen voll induzierbarer Helferplasmide ist im Fall von M13 nicht trivial, da das Genom sehr stark kondensiert ist und somit sowohl die kodierenden Sequenzen von einzelnen Genen überlappen als auch einige regulatorische Sequenzen wie Promotoren in die kodierenden Sequenzen von Genen fallen. Klassischerweise wird die Genregulierung durch die Verwendung eines Promotors, der unter Regulation durch den Lac-Operator steht, ermöglicht (Lewis, 2005). Das grundsätzliche Konzept des Lac-Operator-Systems wurde hier auch genutzt. Dazu mussten alle Promotoren, die in dem M13 Genom liegen (van Wezenbeek *et al.*, 1980), so separiert werden, dass das Ergänzen von Lac-Repressor-Bindestellen möglich ist, ohne dabei die kodierenden Sequenzen einzelner Gene zu beschädigen. Auch wenn das *in silico* erfolgreich so umgesetzt werden konnte, dass alle Gene vereinzelt vorliegen und in den entsprechenden Helferplasmiden alle Promotoren unter der Kontrolle eines Lac-Operators standen, zeigen die Ergebnisse, dass die eingeführten Veränderungen zu einem kompletten Funktionsverlust der Helferplasmide führte.

Die Helferplasmide wurden in drei Abschnitte aufgeteilt, die dabei helfen sollten, zu erkennen wodurch der Funktionsverlust bedingt ist. Dadurch, dass dabei allerdings zwei der drei erstellten Helferplasmide (pfhp18 und pfhp19) wiederum einen kompletten Funktionsverlust aufwiesen, konnte die Ursache nicht genauer eingegrenzt werden. Das Helferplasmid, welches die induzierbaren Gene zur Assemblierung neuer Phagemidpartikel enthielt (pfhp20), zeigte zwar wiederum die Produktion von ssDNA und damit auch neuer Phagemidpartikel, allerdings unabhängig von der Zugabe des Induktionsmittels IPTG. Die erwünschte Möglichkeit einer Genregulation war hier also nicht möglich. Das ist unerwartet, nachdem in dem Design der regulierbaren Promotoren je Promotor zwei Lac-Repressor-Bindestellen vorgesehen waren, um auch die geringfügige Expression, für die der Lac-Operator bekannt ist, zu vermeiden. Dabei wurden die Lac-Repressor-Bindestellen so designt, dass sie der Konsensus-Sequenz des Lac-Operators entsprechen, ohne dass dabei immer die exakt gleiche Sequenz genutzt werden muss (Sadler *et al.*, 1983; Simons *et al.*, 1984). Scheinbar war dies jedoch nicht ausreichend, sodass dennoch eine gewisse Genexpression vorlag. Dies könnte möglicherweise mit der vorliegenden Anzahl an Lac-Repressor-Molekülen liegen. Auch wenn hier bereits die Variante des Gens (LacI^q) genutzt wurde, die eine erhöhte Anzahl an Repressormolekülen zur Verfügung stellt, könnte dennoch die absolute Anzahl zu gering gewesen sein, um alle Promotoren gleichzeitig vollständig zu reprimieren.

Die Experimente haben gezeigt, dass der Aufbau des M13 Genoms nicht einfach gänzlich verändert werden kann, ohne dabei wichtige Funktionalitäten zu verändern. Demnach erschien der zunächst gewählte Ansatz alle Gene des M13 Phagen zu regulieren nicht zielführend.

6 Phagen-freie Herstellung von ssDNA mit „Reverser Infektion“¹

Bei der „Reversen Infektion“ werden *E. coli*, die mit einem Helferplasmid transformiert wurden mit Phagemidpartikeln infiziert. Dieses Vorgehen stellt den zweiten Ansatz zur Trennung von Biomasse- und Produktbildung in dieser Arbeit dar. Die Experimente erfolgten in verschiedenen Reaktionssystemen von Schüttelkoben bis hin zum Rührkesselbioreaktor im Pilotmaßstab.

6.1 Auswirkung einzelner M13 Gene auf die Infektionsresistenz

Es ist bekannt, dass *E. coli*, die bereits von einem M13 Phagen infiziert wurden kein weiteres Mal infiziert werden können. Diese Infektionsresistenz kann auch beobachtet werden, wenn *E. coli* mit einem Helferplasmid transformiert wurde. Da für die „Reverse Infektion“ allerdings eine Infektion mit Phagemidpartikeln notwendig ist, musste die Ursache der Infektionsresistenz erkannt werden, um diese vermeiden zu können.

Hierzu wurden Vektoren konstruiert, die jeweils eines oder zwei Gene des M13 Phagen enthalten. Nach Transformation von *E. coli* mit einem der Vektoren werden demnach ein oder zwei M13 Proteine exprimiert. Es wurden *E. coli* im Satzverfahren im Schüttelkolben kultiviert, wobei sie jeweils mit je einem der Vektoren transformiert waren. Nach Erreichen einer optischen Dichte $OD_{600} = 0,4$ wurden M13 Phagen zugegeben. Die zugrundeliegende Hypothese war, dass wenn die Phagen die Zellen infizieren können, so werden auch neue Phagen gebildet und deren ssDNA kann wiederum isoliert werden.

Für das Design des Vektors wurde das Plasmidrückgrat pColA des Helferplasmids pFhp12 genutzt. Es enthält den Replikationsursprung ColA sowie einen Kanamycinresistenzmarker. Der Resistenzmarker liegt dabei auf dem (-)-Strang der Plasmid-DNA. Dem Plasmidrückgrat wurden vorgefertigte Sequenzmotive mit bekannter Funktion (aus der iGEM Bibliothek) hinzugefügt: Ein auf dem (+)-Strang der Plasmid-DNA liegender Promotor, der durch den Lac-Operator reguliert werden kann (iGEM Nummer: BBa_R0010) sowie entsprechend dazu ausgerichtet eine Ribosombindestelle, die für hohe Translationsinitiation bekannt ist (iGEM Nummer: BBa_B0034). Außerdem wurde flussabwärts der Einheit von Promotor und Ribosombindestelle ein Transkriptionsterminator eingefügt (iGEM Nummer: BBa_B0015). Dieser Terminator hat die Eigenschaft, die Transkription in plus und minus Richtung auf der

¹ Teile dieses Kapitels sind publiziert in: Behler K, Honemann MN, Santos A-R, Dietz H, Weuster-Botz D (2022): Phage-free production of artificial ssDNA with *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* **119**: 2878-2889.

DNA abubrechen. Dadurch soll vermieden werden, dass es zu sogenanntem *read through* kommt.

Der Aufbau dieses Plasmids, dargestellt in Abbildung 6.1, erlaubt den Einbau von kodierenden Sequenzen zwischen der Ribosombindestelle und dem Terminator.

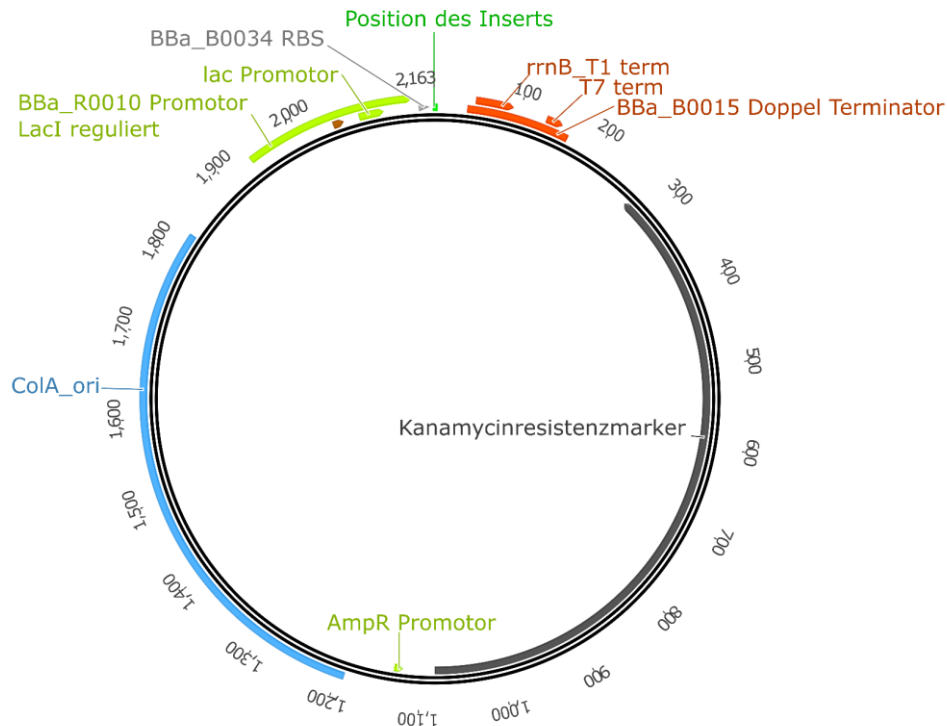


Abbildung 6.1: Plasmidkarte von pColA vorbereitet für das Einfügen einzelner kodierender Sequenzen der M13 Gene. Die Kodierenden Sequenzen können, ohne jegliche zusätzliche regulatorische Sequenzen, an der Position des Inserts zwischen Lac Promotor und Doppelterminator eingefügt werden.

Die so mittels *Gibson-assembly* (Gibson *et al.*, 2009) eingefügte kodierende Sequenz eines der M13 Gene steht nach Einbau unter Kontrolle durch den Lac-Promotor, der wiederum durch Zugabe von IPTG induziert werden muss.

Dabei wurden alle Phagengene außer 1, 2, 10 und 11 einzeln eingesetzt. Die Gene 2 und 10 sowie 1 und 11 teilen ihre kodierende Sequenz komplett, wodurch sie nicht sinnvoll getrennt werden können.

Um später zusätzlich unterscheiden zu können, ob eines der M13 Gene eine Infektionsresistenz hervorruft oder verhindert, dass neue M13 Phagen gebildet werden, wurde eine Variante von M13mp18 erstellt, die eine Expressionskassette für das rot fluoreszierende Protein (RFP) enthält. So wurde unterschieden, ob Zellen nur keine neuen Phagen produzieren oder auch kein Fluoreszenzprotein. Dieser Phage wird im Folgenden M13mp18RFP genannt.

Zur Untersuchung der Effekte der einzelnen M13 Gene auf die Produktion neuer M13 Phagen wurden anschließend *E. coli* JM109 mit je einem der Plasmide transformiert. Von jedem dieser Stämme wurde eine Kryokultur angelegt und nachdem alle Stämme vorlagen, wurden parallele Schüttelkolbenexperimente durchgeführt. Dabei wurde in „2xYT“ Medium in bewehrten Schüttelkolben gearbeitet. Die Kulturen wurden mit je einem Milliliter Kryokultur inokuliert und bei 37°C und 250 upm inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,2$ wurden in den entsprechenden Kulturen die Genexpression durch Zugabe von 100 mM IPTG induziert. Etwa eine Stunde später, nach Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,4$ wurden alle Kulturen mit dem M13mp18RFP Phagen infiziert. Nach Inkubation über Nacht wurde die Fluoreszenz der Kulturen gemessen und die ssDNA aus dem Kultivierungsüberstand isoliert.

Wie in Abbildung 6.2 zu sehen ist, wurde in allen Schüttelkolben eine vergleichbare Zelldichte erreicht. Es traten allerdings teilweise große Unterschiede in Fluoreszenz und ssDNA Konzentration auf. Die Fluoreszenzwerte wurden dabei zur Vergleichbarkeit auf die Fluoreszenzintensität der Positivkontrolle normiert. Bei den Genen für die Ausbildung der Phagen-assemblierenden Membranpore konnte kein negativer Effekt auf die Infizierbarkeit der Zellen oder auf die ssDNA Produktion beobachtet werden. Hier ist eine leichte Erhöhung der ssDNA Konzentration bei zusätzlicher Expression der Gene zu verzeichnen. Die maximale Konzentration ist allerdings nicht nennenswert höher als bei der Positivkontrolle. Ähnlich bei der Kombination aus Gen 2 und 10, den Genen für die intrazelluläre ssDNA Produktion. Hier ist kein negativer Effekt zu beobachten, allerdings ist die maximale ssDNA Konzentration bei zusätzlicher Expression der Gene merklich erhöht. Bei den meisten Genen für das Phagen-Kapsid ist weder ein negativer noch ein positiver Effekt durch die Expression der Gene auf dem eingeführten Plasmid zu verzeichnen. Eine Ausnahme bildet hier Gen 3. Bei Gen 3 kann, nachdem die Expression bereits vor der Infektion stattgefunden hat, keine weitere Bildung von Phagen in Form von isolierbarer ssDNA gemessen werden. Ebenso ist hier eine Fluoreszenz der Kultur quasi nicht vorhanden. Wird das Gen 3 nur über das Plasmid in die Zelle eingebracht, ohne dabei exprimiert zu werden, liegt die Fluoreszenz und die gemessene ssDNA Konzentration auch niedriger als bei der Positivkontrolle. Ähnlich verhält es sich mit Gen 5, dessen Produkt die ssDNA intrazellulär schützt, so dass sie nicht zu dsDNA ergänzt wird. Hier kann auch weder Produkt ssDNA noch Fluoreszenz nachgewiesen werden, wenn die Expression vor der Infektion induziert wurde.

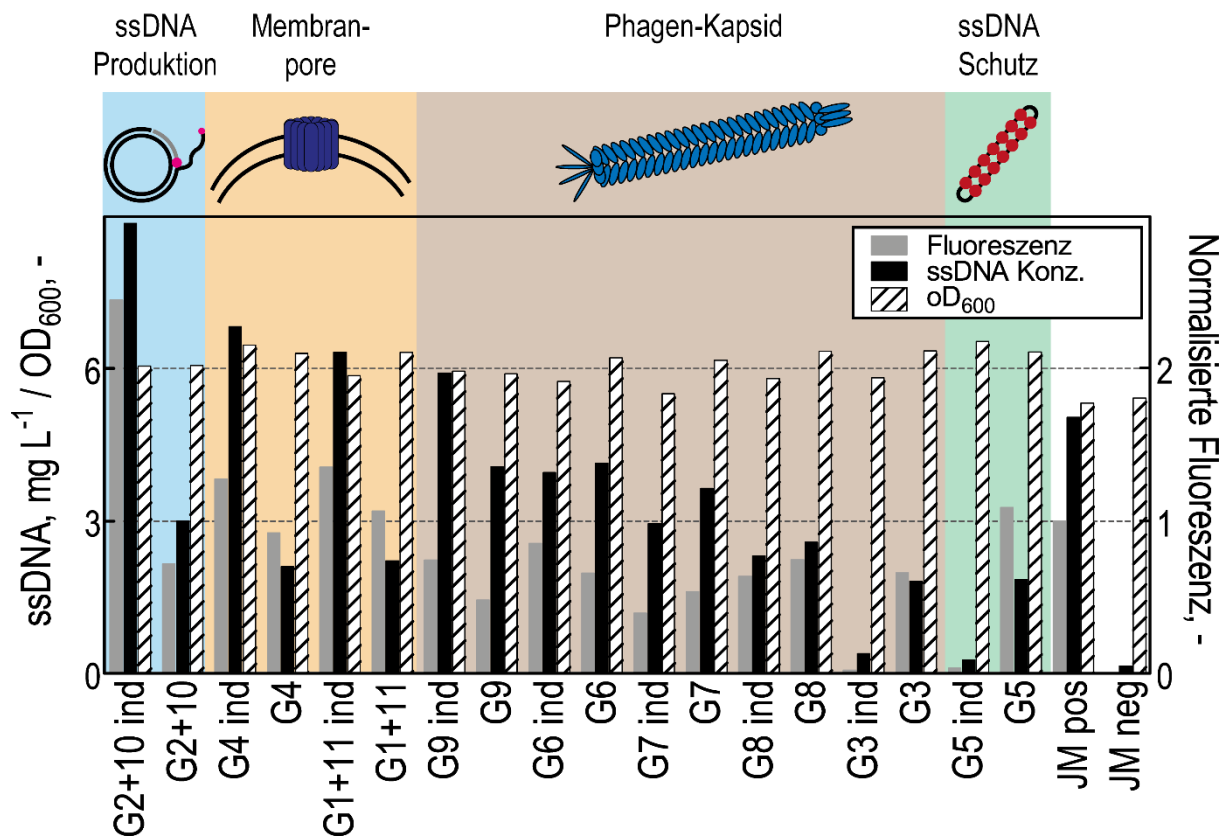


Abbildung 6.2: Analyse der Infektionsresistenz von *E. coli* JM109 transformiert mit je einem Plasmid, welches wiederum die Expression von je einem M13 Gen ermöglicht. Gezeigt werden Daten aus mehreren Schüttelkolbenkultivierungen mit Infektion durch M13mp18RFP. Die Beschriftung der Balken-Gruppen gibt das jeweilige M13 Gen an sowie den Unterschied zwischen Kulturen bei denen die Expression induziert wurde (ind.) oder nicht. Daten der induzierten Versuche sind Mittelwerte aus je zwei Schüttelkolbenkultivierungen. JM pos ist die Positivkontrolle von *E. coli* JM109 Wildtyp, infiziert mit dem Phagen M13mp18RFP, JM neg die entsprechende Negativkontrolle ohne Infektion.

Für alle Schüttelkolbenkulturen wurde auch mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese nachgewiesen, dass die produzierte ssDNA der ssDNA des M13mp18RFP Phagen entspricht. In Abbildung 6.3 ist zu sehen, dass für alle Kultivierungen, in denen ssDNA gebildet wurde, auch nachgewiesen werden konnte, dass es sich um die ssDNA des eingesetzten Phagen handelt. Dabei kann hier auch nochmal deutlich erkannt werden, dass bei Expression der Gene 3 und 5 vor Infektion keine Bildung neuer Phagen nachgewiesen werden kann.

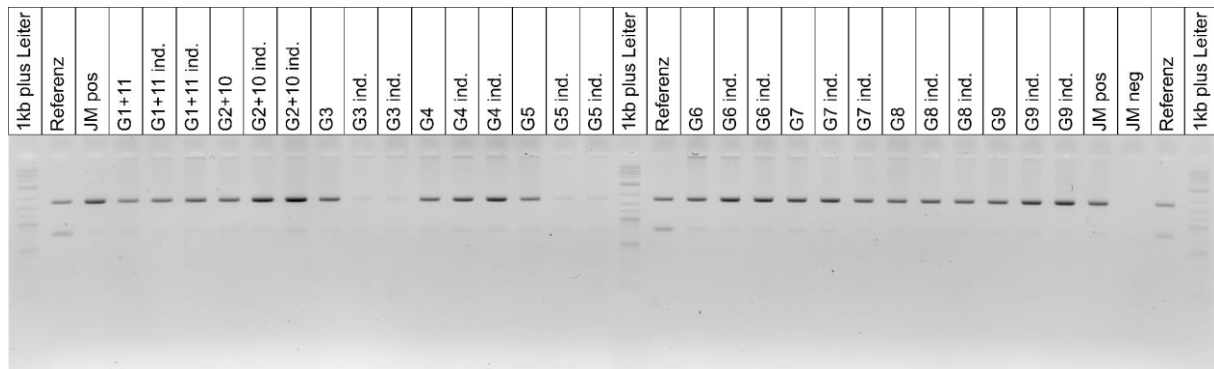


Abbildung 6.3: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus verschiedenen Schüttelkolbenkultivierungen mit *E. coli* JM109 transformiert mit einem Plasmid, welches für je ein oder zwei Gene des M13 Phagen kodiert in 2xYT Medium. Die Referenz entspricht der ssDNA des M13mp18RFP Phagen, der für die Infektion der Kulturen genutzt wurde. Die obere Bande in der Referenzspur entspricht der Phagen ssDNA. Bei der unteren handelt es sich vermutlich um eine Verunreinigung. Je nachdem welches der M13 Gene nach Induktion (ind.) exprimiert wurde, konnten die Zellen mit dem Phagen infiziert werden und neue Phagen – also ssDNA – bilden oder nicht. JM pos ist die Positivkontrolle von *E. coli* JM109 Wildtyp, infiziert mit dem Phagen M13mp18RFP, JM neg die entsprechende Negativkontrolle ohne Infektion.

Die so ermittelten Daten weisen also zunächst auf eine Infektionsresistenz bedingt durch die Gene 3 und 5 hin, wobei in diesem Versuchsaufbau beide jeweils einzeln ausreichend sind, um keine Infektion zuzulassen.

Diskussion

Nachdem die Arbeit mit vollinduzierbaren Plasmiden nicht die Möglichkeit eröffnete, Biomasse- und Produktbildung zu trennen, wurden die Effekte einzelner M13 Gene auf *E. coli* systematisch untersucht. Ziel war, die Ursache für die Infektionsresistenz, die Zellen aufweisen, welche ein Helferplasmid tragen, aufzuklären. Nur so konnte die Infektion von *E. coli*, die mit einem Helferplasmid transformiert sind, mit Phagemidpartikeln ermöglicht werden. Dies war also die Grundlage für die „Reverse Infektion“.

Die Experimente haben gezeigt, dass die meisten M13 Proteine keinen besonderen Einfluss auf die Infizierbarkeit von Zellen und auf die Produktion von ssDNA haben. Lediglich die Genkombination 2 und 10 und die Gene 3 und 5 haben einen nennenswerten Effekt. Der Effekt einer Infektionsresistenz konnte dabei für die Gene 3 und 5 beobachtet werden.

Das Produkt von Gen 3, welches genau wie das von Gen 2 im Verdacht stand, eine Infektionsresistenz hervorzurufen (G. P. Dotto *et al.*, 1981; Boeke *et al.*, 1982), ist Teil des Phagen Kapsids und zuständig für die Infektion neuer Zellen (Mai-Prochnow *et al.*, 2015). Nachdem es intrazellulär gebildet wird, lagert sich das Protein in die innere Zellmembran ein, von wo aus es dann in neu entstehende Phagen eingebaut wird (Rakonjac *et al.*, 2011). Bei der Infektion lagert es sich zunächst an ein Epitop eines F-Pilus an und bindet dann an einen Transmembrankomplex. Aus dieser Funktion heraus ist nicht klar zu sagen, wodurch es die Infektionsresistenz hervorruft. Es könnte angenommen werden, dass eine Bindung an den Transmembrankomplex TolQRA auch dann möglich ist, wenn das Protein in ausreichender

Menge in der inneren Zellmembran eingelagert ist. In dem Fall wäre auch denkbar, dass die entsprechenden Bindestellen an dem Transmembrankomplex so gesättigt sind, dass keine weitere Bindung – durch einen Phagen von außerhalb – möglich ist. Hier ist allerdings schwer zu sagen, ob die entsprechenden Domänen des Protein 3 überhaupt zugänglich sind, solange das Protein in der inneren Zellmembran eingelagert ist. Die entsprechende Domäne entfaltet im Normalfall nur dann so, dass sie auch binden kann, wenn das Protein zuvor an einen F-Pilus gebunden hat (Hoffmann-Thoms *et al.*, 2013). Der eigentliche Mechanismus der Infektionsresistenz durch Gen 3 wurde hier nicht untersucht.

Bei dem Produkt von Gen 5 hat sich zwar auch gezeigt, dass eine Infektionsresistenz hervorgerufen wird, dieser Effekt lässt sich hier jedoch über die Funktion und Häufigkeit des Proteins erklären. Protein 5 schützt die einzelsträngige DNA intrazellulär, nachdem sie gebildet wurde. Dazu bindet es an die ssDNA in einer kooperativen Art und Weise (Rakonjac *et al.*, 2011). So wird die ssDNA vor Nukleasen und vor der Ergänzung zu dsDNA geschützt. Bei Ausschleusen der ssDNA in neue Phagen wird es abgestreift und durch das Protein 8 ersetzt (Marvin *et al.*, 2014). In der Bildung der Replikativen Form des M13 Phagen reguliert es die Kopienzahl. Liegt genügend Phagen dsDNA vor, wird eine ausreichende Menge an Protein 5 produziert, wodurch die ssDNA nicht mehr zu dsDNA ergänzt, sondern als neue Phagen ausgeschleust wird. Liegt das Protein 5 in zu großer Menge vor, so kann es dazu kommen, dass nicht genügend replikative Form des Phagen gebildet wird und somit auch die Produktion von anderen essenziellen Phagenproteinen ausbleibt. Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass die produzierte Phagen-Menge aus einer Schüttelkolbenkultivierung direkt mit der Expressionsstärke von Gen 5 und damit der Menge an Protein 5 korreliert (Lee *et al.*, 2021). In dem hier eingesetzten Expressionssystem für die verschiedenen M13 Gene wurde immer dieselbe Ribosombindestelle eingesetzt. Das führt zwar an sich zu ähnlichen Expressionsstärken, diese hängt aber auch von einzelnen Sekundärstrukturen der mRNA ab. Bei Gen 5 kann errechnet werden, dass die Expressionsstärke des hier eingesetzten Konstruktes besonders hoch war (Seo *et al.*, 2013). Dadurch ist auch die intrazelluläre Menge an Protein 5 bereits sehr groß, bevor die Infektion stattfindet. So ist sehr wahrscheinlich, dass nach der Infektion kaum replikative Form des Phagen entsteht und somit auch keine neuen Phagen gebildet werden. Natürliche Expressionslevels des Protein 5, wie sie bei einem Helferplasmid vorliegen, sollten allerdings nicht zu einer Infektionsresistenz führen (Lee *et al.*, 2021). Abgesehen davon unterliegt die Kopienzahl eines Phagemids auch dem Plasmid-ori. Aus diesem Grund wird seine Bildung nicht durch zu hohe Mengen an Protein 5 beeinflusst.

Die Beobachtung, dass die zusätzliche Expression von Gen 2 und 10 die produzierte Menge an ssDNA sogar steigert kann auch über deren Funktion erklärt werden. Die beiden Proteine spielen eine entscheidende Rolle in der intrazellulären Produktion der Phagen ssDNA. Das Produkt von Gen 2 fügt einen Einzelstrangbruch in die dsDNA des Phagen ein und ermöglicht

so den Beginn der *rolling circle amplification*. Außerdem ligiert es den neu entstandenen ssDNA Strang, so dass er zirkulär wird. Das Produkt von Gen 10 bindet während der ssDNA Synthese an das freie Ende und schützt es so vor Abbau (Mai-Prochnow *et al.*, 2015). Erhöhte Expression von Gen 2 und 10 könnte also die Geschwindigkeit erhöhen, mit der ssDNA intrazellulär gebildet wird. In Studien zum Replikationsursprung des M13 Phagen konnte gezeigt werden, dass Protein 2 an einer bestimmten Domäne (Domäne A) des ori wirkt, während eine weitere Domäne (Domäne B) seine Wirksamkeit verstärkt. Wird diese zweite Domäne deletiert, so wird die Produktivität um einen Faktor 100 reduziert. Dies kann allerdings durch eine Überexpression der Gene 2 und 10 ausgeglichen werden (Dotto *et al.*, 1984; Vieira & Messing, 1987). Auch wenn in unserem Versuchsaufbau der Replikationsursprung des M13 Phagen vollständig vorlag, so ist doch denkbar, dass eine Steigerung der Gen 2 und 10 Expression auch die Produktivität erhöht.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die bisher beobachtete Infektionsresistenz, die Zellen mit Helferplasmid aufweisen, lediglich durch das Vorhandensein von Gen 3 ausgelöst wird. Kann also die Expression von Gen 3 auf die eine oder andere Art und Weise effektiv vermieden werden, so sollten die Zellen auch trotz Helferplasmid nicht infektionsresistent werden. Dies würde dann auch die „Reverse Infektion“ mit Phagemidpartikeln und somit die Trennung von Biomasse- und Produktbildung ermöglichen.

6.2 Regelung der Gen 3 Expression mit Hilfe eines Lac-Operators

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Infektionsresistenz lediglich durch die Expression von Gen 3 hervorgerufen wird, wurden verschiedene Herangehensweisen untersucht, um die Expression gezielt zu regulieren. Dafür standen zwei mögliche Optionen zur Verfügung. Zum einen die Regulation der Gen 3 Expression mit Hilfe eines Lac-Operators und zum anderen das Ausschneiden der Gen 3 Expressionskassette auf dem Helferplasmid und einfügen in das Phagemid. In der ersten Option kann die Produktion von Protein 3 durch Zugabe von IPTG nach Infektion mit Phagemidpartikeln induziert werden, in der Zweiten wird das Protein automatisch nach Infektion mit Phagemidpartikeln produziert, da die Expressionskassette durch die Infektion in die Zellen eingebracht wird.

Zunächst wurde die Möglichkeit untersucht, die Expression von Gen 3 unter die Regulation eines Lac-Operators zu stellen. Dazu wurde ein weiteres Helferplasmid designt und erstellt. Dieses Helferplasmid, wie in Abbildung 6.4 zu sehen, beruhte auf dem zuvor verwendeten Rückgrat des Plasmids pColA und nutzte das Genom des Helferphagen M13KO7. Der im Genom enthaltene Promotor vor Gen 3 wurde durch einen durch Lac-Operator regulierten

Promotor ausgetauscht. Zusätzlich wurde ein Terminator vor dem Promotor eingefügt, um sogenannten *read through* zu vermeiden.

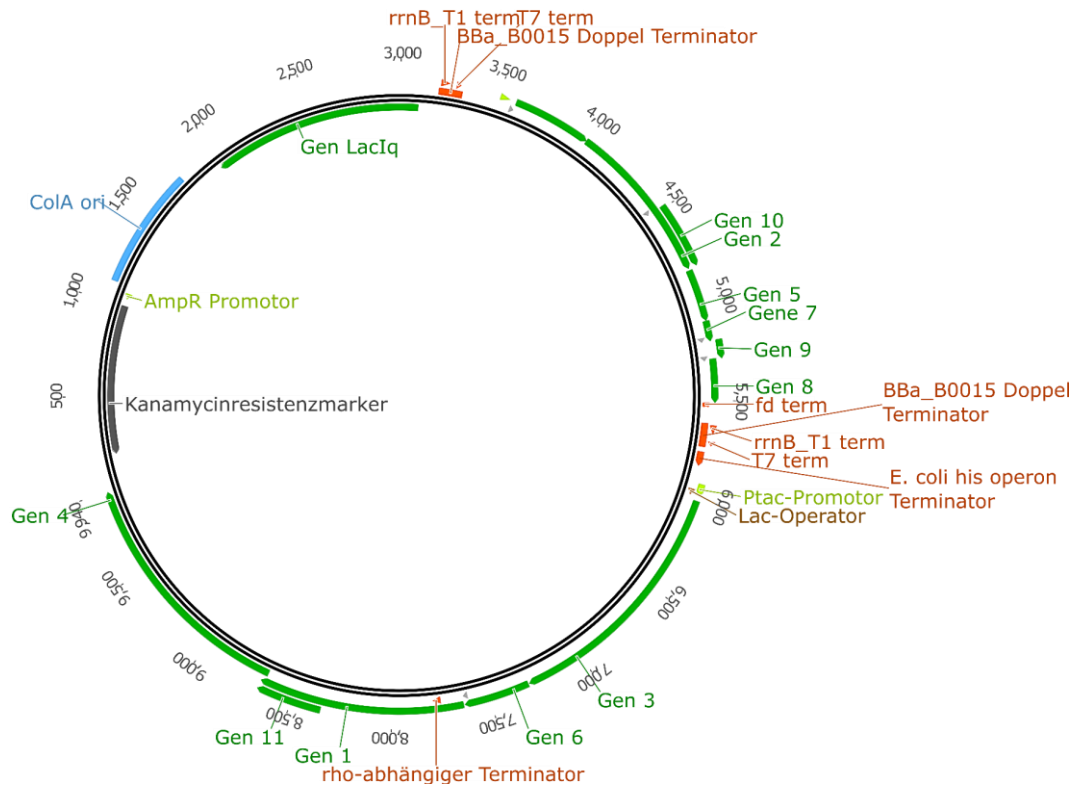


Abbildung 6.4: Plasmidkarte des Helferplasmids pphp 21. Hier wurde zu dem pColA Plasmidrückgrat das Genom von M13KO7 integriert. Gen 3 wurde unter die Kontrolle eines Lac-Operator regulierten Promotors gestellt. Gegen sogenannten *read through* wurde davor auch ein Transkriptionsterminator eingebaut.

Mit dem so erstellten Helferplasmid erfolgten anschließend Versuche zur Infizierbarkeit der *E. coli* Kulturen, die dieses Helferplasmid tragen. Die Schüttelkolbenkultivierungen waren dabei genauso aufgebaut wie die in Kapitel 6.1 zur Untersuchung der Einzelgene. Hier wurden die Kulturen mit dem Phagen M13mp18 einer Genomlänge von 8064 Basen infiziert. Dabei zeigte sich allerdings, wie in Abbildung 6.5 zu sehen ist, dass keine neuen M13 Phagen gebildet wurden. Demnach konnten Zellen, die bereits mit dem Helferplasmid pphp21 transformiert waren auch dann keine neuen Phagen bilden, wenn kein Induktionsmittel zu den Kulturen hinzugegeben wurde. Als Negativkontrolle wurde das Helferplasmid pphp17 genutzt, bei dem Gen 3 nicht induzierbar war. Hier war eine Infektionsresistenz erwartet worden und damit auch keine Produktbildung.

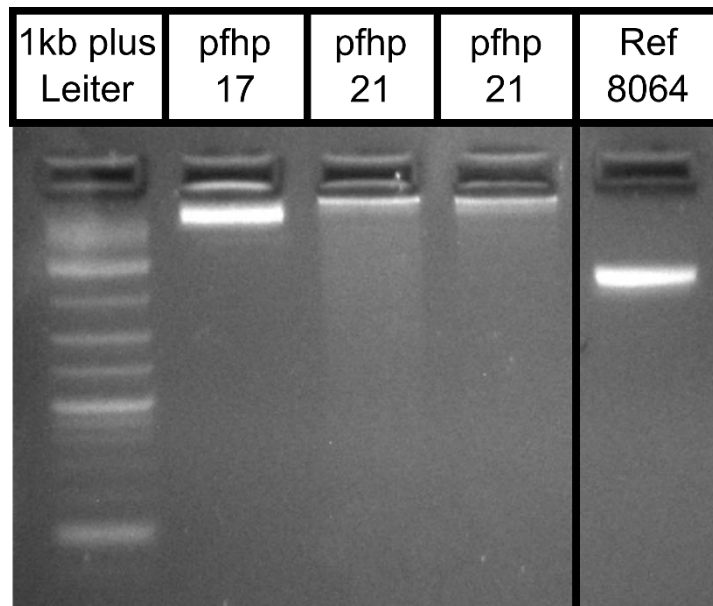


Abbildung 6.5: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus verschiedenen Schüttelkolbenkultivierungen mit *E. coli* JM109 transformiert mit dem Helferplasmid pfhp17 oder pfhp21 in „2xYT“ Medium. Die Kulturen wurden im Kultivierungsverlauf mit M13mp18 Phagen der Genomlänge 8064 Basen infiziert. Die Referenz (Ref 8064) zeigt die ssDNA des Phagen, der für die Infektion genutzt wurde. Bei dem Gelbild wurde der Kontrast gleich über das ganze Bild eingestellt, hier unwichtige Gelspuren wurden allerdings ausgeschnitten und das Gel wieder ohne Verschieben der Spuren zusammengesetzt. Die Schnitte sind durch schwarze Linien markiert.

Um sicher zu stellen, dass das Ausbleiben der Produktion nicht durch unerwartete Interaktion zwischen Helferplasmid und Phage bedingt war, wurde auch die Infektion mit Phagemidpartikeln untersucht.

Dazu wurden die mit dem Helferplasmid pfhp21 transformierten Zellen in Vorkulturröhrchen angezüchtet und anschließend in Schüttelkolben kultiviert. Nach Erreichen einer optischen Dichte $OD_{600} = 0,4$ wurde zu jeder Kultur eine größere Menge Phagemidpartikel zugegeben, um eine Multiplizität der Infektion (MOI) von 1 tfu cfu^{-1} zu überschreiten. Die somit infizierten Kulturen wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen wurde die ssDNA aus der gesamten Kultur isoliert. Dabei zeigte sich, dass selbst bei starkem Konzentrieren der ssDNA Probe kaum ssDNA nachgewiesen werden kann. Die Proben wurden dennoch mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Wie in der Analyse in Abbildung 6.6 zu erkennen ist, war hier eine schwache Produktbande zu erkennen. Da jedoch die ssDNA aus der gesamten Schüttelkolbenkultivierung (50mL) isoliert wurde und diese für das Gel stark konzentriert wurde, wurde nur sehr wenig ssDNA des Phagemids cp3 nachgewiesen.

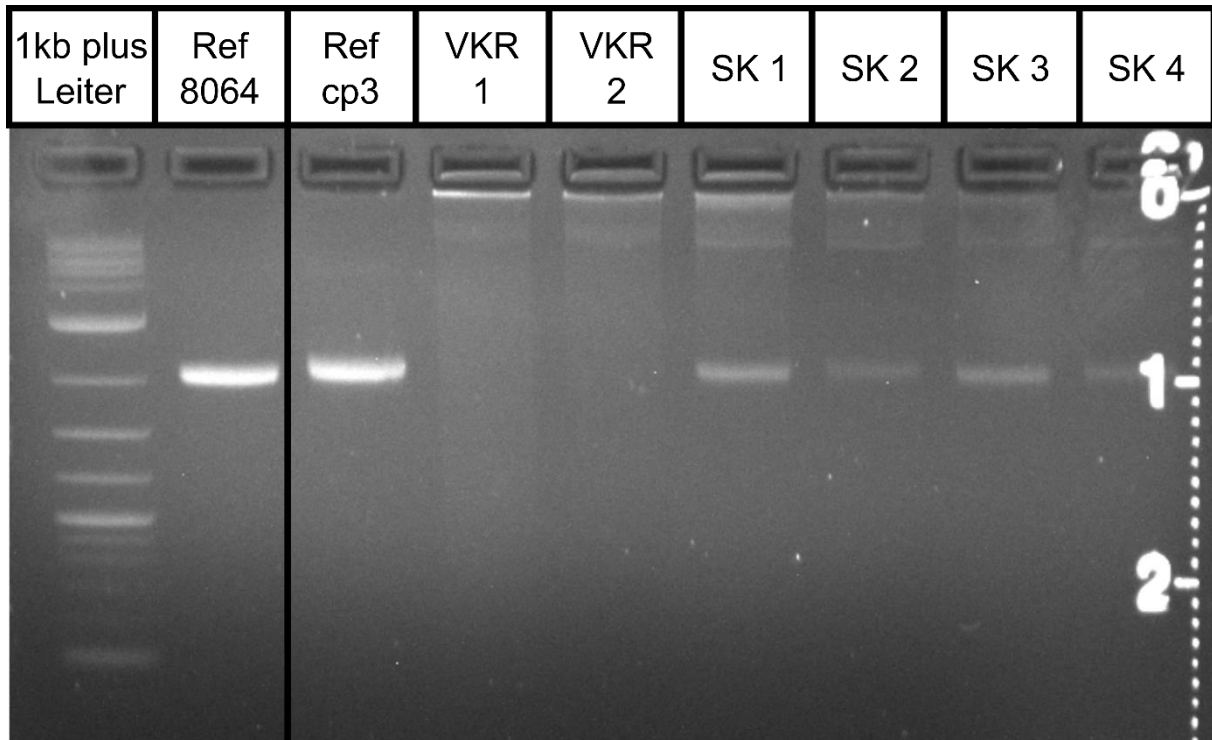


Abbildung 6.6: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus verschiedenen Schüttelkolbenkultivierungen und Vorkulturröhrchen mit *E. coli* JM109 transformiert mit dem Helferplasmid pfhp21 in „2xYT“ Medium. Die Kulturen wurden im Kultivierungsverlauf mit Phagemidpartikeln mit dem Phagemid cp3 infiziert. Die Referenzen (Ref) zeigen die ssDNA von M13mp18 mit einer Genomlänge von 8064 Basen und die ssDNA des Phagemids (cp3), der für die Infektion genutzt wurde. In den Anderen Spuren sind ssDNA proben isoliert aus Vorkulturröhrchen (VKR) oder Schüttelkolbenkultivierungen (SK) gezeigt. Bei dem Gelbild wurde der Kontrast gleich über das ganze Bild eingestellt, hier unwichtige Gelspuren wurden allerdings ausgeschnitten und das Gel wieder ohne Verschieben der Spuren zusammengesetzt. Die Schnitte sind durch schwarze Linien markiert.

Diskussion

Bei der Regulierung der Genexpression von Gen 3 durch einen Lac-Operator auf dem Helferplasmid hat sich gezeigt, dass nach Infektion dennoch keine weitere ssDNA Bildung stattgefunden hat. Auch wenn hier nicht unterschieden werden kann, ob eine Infektionsresistenz vorlag oder ob die Zellen aus anderen Gründen kein Produkt gebildet haben, so ist doch wahrscheinlich, dass das Protein 3 die Infektion immer noch verhindert hat.

Eine mögliche Ursache hierfür ist die sogenannte *leaky* Expression. Dabei handelt es sich um ein grundlegendes Phänomen, das mit dem Lac-Operator verbunden ist. Bei der natürlichen Regulation des Lac-Operons wirkt nicht die Lactose, sondern Allolactose als Induktionsmittel. Allolactose ist ein Nebenprodukt der Reaktion der Spaltung von Lactose durch β -Galactosidase. Das wiederum bedeutet, dass gewisse Mengen der im Lac-Operon kodierten Proteine in der Zelle vorliegen müssen, um die Induktion des Lac-Operons zu ermöglichen. Diese geringe Menge wird also auch unter reprimierten Bedingungen gebildet (Berg *et al.*, 2018). Es ist also denkbar, dass trotz der Regulation der Gen 3 Expression durch den Lac-Operator eine gewisse Menge an Protein 3 gebildet wird, die dann eine Infektionsresistenz hervorruft.

Dies wird noch wahrscheinlicher, wird bedacht, dass das Lac-Operon natürlicherweise zusätzlich durch ein cAMP Hungersignal induziert wird (Rosano & Ceccarelli, 2014). Die Bindestelle für das Katabolitaktivatorprotein (CAP) wurde allerdings bei dem hier eingesetzten Promotor nicht verwendet. So kann es zu Expression von Gen 3 gekommen sein, auch wenn das Repressorprotein hier durch das verbesserte Gen LacI^q kodiert wurde, welches höhere Level des Repressors erzeugt als das natürliche Gen LacI .

Die in dem Gel in Abbildung 6.6 sichtbaren Banden, die der ssDNA des in dieser Kultivierung erwünschten Produkts entsprechen, sind vermutlich kein Zeichen für neue Phagemidproduktion. Hier ist angesichts der sehr geringen Menge an ssDNA und der gleichzeitig sehr hohen Infektionsdichte viel mehr davon auszugehen, dass die Phagemidpartikel nachgewiesen wurden, die zur Infektion der Kultur zugegeben wurden.

Da fraglich war, ob durch weitere Optimierung des eingesetzten Regulationssystems die Ausbildung einer Infektionsresistenz sicher ausgeschlossen werden kann, wurde diese Möglichkeit nicht weiterverfolgt.

6.3 Übertrag von Gen 3 auf das Phagemid

Um die Infektionsresistenz sicher zu umgehen und so die Infektion mit Phagemidpartikeln zu ermöglichen, wurden neue Plasmide designt und erstellt. Zunächst wurde das Helferplasmid pfhp24 entworfen. Wie in der Plasmidkarte in Abbildung 6.7 zu sehen ist, wurde dazu das Genom des Helferphagen M13KO7 genutzt. Bisher wurde zur Erstellung von Helferplasmiden immer ein Plasmidrückgrat mit den kodierenden Sequenzen aller M13 Gene kombiniert. Da der Helferphage M13KO7 allerdings bereits einen Plasmid ori sowie einen Kanamycin-resistenzmarker trägt, die beide für die Arbeit mit Phagemiden optimal sind, wurde für das Helferplasmid pfhp24 zunächst nur der M13 Replikationsursprung sowie das Verpackungssignal entfernt. Dafür wurde anstelle dessen mit Hilfe von Gibson-assembly der iGEM BBa_B0015 Doppelterminator eingefügt (Diese Änderung allein wird als Helferplasmid pfhp23 geführt). Im nächsten Schritt wurde das Gen 3 aus dem M13 Phagengenom entfernt. Da allerdings innerhalb der Sequenz des Gen 3 weitere funktionale Sequenzen wie Teile eines Terminators sowie ein Promotor enthalten sind, konnte die kodierende Sequenz nicht gänzlich entfernt werden. Um effektiv zu erreichen, dass kein funktionales Protein 3 gebildet werden kann, wurde der Großteil der kodierenden Sequenz aus der Mitte des Gens entfernt und an dessen Stelle je ein Stoppkodon in jedem offenen Leserahmen (ORF) eingefügt. So wurde sichergestellt, dass für den Fall der Ausbildung einer mRNA aus dieser Sequenz nur ein sehr kurzes Peptid ohne Funktion gebildet werden kann.

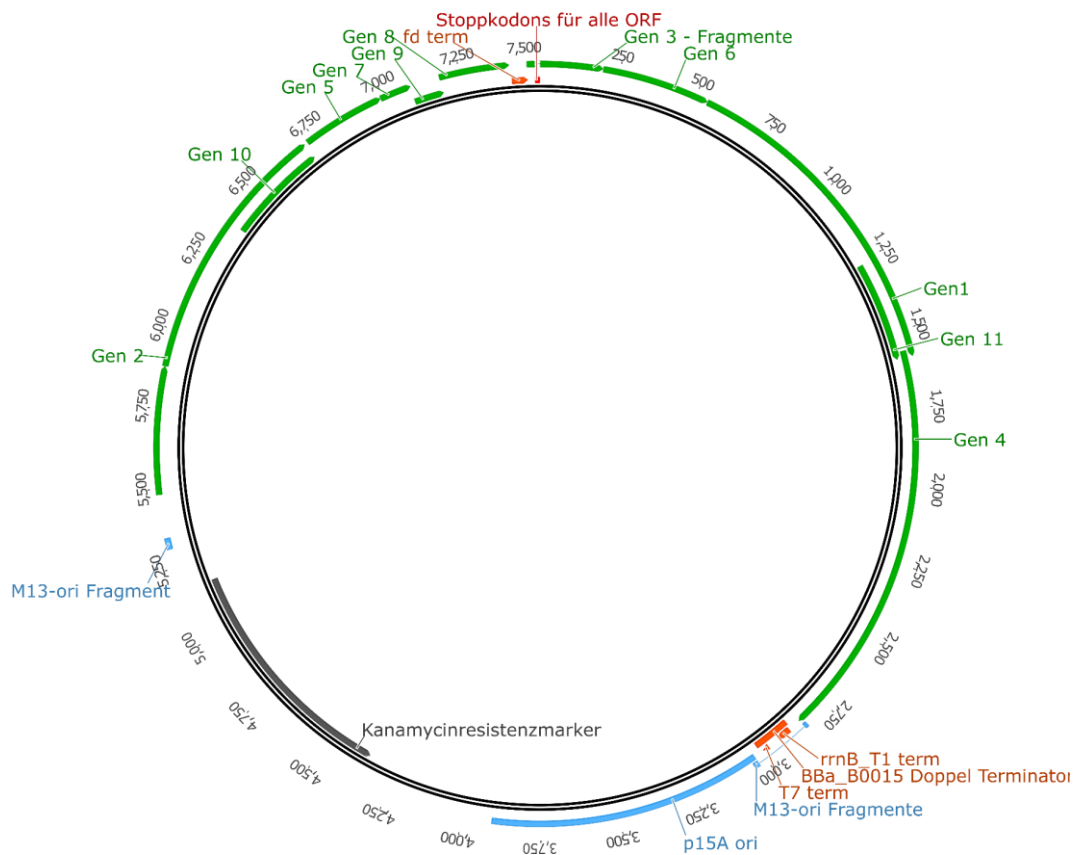


Abbildung 6.7: Plasmidkarte des Helferplasmids pfp24. Das Plasmid wurde auf Basis des Helferphagen M13KO7 entwickelt. Aus dem Genom des Helferphagen wurde der M13 Replikationsursprung sowie das Verpackungssignal entfernt und durch den iGEM Doppelterminator BBa_B0015 ersetzt. Abgesehen davon wurde der größte Teil der kodierenden Sequenz des Gen 3 entfernt und an dessen Stelle Stoppkodons in allen offenen Leserahmen (ORF) eingefügt.

Anschließend wurde ein entsprechendes Phagemid, gezeigt in Abbildung 6.8, konstruiert und erstellt, welches die komplette Expressionskassette des Gen 3 trägt. Dazu wurde das Phagemid cp2 als Grundlage genommen. Diese Phagemid enthält neben dem Plasmid ori (pMB1) einen Chloramphenicolresistenzmarker, den M13 ori sowie das Verpackungssignal und eine nutzerdefinierte Sequenz. Die nutzerdefinierte Sequenz besteht bei diesem Phagemid aus einem Teil einer berechneten Sequenz, in der die Abfolge von 8 Basen nie mehr als einmal vorkommt (De Bruijn Sequenz 8ter Ordnung). Um nun die Expressionskassette von Gen 3 einzubringen wurde zunächst ein Teil der nutzerdefinierten Sequenz entfernt und anschließend die Expressionskassette, die in ihrer Gesamtheit dem M13KO7 Genom entspringt, mit Hilfe von Gibson-assembly eingefügt. So wurde die Gesamtlänge von 7560 Basen erreicht.

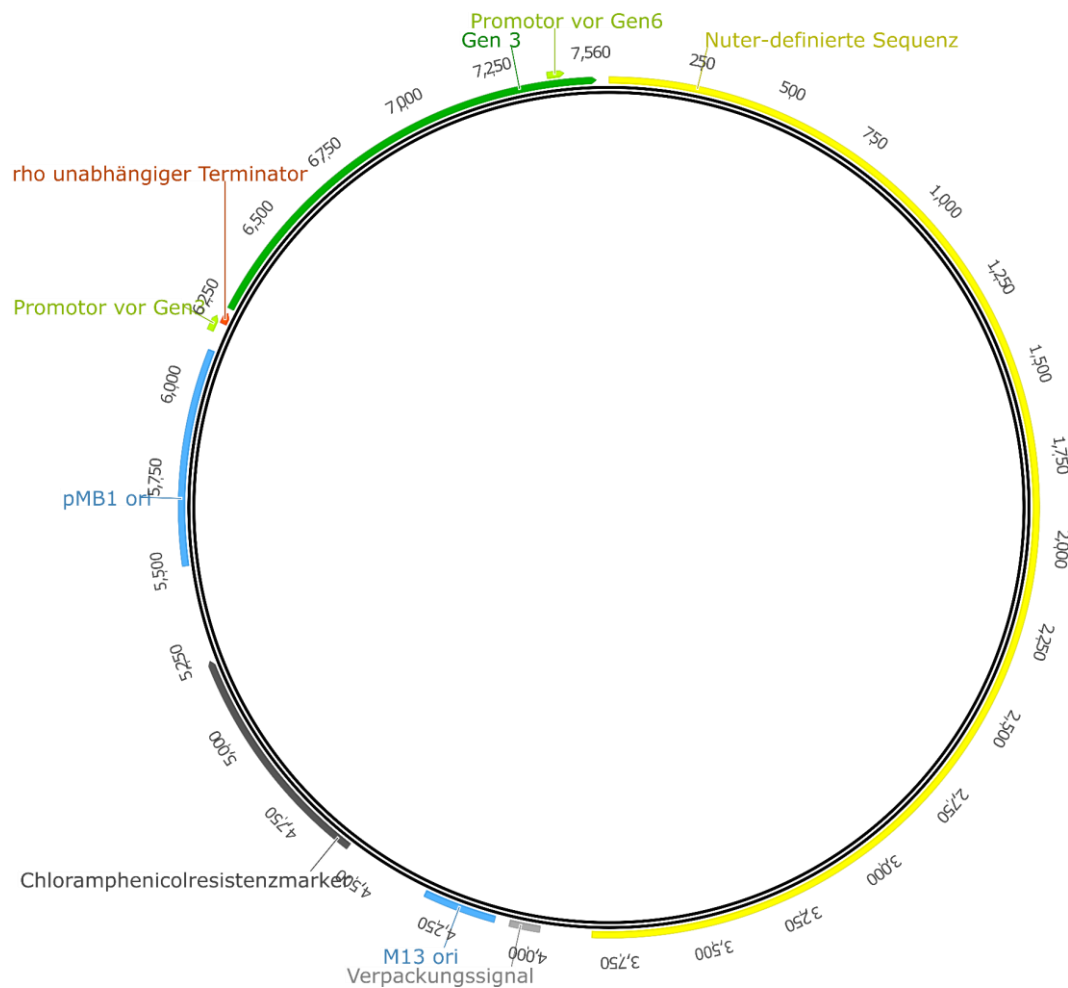


Abbildung 6.8: Plasmidkarte des Phagemids cp4(G3). Dieser Phagemid basiert auf dem Phagemid cp2. Ein Teil der nutzerdefinierten Sequenz wurde durch die komplette Expressionskassette des M13 Gen 3 ersetzt. So hat der Phagemid nach wie vor eine Länge von 7560 Basen.

Mit dem so hergestellten Helferplasmid und Phagemid wurden zunächst Untersuchungen in bewehrten Schüttelkolben in je 50 mL Mineralmedium nach Riesenberg durchgeführt. Durch das Mineralmedium wurde sichergestellt, dass alle Zellen das F-Plasmid enthalten. Dieses trägt einen Selektionsmarker, der für Plasmiderhalt in Minimalmedien sorgt. Das F-Plasmid wird benötigt für die Infektion der Zellen.

Für die Kultivierungen selbst wurden sowohl *E. coli* JM109 als auch *E. coli* NEB-turbo mit dem Helferplasmid transformiert und in Vorkulturen angezogen. Damit wurden die Schüttelkolben inokuliert und bei 37°C inkubiert, bis eine optische Dichte $OD_{600} = 0,4$ erreicht war. Anschließend wurden die Kulturen mit je einem mL cp4(G3) Phagemidpartikellösung infiziert. Die Phagemidpartikellösung wurde zuvor per Doppeltransformation auch in einem Satzverfahren im Schüttelkolben gewonnen. Nach der Infektion wurden die Zellen weiter bei 37°C für etwa 4 Stunden inkubiert. Abschließend wurde die ssDNA aus 10 mL Reaktionsüberstand isoliert und analysiert. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 6.9 zu sehen ist, dass in allen Schüttelkolben die Phagemid ssDNA gebildet wurde. Es sind allerdings starke Unterschiede zwischen den *E. coli* Stämmen JM109 und NEB-turbo zu erkennen. Auch wenn

in den Schüttelkolben mit *E. coli* JM109 die finale optische Dichte mit 2,36 und 2,72 deutlich höher war als bei den *E. coli* NEB-turbo Schüttelkolben mit 1,29 und 1,77, wurde bei NEB-turbo deutlich mehr ssDNA gebildet. Hier wurden im Schnitt $0,63 \text{ mg L}^{-1}$ gebildet, während bei JM109 lediglich $0,20 \text{ mg L}^{-1}$ gebildet wurden.

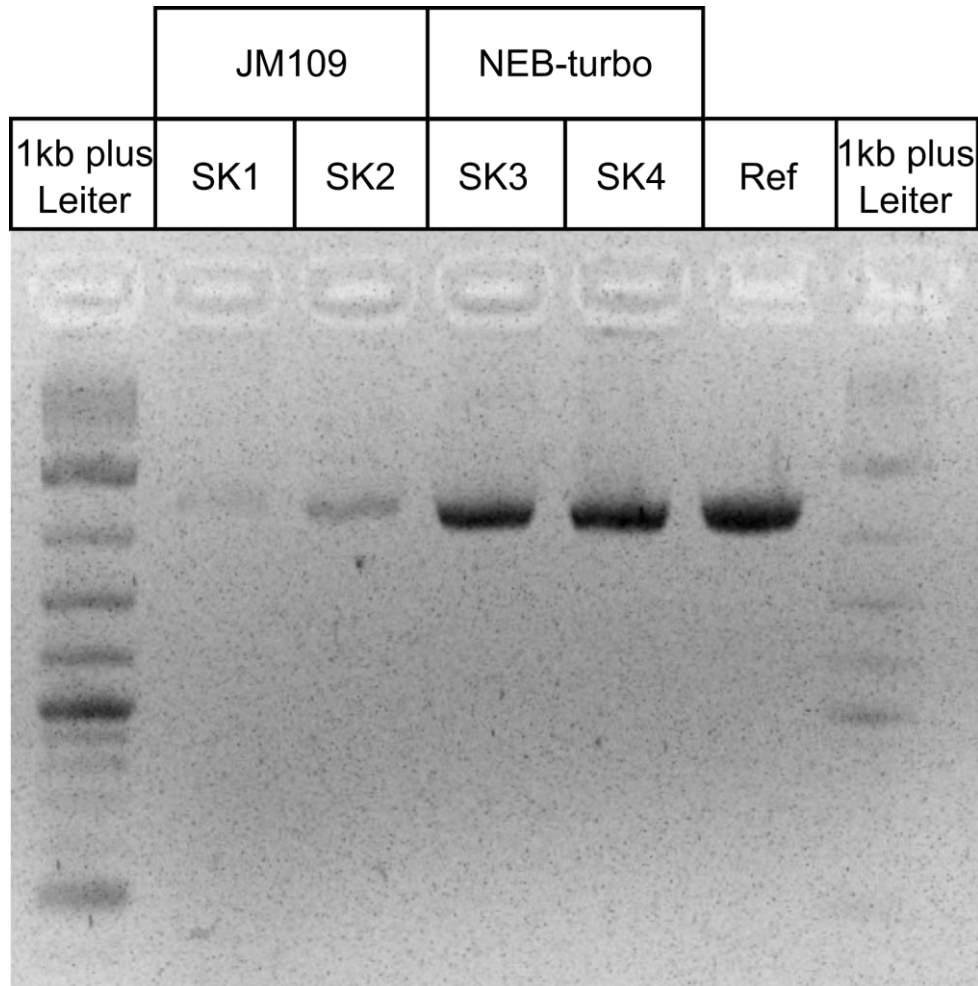


Abbildung 6.9: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus verschiedenen Schüttelkolbenkultivierungen mit *E. coli* JM109 oder *E. coli* NEB-turbo transformiert mit dem Helferplasmid pfp24 in Mineralmedium nach Riesenberg. Die Kulturen wurden im Kultivierungsverlauf mit Phagemidpartikeln cp4(G3) infiziert. Die Referenz (Ref) zeigt die ssDNA von M13mp18 mit einer Genomlänge von 7560 Basen. In den anderen Spuren sind ssDNA Proben isoliert aus Schüttelkolbenkultivierungen (SK) gezeigt. Für alle Kulturen kann eine Produktbande auf Höhe der Referenz beobachtet werden. Da das Produkt wie die Referenz eine Länge von 7560 Basen aufweist, kann so die Produktidentität bestätigt werden. Bei dem Gelbild wurde der Kontrast gleich über das ganze Bild eingestellt.

Auch wenn die maximale Produktkonzentration hierbei selbst für *E. coli* NEB-turbo geringer war als die, die mit Hilfe von Doppeltransformation erreicht werden konnte, wurde anschließend eine Hochzelldichtekultivierung im Rührkesselreaktor durchgeführt. Dabei wurde im Grunde vorgegangen wie bereits in früheren Arbeiten für die Produktion von M13 Phagen (Kick *et al.*, 2015). Es wurde also zunächst *E. coli* NEB-turbo pfp24 Biomasse in Satzphase und 5 Stunden Zulaufphase erzeugt. Anschließend wurden die Zellen mit Phagemidpartikeln cp4(G3) infiziert und dann weitere 23 Stunden unter Substratzulauf inkubiert. Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 6.10, zeigen, dass das Wachstum der

Zellen genau wie erwartet erfolgte. Bereits vor Infektion ist eine Biotrockenmassekonzentration von etwa 25 g L^{-1} erreicht worden. Im weiteren Verlauf steigt diese auf etwa 95 g L^{-1} an. In den *online*-Prozessdaten ist zu erkennen, dass zu keinem Zeitpunkt während der Kultivierung eine Sauerstofflimitierung vorlag.

In der Analyse der ssDNA Konzentration über den Kultivierungsverlauf zeigt sich, dass bereits etwa vier Stunden nach Infektion die messbare Menge an ssDNA und damit auch an Phagemidpartikeln zunimmt. 13,5 Stunden nach Zulaufstart liegt die ssDNA Konzentration bereits bei $15,5 \text{ mg L}^{-1}$, nimmt dann aber über Nacht, im weiteren Kultivierungsverlauf noch deutlich zu und erreicht eine finale Konzentration von $70,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Mittels Agarosegelelektrophorese konnte auch gezeigt werden, dass die produzierte ssDNA der Länge der Referenz entspricht und somit auch die korrekte ssDNA produziert worden ist. Hier zeigt sich allerdings eine zusätzliche Bande, die für eine längere DNA Spezies spricht. Dabei ist unklar, worum es sich handelt. Zur genaueren Bestimmung der ssDNA Qualität wurde diese auch als Gerüststrang zur Faltung einer DNA-Origami-Struktur genutzt. Bei der Faltung dieses 42 Helix-Bündels konnte mittels Agarosegelelektrophorese erkannt werden, dass lediglich geringe Mengen an Aggregation auftraten und beinahe alle weiteren Banden im Gelbild verschwanden. Durch das veränderte Migrationsverhalten im Vergleich zur ssDNA konnte sichergestellt werden, dass es sich um korrekt gefaltete Origami-Objekte handelt und somit die ssDNA Sequenz auch korrekt ist. Nur wenn die Sequenz des Gerüststrangs korrekt ist, können alle Klammernukleotide sauber binden und so das korrekte Origami-Objekt bilden.

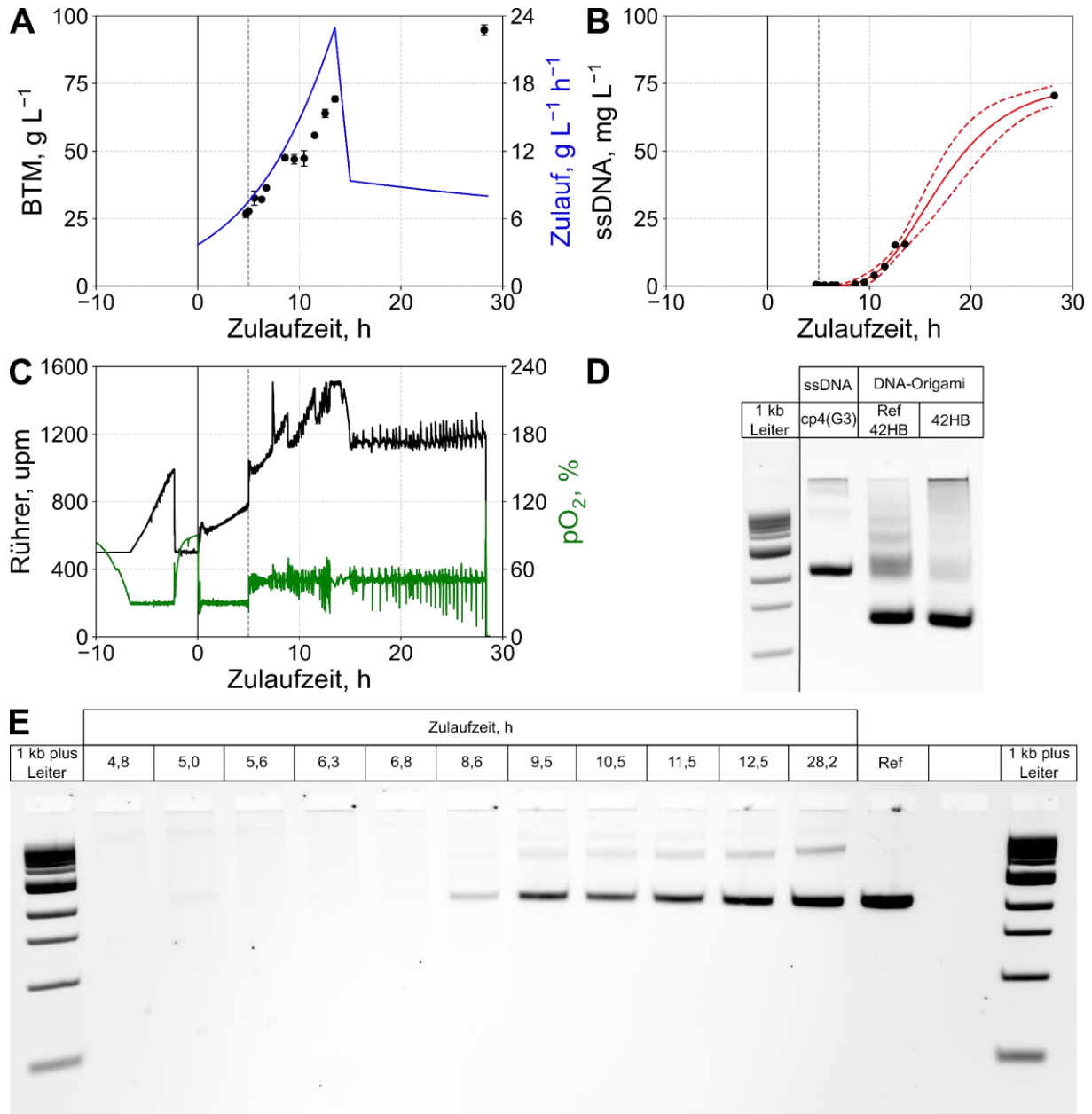


Abbildung 6.10: Zulaufkultivierung im Rührkesselreaktor von *E. coli* NEB-turbo transformiert mit dem Helferplasmid pfhp24. Fünf Stunden nach Zulaufstart wurde mit Phagemiden cp4(G3) infiziert. **A**: Biotrockenmassekonzentration (BTM, schwarze Punkte) und Zulaufmassenstrom (Zulauf, blaue Linie) aufgetragen gegen die Prozesszeit relativ zum Zulaufstart (Zulaufzeit). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zwischen je 3 technischen Replikaten. **B**: ssDNA Konzentration (ssDNA, schwarze Punkte) aufgetragen gegen die Zulaufzeit. Rote Linie: sigmoide Regression der Datenpunkte. Gestrichelte rote Linien: Oberes und unteres 95% Konfidenzintervall der Regression. Für die Datenpunkte wurde hier der technische Fehler nicht ermittelt. **C**: Online-Prozessdaten über die Zulaufzeit. Rührergeschwindigkeit (Rührer, schwarze Linie), Gelöstsauerstoffkonzentration (pO₂, grüne Linie). **D**: Agarosegelelektrophorese der produzierten ssDNA sowie eines DNA-Origami Objekts, welches mit dieser gefaltet wurde. Bei dem Objekt handelt es sich um ein 42-Helix-Bündel (42HB). Wie in der Referenz zu sehen, ändert sich die Migrationsweite der ssDNA nach der Faltung. Bei dem Gelbild wurde der Kontrast gleich über das ganze Bild eingestellt, hier unwichtige Gelspuren wurden allerdings ausgeschnitten und das Gel wieder ohne Verschieben der Spuren zusammengesetzt. Die Schnitte sind durch schwarze Linien markiert. **E**: Agarosegelelektrophorese der im Prozessverlauf isolierten ssDNA. Nach etwa 8,6 Stunden Zulaufzeit wird eine Bande auf Höhe der Referenz (cp4(G3) ssDNA) sichtbar. Im weiteren Verlauf wird allerdings auch eine weitere Bande sichtbar.

Diskussion

Das Plasmid-Design, welches für das Helferplasmid pfhp24 gewählt wurde, war, dadurch, dass es nur auf Basis der bereits in M13KO7 enthaltenen Sequenzmotive basierte, relativ

simpel. Dabei ist allerdings die Wahl des Plasmid ori sinnvoll, da dieser bereits in vielen vorherigen Studien besonders gut für das Zweiplasmidsystem mit diesem Helferphagen und einem Phagemid geeignet war (Vieira & Messing, 1987). Die Kopienzahl, die mit diesem ori erreicht wird, liegt bei etwa 40. Dies ist zwar etwas niedriger als bei dem natürlich vorkommenden Phagen mit 100 bis 200 Kopien (Hohn *et al.*, 1971), ist aber mit alle üblichen Phagemid-ori kompatibel. Da sich bereits in vorherigen Arbeiten mit dem Helferplasmid gezeigt hatte, dass starke Veränderungen des Genoms auch zu völligem Funktionsverlust führen (siehe Kapitel 5.2), wurde hier nun weniger stark eingegriffen und lediglich der Teil der kodierenden Sequenz von Gen 3 entfernt, der keine funktionelle Sequenzen enthält. Dieses Design wurde auch gewählt, da bereits Publikationen zu einem ähnlichen Helferplasmid für das Phagen-display gab (Brödel *et al.*, 2016, 2017). Die Ergebnisse des Kapitels 6.1 zur Vermeidung der Infektionsresistenz waren allerdings ausschlaggebend.

Bei dem Design des Phagemids wurde die Expressionskassette für Gen 3 nativ wie im Genom des M13 Phagen übernommen, um so möglichst die natürliche Expressionsstärke beizubehalten. Die Länge von 7560 Basen erschien logisch, da für diese Länge bereits verschiedene DNA-Origami-Strukturen existierten. So muss kein neues Design erstellt werden um mit dieser ssDNA als Gerüststrang Faltungsexperimente durchzuführen.

Bei der Kultivierung der *E. coli* Stämme JM109 und NEB-turbo transformiert mit pfhp24 hat sich kein besonderer Unterschied in Wachstumsgeschwindigkeit und maximaler optischer Dichte der Kultur gezeigt (Daten nicht gezeigt). Dennoch waren nach Infektion mit Phagemidpartikeln deutliche Unterschiede in der maximalen optischen Dichte zu erkennen. Unklar ist, ob der große Unterschied hier wirklich durch die Infektion auftritt. Ein großer Einfluss auf das Wachstum wird durch eine Infektion mit M13 Phagen eigentlich nicht erwartet (Kick, Behler, *et al.*, 2017). Grundsätzlich war die Erwartung, dass sich dies bei Phagemiden genauso verhält.

Insgesamt waren die maximalen ssDNA-Konzentrationen allerdings eher gering. Verglichen zu den Schüttelkolbenkultivierungen nach Doppeltransformation wurde bei vergleichbarem Produkt nur etwa die halbe maximale Produktkonzentration erreicht. Ein genauer Vergleich ist hier aber auch schwierig, da sowohl Medium, *E. coli* Stamm als auch Kolbengeometrie nicht gleich waren.

Es ist bekannt, dass bestimmte Proteine des M13 Phagen einen regulierenden Effekt auf andere haben (Model *et al.*, 1982). Unklar ist, ob Gen 3 dabei eine Rolle spielt und wie sich seine initiale Abwesenheit auswirkt. Hier liegen die meisten M13 Proteine bereits vor Infektion in der Zelle vor, nur Gen3 kommt erst durch die Infektion hinzu. Es ist unklar, ob dadurch Regulationsmechanismen zwischen den Phagenproteinen gestört sind und somit die Protein-Level anders sind als bei der natürlichen M13-Infektion.

Auch wenn durch einen solchen Effekt eventuell geringere ssDNA Konzentrationen erreicht werden als mit der Doppeltransformationsmethode, so kann dennoch insgesamt die ssDNA-Konzentration verbessert werden, da Biomasse und Produktbildung voneinander getrennt werden und dies die Kultivierung in Hochzelldichte ermöglicht.

In der Hochzelldichtekultivierung hat sich gezeigt, dass mit der Trennung von Biomasse und Produktbildung sehr gutes Wachstum erreicht werden konnte. Das spricht dafür, dass das Wachstum weder durch vermehrte Bildung von Acetat inhibiert noch durch einen Substratmangel limitiert wurde.

Da der Prozess mit einer Phagemidpartikellösung mit unbekannter Partikelkonzentration infiziert wurde, ist auch die Multiplizität der Infektion unbekannt. Auch wenn demnach keine Aussage über die Infektionsdichte gemacht werden kann, so hat sich gezeigt, dass hier auch eine deutlich höhere ssDNA-Konzentration erreicht wird als in den Satzprozessen im Schüttelkolben. Verglichen mit einem Produktionsprozess für M13 Phagen, bei dem bei gleicher ssDNA Länge maximale Konzentrationen von etwa 370 mg L^{-1} (Kick *et al.*, 2015) möglich sind, ist die maximale ssDNA-Konzentration mit $70,5 \text{ mg L}^{-1}$ relativ gering. Ein möglicherweise besser vergleichbarer Prozess, bei dem künstlich ssDNA mit Hilfe des Helferphagen M13KO7 hergestellt wurde, erzeugte mit etwa 140 mg L^{-1} lediglich die doppelte Produktmenge (Praetorius *et al.*, 2017). Eine weitere Steigerung der ssDNA-Konzentration scheint also noch möglich zu sein.

Verglichen mit den in dieser Arbeit bisher gezeigten Ergebnissen der Doppeltransformation konnte die maximale Produktkonzentration deutlich gesteigert werden. Dabei ergibt sich eine Steigerung um den Faktor 8 gegenüber der Produktion im Satzverfahren im Rührkesselreaktor mit „2xYT“ Medium und eine Steigerung um den Faktor 4,7 für die Produktion in Schüttelkolben in dem Spezialmedium „EnPresso B“. Mit der Infektion durch Phagemidpartikel kann zwar gemessen an der erzeugten Biomasse weniger ssDNA hergestellt werden, allerdings die Trennung von Biomasse und Produktbildung erreicht werden. Bei der Doppeltransformation ist eine Maßstabsübertragung in den Pilotmaßstab technisch unmöglich, da bei der Bereitstellung der *E. coli* Biomasse zur Inokulation bereits zu viele Generationen durchlaufen werden (Smeal *et al.*, 2017a, 2017b)(vgl. Kapitel 5.1). Bei der „Reversen Infektion“ mit Phagemidpartikeln kann zunächst die notwendige Biomasse für jeglichen Maßstab vorbereitet werden und im Laufe des Prozesses durch Infektion mit Phagemidpartikeln die Produktion in Gang gesetzt werden.

Die in dem Verfahren hergestellte ssDNA zeigte in der Analyse mittels Agarosegelelektrophorese eine zusätzliche, etwas blässere Bande, deren Ursprung erstmal unklar war. Dem Laufverhalten der Bande nach, handelt es sich entweder um ssDNA mit einer größeren Länge als das Produkt oder um doppelsträngige DNA. Dieser Unterschied lässt sich allerdings

in der Agarosegelelektrophorese nicht nachweisen. Unter der Annahme, dass es sich um ssDNA handelt, könnte es sich auf Grund des Laufverhaltens oberhalb der Produkt ssDNA um ein Dimer aus zwei Molekülen der Produkt ssDNA handeln, die durch partielle Basenpaarung aneinanderhängen. Um das besser zu verstehen, wurde die Endprobe des Reaktorlaufs – bereits passend für die Analyse mittels Agarosegelelektrophorese verdünnt – für 10 Minuten auf 80°C erhitzt und erneut analysiert. Hierbei zeigte sich, dass nach der Behandlung nur noch die Produktbande sichtbar war (Daten nicht gezeigt). Das spricht dafür, dass es sich tatsächlich um Dimere der Produkt ssDNA handelte, da die Basenpaarung durch das Erhitzen gelöst wurde. Auch die Faltung zu DNA-Origami Strukturen zeigte, dass keine großen Mengen an Nebenprodukten in der ssDNA enthalten waren. In der Agarosegelelektrophorese des gefalteten Origami-Objekts sind nur geringe Mengen an Aggregation in der Geltasche zu erkennen und nur wenig Nebenprodukte, die einen gleichmäßigen Schatten entlang der Gelspur bilden.

Die Methode der „Reversen Infektion“, die ein Helferplasmid ohne Gen 3 und das entsprechenden Phagemid, welches eine Gen 3 Expressionskassette trägt, nutzt, ist also dazu geeignet, ssDNA mit einem Großteil nutzerdefinierter Sequenz zu produzieren. Dabei ist die ssDNA Qualität gut genug, um DNA-Origami Objekte damit zu falten.

Im nächsten Schritt muss also ermittelt werden, ob mit dieser Methode auch die Bildung von selbstreplizierenden Phagen vermieden wird. Nur wenn mit Hilfe der „Reversen Infektion“ nachweisbar keine echten Phagen gebildet werden, kann die Methode auch genutzt werden um ssDNA bei Lohnherstellern ohne das Risiko von Kreuzkontaminationen herzustellen.

6.4 Rekombination und Bildung selbstreplizierender Partikel

Nachdem mit Hilfe des Transfers von Gen 3 vom Helferplasmid auf das Phagemid die „Reverse Infektion“ und damit auch die Trennung von Biomasse und Produktbildung ermöglicht wurde, wurde im nächsten Schritt untersucht, inwieweit die Ergebnisse in Abhängigkeit der Infektionsdichte variieren und ob mit der Methode definitiv keine selbstreplizierenden Partikel gebildet werden.

Dazu wurden zunächst zwei weitere Hochzelldichtekultivierungen im Rührkesselreaktor durchgeführt. Die Durchführung erfolgte wie zuvor in Kapitel 6.3 beschreiben, wobei eine Kultivierung mit einer Infektionsdichte von $\text{MOI} = 0,01 \text{ tfu cfu}^{-1}$ und eine weitere mit $\text{MOI} = 0,1 \text{ tfu cfu}^{-1}$ durchgeführt wurde. Dabei ergab sich für beide Prozesse ein vergleichbares Wachstum, wobei die finale Biotrockenmassekonzentration mit 71 g L^{-1} bzw. 83 g L^{-1} nur geringfügig unter der zuvor erreichten lag. Insgesamt waren die Prozessverläufe im Hinblick auf Wachstum, wie in Abbildung 6.11 gezeigt, sehr vergleichbar. Für den Verlauf

sowie die maximalen Produktkonzentrationen ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede. Dabei waren der Prozess mit einer $MOI = 0,01 \text{ tfu cfu}^{-1}$ sehr nahe an dem im vorherigen Kapitel vorgestellten Prozess, während bei dem mit einer Infektion mit $MOI = 0,1 \text{ tfu cfu}^{-1}$ die Produktion etwas früher einsetzte und mit einer maximalen Produktkonzentration von etwa 317 mg L^{-1} eine deutlich höhere ssDNA Konzentration lieferte.

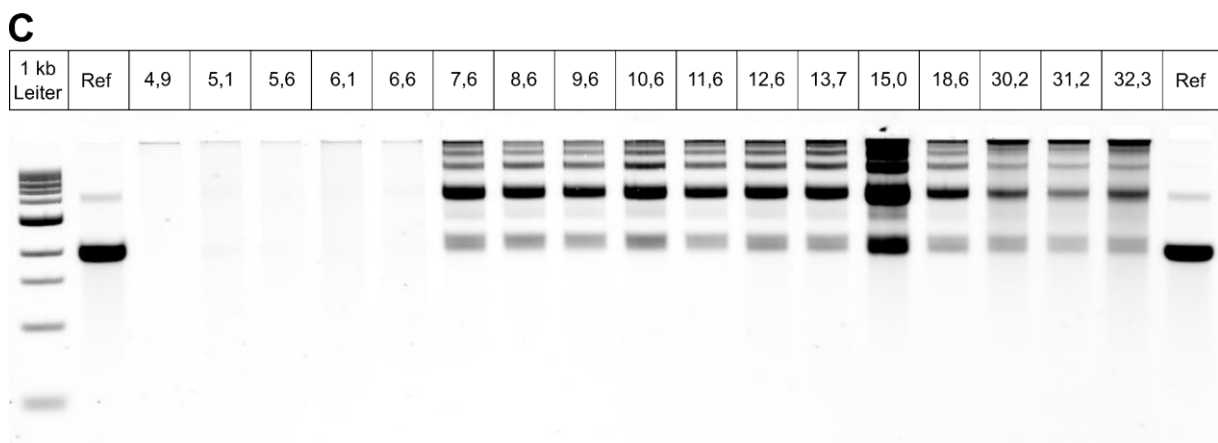
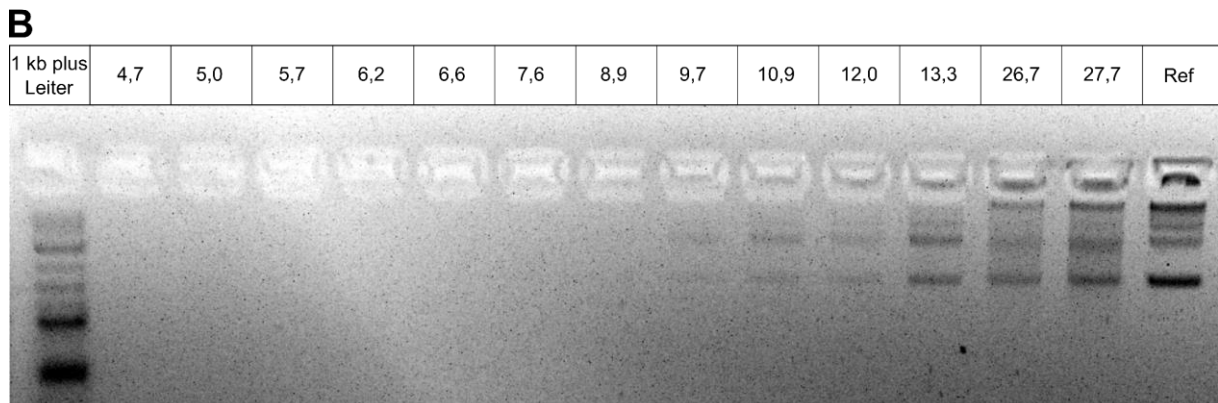
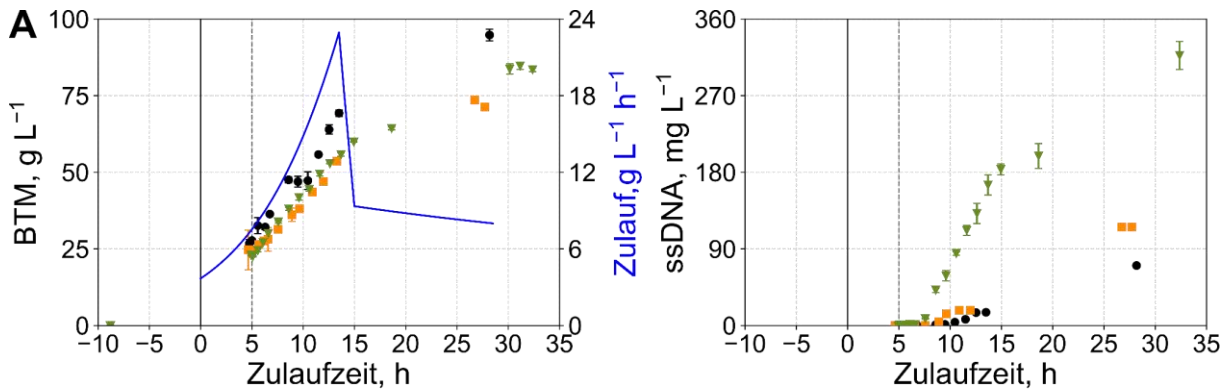


Abbildung 6.11: Drei Zulaufkultivierungen im Rührkesselreaktor von *E. coli* NEB-turbo transformiert mit dem Helferplasmid pfp24. Fünf Stunden nach Zulaufstart wurde mit Phagemiden cp4(G3) infiziert. **A:** links: Biotrockenmassekonzentration (BTM, schwarze Punkte: MOI unbekannt; orange Quadrate: $MOI = 0,01 \text{ tfu cfu}^{-1}$; grüne Dreiecke: $MOI = 0,1 \text{ tfu cfu}^{-1}$) und Zulaufmassenstrom (Zulauf, blaue Linie) aufgetragen gegen die Prozesszeit relativ zum Zulaufstart (Zulaufzeit). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zwischen je 3 technischen Replikaten. Rechts: ssDNA Konzentration (ssDNA, Markierungen wie links) aufgetragen gegen die Zulaufzeit. **B:** Agarosegelelektrophorese der im Prozessverlauf isolierten ssDNA bei $MOI = 0,01 \text{ tfu cfu}^{-1}$. Nach etwa 9,7 Stunden Zulaufzeit wird eine Bande auf Höhe der Referenz (cp4(G3) ssDNA) sichtbar. Ref: cp4(G3) ssDNA als Referenz. **C:** Agarosegelelektrophorese der im Prozessverlauf isolierten ssDNA bei $MOI = 0,1 \text{ tfu cfu}^{-1}$. Nach etwa 7,6 Stunden Zulaufzeit wird eine Bande auf Höhe der Referenz (cp4(G3) ssDNA) sichtbar. Ref: cp4(G3) ssDNA als Referenz.

Die Analytik mittels Agarosegelelektrophorese zeigte, dass beide Prozesse einen höheren Anteil an Nebenprodukten erzeugten als zuvor beobachtet. Dabei fällt besonders auf, dass bei $\text{MOI} = 0,1 \text{ tfu cfu}^{-1}$ die Produktbande weniger Intensität aufweist als die nächste Bande oberhalb von ihr. Diese Bande war zuvor allerdings als Dimer-Bande identifiziert worden. Bei genauerer Betrachtung fällt hier allerdings auch auf, dass die Produktbande nicht nur breiter erscheint als zuvor beobachtet, sondern aus zwei Banden besteht, die sehr ähnliches Laufverhalten aufweisen.

Angesichts der schlechteren Produktqualität, die in Abbildung 6.11 **B** und **C** zu sehen ist, wurde auch für die beiden zusätzlichen Reaktorläufe die ssDNA Qualität durch Faltung eines DNA-Origami-Objekts überprüft. Dazu wurden die Proben aller drei Reaktorläufe sowohl direkt nach der Isolierung der ssDNA für die Faltungsreaktion eingesetzt als auch nach einer initialen Denaturierung bei 80°C für 10 Minuten. So sollten die möglichen Produkt Dimere getrennt und damit für die Faltungsreaktion bereitgestellt werden.

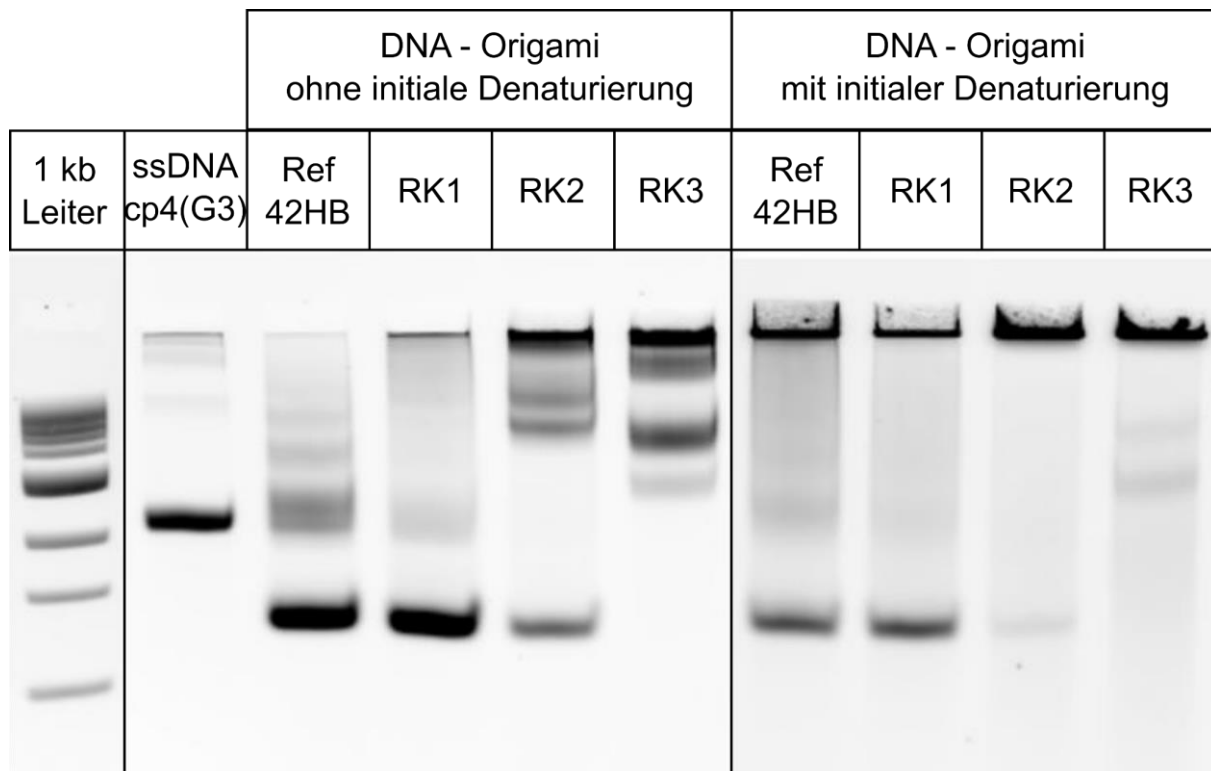


Abbildung 6.12: Agarosegelelektrophorese der cp4(G3) ssDNA sowie eines DNA-Origami Objekts, welches mit dieser gefaltet wird. Bei dem Objekt handelt es sich um ein 42-Helix-Bündel (42HB). Wie in der Referenz zu sehen, ändert sich die Laufweite der ssDNA nach der Faltung. Alle ssDNA Proben wurde je einmal direkt für die Faltung des DNA-Origami-Objekts eingesetzt und einmal direkt nach initialer Denaturierung bei 80°C für 10 Minuten. RK1: Rührkesselzulaufkultivierung mit unbekannter MOI; RK2: mit $\text{MOI} = 0,01 \text{ tfu cfu}^{-1}$; RK3: mit $\text{MOI} = 0,1 \text{ tfu cfu}^{-1}$. Bei dem Gelbild wurde der Kontrast gleich über das ganze Bild eingestellt, hier unwichtige Gelspuren wurden allerdings ausgeschnitten und das Gel wieder ohne Verschieben der Spuren zusammengesetzt. Die Schnitte sind durch schwarze Linien markiert. Teile des Gelbilds wurden bereits in Abbildung 6.10 **D** gezeigt.

Wie in Abbildung 6.12 zu sehen ist, konnte das ssDNA Produkt des Reaktorlaufs mit einer $\text{MOI} = 0,1 \text{ tfu cfu}^{-1}$ nicht gefaltet werden. Durch die Denaturierung der ssDNA vor der Faltungsreaktion konnte die Faltung in allen Fällen nicht verbessert werden. Dabei ist

zusätzlich zu erkennen, dass mit der ssDNA aus dem Reaktorlauf mit $\text{MOI} = 0,01 \text{ tfu cfu}^{-1}$ nur wenig DNA-Origami-Objekte gebildet werden. Sowohl mit als auch ohne Denaturierung fällt hier der Großteil der Faltungsreaktion als Aggregate aus, die wenig oder nicht in das Gel migrieren.

Diese Analyse macht klar, dass bei den beiden Kultivierungen mit definierter Infektionsdichte nicht oder nur teilweise diejenige ssDNA produziert wurde, die erwünscht war.

Mit Hilfe von Sanger-Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass in beiden dieser Reaktorläufe ssDNA mit Sequenzmotiven des Helferplasmids gebildet wurden.

Um anschließend zu prüfen, ob die gebildeten Partikel lediglich eine unerwünschte ssDNA Sequenz enthielten oder es sich dabei um selbstreplizierende Einheiten handelte, wurde eine weitere Zulaufkultivierung durchgeführt.

Grundsätzlich wurde die Kultivierung wie zuvor durchgeführt. Hier wurde, um die Möglichkeit einer Kontamination mit Phagemidpartikeln zu simulieren, kurz nach Inokulation mit einer $\text{MOI} = 0,3 \text{ tfu cfu}^{-1}$ infiziert. Die *E. coli* waren dabei nicht mit einem Helferplasmid transformiert, so dass nur im Fall von selbstreplizierenden Einheiten ssDNA gebildet wird.

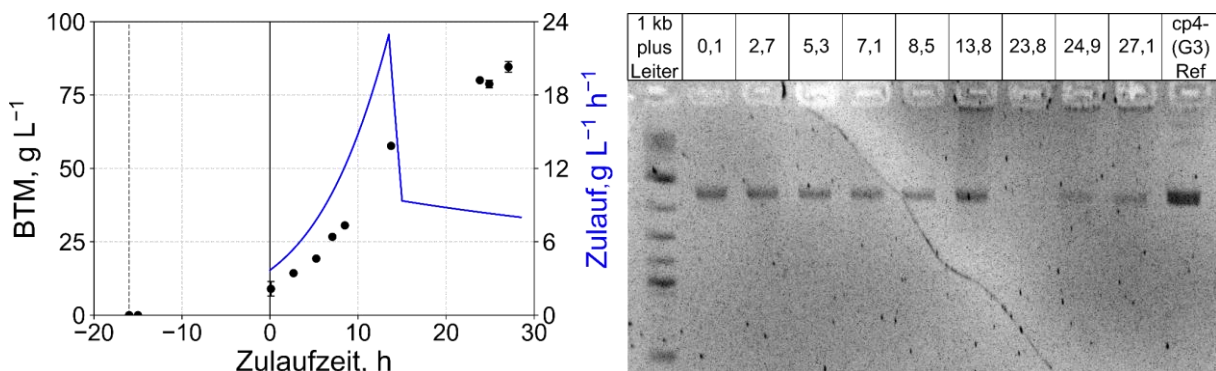


Abbildung 6.13: Zulaufkultivierung von *E. coli* JM109 Wild Typ. Direkt nach Inokulation wurde mit Phagemidpartikeln cp4(G3) infiziert. Links: Biotrockenmassekonzentration (BTM, schwarze Punkte) und Zulaufmassenstrom (Zulauf, blaue Linie) aufgetragen gegen die Prozesszeit relativ zum Zulaufstart (Zulaufzeit). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zwischen je 3 technischen Replikaten. Rechts: Agarosegelelektrophorese der im Prozessverlauf isolierten ssDNA (Zahlen geben die Zulaufzeit in Stunden an). Ref: cp4(G3) ssDNA als Referenz.

Wie in Abbildung 6.13 gezeigt, wurde über den gesamten Prozess ssDNA produziert. Dabei war das Wachstum vergleichbar zu den bisherigen Kultivierungen. Nachdem die *E. coli* Zellen kein Helferplasmid getragen haben, musste weiterhin untersucht werden, welche ssDNA hier gebildet wurde. Dabei konnte mit Hilfe von Sanger-Sequenzierung ermittelt werden, dass es sich bei der hergestellten ssDNA um die Sequenz eines vollständigen selbstreplizierenden M13 Phagen handelt. Da der gleiche Kultivierungsaufbau auch ganz ohne Infektion durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt), wobei keine ssDNA gebildet wurde, ist eine Kontamination mit M13 Phagen als Ursache relativ unwahrscheinlich.

Auch die ssDNA der Phagemidpartikel, die zur Infektion des Reaktorlaufs eingesetzt wurde, wurde mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass es sich um die ssDNA des cp4(g3) Phagemids handelt.

Mittels Sanger-Sequenzierung konnte auch gezeigt werden, dass es sich bei dem entstandenen, selbstreplizierenden Phagen um eine Rekombination aus Helferplasmid und Phagemid handelt (Daten nicht gezeigt). Es konnten zwei unabhängige Rekombinationsstellen erkannt werden. Zum einen wurde das Gen 3 auf dem Phagemid mit den Überresten auf dem Helferplasmid rekombiniert, sodass das Helferplasmid wieder ein vollständiges Gen 3 enthält. Außerdem wurde der M13-ori sowie das Verpackungssignal an einer homologen Sequenz von 114 Basen rekombiniert.

Diskussion

Durch den Übertrag von Gen 3 vom Helferplasmid auf das Phagemid konnte die Infektion von *E. coli*, transformiert mit dem Helferplasmid, mit Phagemidpartikeln ermöglicht werden. Mit dieser „Reversen Infektion“ lässt sich auch die Trennung von Biomasse- und Produktbildung erreichen. Grundsätzlich war hier das Ziel zu zeigen, dass Partikel, die in einer Reaktorkultivierung produziert wurden, anschließend zur Infektion weiterer Zulaufprozesse im Rührkesselreaktor genutzt werden können. Es wurde dabei gezielt die Infektionsdichte variiert, um ihren Einfluss zu untersuchen. Die Ergebnisse haben dabei in Hinblick auf maximale Produktkonzentration einen starken Einfluss der Infektionsdichte gezeigt, wobei eine höhere Infektionsdichte auch zu höheren maximalen Produktkonzentrationen führt.

In der weiteren Analyse der Qualität zeigte sich jedoch, dass die produzierte ssDNA stark verunreinigt ist und zusätzliche Banden in der Agarosegelelektrophorese zu sehen sind. Unklar ist, ob die Veränderung direkt von der Infektionsdichte abhängt oder mit der Qualität des Infektionsgutes zusammenhängt. In jedem Fall ist die produzierte ssDNA nicht für die weitere Verwendung für DNA-Origami geeignet. Selbst wenn gezeigt werden konnte, dass zusätzliche Gelbanden durch Denaturieren der Probe verschwinden, so wird aus den Faltungsversuchen klar, dass es sich nicht um Dimere des Produkts handelt, sondern um Nebenprodukte, wodurch die Faltungsausbeute sehr gering wird oder sogar keine Origami-Objekte gefaltet werden.

Durch die simulierte Kontamination einer Zulaufkultivierung von *E. coli* Wildtyp, mit den vorher im Rührkesselreaktor hergestellten Phagemidpartikeln (cp4(G3)), wurde klar, dass hier selbstreplizierende Partikel vorkommen. Diese haben allerdings nicht die Sequenz des Phagemids, sondern die eines M13 Phagen. Da eine Kontamination durch Parallelversuche ausgeschlossen wurde, kann der selbstreplizierende Phage nur durch Rekombination zwischen dem Phagemid und dem Helferplasmid entstanden sein.

Angesichts der hohen Zahl an Phagen, die von jeder infizierten *E. coli* Zelle gebildet werden, können sich gerade bei Infektionsdichten MOI kleiner 1 tfu cfu^{-1} Varianten durchsetzen, die etwas schneller und etwas mehr gebildet werden als andere. Dieser Effekt wird bereits genutzt, um mit dem M13 Phagen gezielt Sequenzmotive zu evolvieren (Brödel *et al.*, 2016, 2017). In dem hier gezeigten Versuchsaufbau kann das aber bedeuten, dass sich die Produktzusammensetzung stufenweise ändert. Bei jedem Zulaufverfahren im Rührkesselreaktor wird eine gewisse Menge der unerwünschten Partikel durch Rekombination gebildet. Wird diese Partikelmischung dann als Infektionsgut für einen weiteren Zulaufprozess genutzt, setzt sich eine Spezies der Partikel durch, wenn sie denn einen Selektionsvorteil haben.

Durch die Sequenzierung konnte hier gezeigt werden, dass selbstreplizierende Phagen gebildet werden, die nicht auf das Helferplasmid angewiesen sind. Es ist zu vermuten, dass diese zum Beispiel durch effizientere Regulation der M13 Gene besser produziert werden als die erwünschten Phagemide. So setzen sie sich im Prozess durch. Durch Sequenzierung konnte ermittelt werden, dass eine Rekombination zwischen Helferplasmid und Phagemid aufgetreten ist. Dabei wurde auch erkannt, an welchen Punkten die Rekombination zwischen Phagemid und Helferplasmid zustande kommt. Es konnte ermittelt werden, dass beide Plasmide zwei Bereiche großer Sequenzhomologie haben. Ein Bereich davon ist Design bedingt und kann nicht verändert werden. Dadurch dass beide Plasmide entweder Teile oder das ganze Gen 3 tragen, so sind die Teilsequenzen, die auf dem Helferplasmid noch vorhanden sind natürlich homolog zu den entsprechenden Teilen, die auf dem Phagemid vollständig vorliegen. Da diese Sequenzen allerdings funktionell wichtig sind, müssen sie beibehalten werden. Die weitaus kritischere Sequenzhomologie ist eine 114 Basen lange Sequenzüberschneidung zwischen beiden Plasmiden, die zum direkten Austausch des M13 Replikationsursprungs sowie des Verpackungssignals führt. Bei der Sequenz handelt es sich um die Domäne B des M13 Replikationsursprungs. Diese Domäne hat keine direkte Funktion in der Replikation des Phagen, es wird vermutet, dass ihre Anwesenheit die Replikationseffizienz erhöht (Dotto & Zinder, 1984; Dotto *et al.*, 1984; Vieira & Messing, 1987). Auf Grund der geringen Bedeutung für die Replikation des M13 Phagen, wurde diese Sequenz beim Erstellen des Helferplasmids sowie des Phagemids nicht weiter beachtet. Bei Entfernen des M13 ori von dem Helferplasmid ist sie deshalb nicht vollständig entfernt worden.

Da durch diese Sequenzhomologie die Möglichkeit für homologe Rekombination besteht (Berg *et al.*, 2018) und somit die Chance entsteht, dass der M13 Replikationsursprung vom Phagemid auf das Helferplasmid übertragen wird, kann aus dem Helferplasmid wieder ein M13 Phage entstehen. Für einen vollständigen, gänzlich selbstreplizierenden Phagen müssen beide homologen Rekombinationen stattfinden, so dass sowohl der M13 ori als auch das vollständige Gen 3 auf dem ursprünglichen Helferplasmid vorhanden sind. Da allerdings

gezeigt werden konnte, dass bei Infektion von *E. coli* Wildtyp Zellen selbstreplizierende Phagen aufkommen, muss dies trotz der geringen Wahrscheinlichkeit für die doppelte homologe Rekombination stattfinden.

Nachdem die Phagemidpartikel, die zur Kontamination der Zulaufkultivierung der Wildtyp *E. coli* eingesetzt wurden, auch sequenziert wurden, um sicher zu stellen, dass es sich um exakt diese Phagemidpartikel handelt, wird auch klar, dass äußerst geringe Mengen des „Rekombinations-Phagen“ ausreichen, um den gesamten Prozess zu infizieren. Diese geringen Mengen an Phagen in der Phagemidlösung sind nicht per Sequenzierung nachweisbar.

Grundsätzlich ist die Produktion von ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz mit der „Reversen Infektion“ so bereits möglich. Phagemidpartikel, die durch Doppeltransformation produziert wurden, enthalten, wie in Kapitel 6.3 gezeigt, so wenig oder kein Phagenmaterial, dass sie als Infektionsgut für eine Reaktorkultivierung genutzt werden können. Vor allem bei hoher Infektionsdichte $MOI > 1$ $tfu\ cfu^{-1}$ sollte so nahezu ausschließlich Phagemid ssDNA gebildet werden. Diese wäre dann auch ausreichend rein, um DNA-Origami-Objekte daraus zu falten. Da in der Kultivierung allerdings „Rekombinations-Phagen“ entstehen, ermöglicht dieser Prozess keine Prozesssicherheit für nachfolgende Prozesse. Bei Kreuzkontamination würde sich der Phage durchsetzen und damit Kultivierungen möglicherweise unbrauchbar machen. Eine Herstellung bei Lohnherstellern ist so nicht denkbar.

Zusätzlich ergibt sich damit eine weitere Schwierigkeit in der Maßstabsübertragung. Wie bereits gezeigt, lassen sich Phagemidpartikel durch Doppeltransformation nur in geringer Menge produzieren. Wenn gleichzeitig eine hohe Infektionsdichte nötig ist, wird die Produktion von Infektionsgut sehr aufwändig, sobald der Produktionsmaßstab sehr groß wird.

Demnach ist es für ein skalierbares Produktionssystem notwendig, die Ursachen der homologen Rekombination zu beseitigen, so dass keine selbst replizierenden Partikel entstehen.

6.5 Optimiertes Zweiplasmidsystem

Um die Ursachen der homologen Rekombination zu beseitigen, wurde ein neues Phagemid designt, welches keine Sequenzüberlappung mit dem Helferplasmid in der näheren Sequenzumgebung des Verpackungssignals und M13 ori hat.

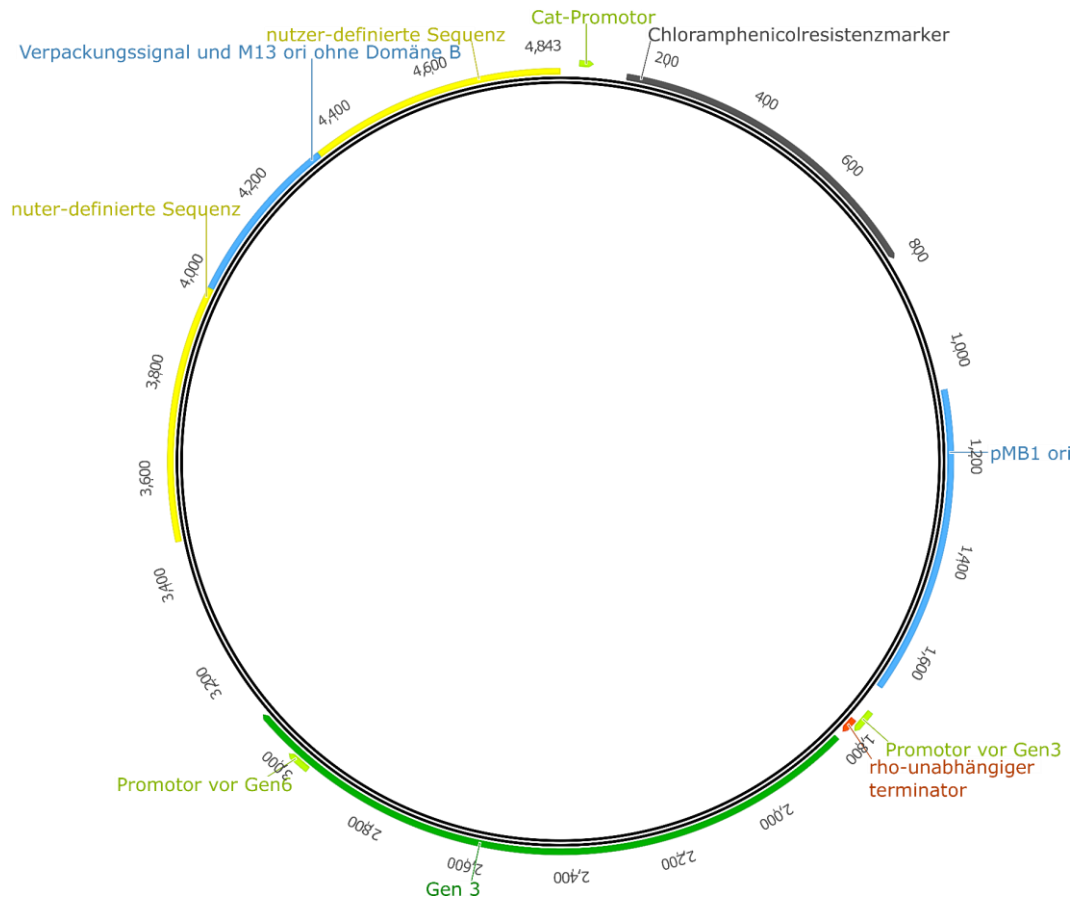


Abbildung 6.14: Plasmidkarte des Phagemids cp5(G3). Das Plasmidrückgrat stammt aus cp4(G3) gemeinsam mit der Expressionskassette für Gen 3. Anstelle des M13 ori und der nutzerdefinierten Sequenz wurde eine neue nutzerdefinierte Sequenz eingefügt in deren Mitte das Verpackungssignal und der M13 ori ohne Domäne B verankert sind. Die restliche nutzerdefinierte Sequenz ist eine De Bruijn Sequenz fünfter Ordnung.

Wie in Abbildung 6.14 gezeigt wurde dafür das Phagemid cp4(G3) als Vorlage genutzt. Von diesem Phagemid wurde die nutzerdefinierte Sequenz sowie der M13 ori samt Verpackungssignal entfernt. Anschließend wurde das Verpackungssignal und der M13 ori ohne die Domäne B in die Mitte einer berechneten Sequenz, in der keine Abfolge von 5 Basen mehr als einmal vorkommt (De Bruijn Sequenz 5ter Ordnung), eingefügt und dieses Konstrukt in das vorher erstellte Plasmidrückgrat eingesetzt. So existiert mit diesem Phagemid lediglich eine Sequenzüberlappung mit dem Helferplasmid in der Region der Gen 3 Expressionskassette. Da allerdings eine homologe Rekombination hier nicht zur Bildung eines selbstreplizierenden Phagen führt, sondern höchstens zur Bildung eines vollständigen Helferplasmids, ist dieser Sequenzüberlapp nicht entscheidend.

Zusätzlich wurde ein weiteres Helferplasmid designt und erstellt. Hierfür wurden die Ergebnisse aus dem Kapitel 6.1, die gezeigt haben, dass eine Überexpression von Gen 2 und 10 von Vorteil sind, mitberücksichtigt. Außerdem wurde die Region der vorher ermittelten Sequenzüberlappung in zwei Teile zerteilt, um auch so die Wahrscheinlichkeit für homologe Rekombination bei Verwendung älterer Phagemide zu reduzieren.

Dafür wurde, wie in Abbildung 6.15 gezeigt, eine zusätzliche Expressionskassette für Gen 6 mitten in die Sequenzhomologie eingefügt. Dabei war die kodierende Sequenz von dem zusätzlichen Gen 6 so kodonoptimiert, dass keine Sequenzhomologie zu dem vorhandenen Gen 6 entsteht.

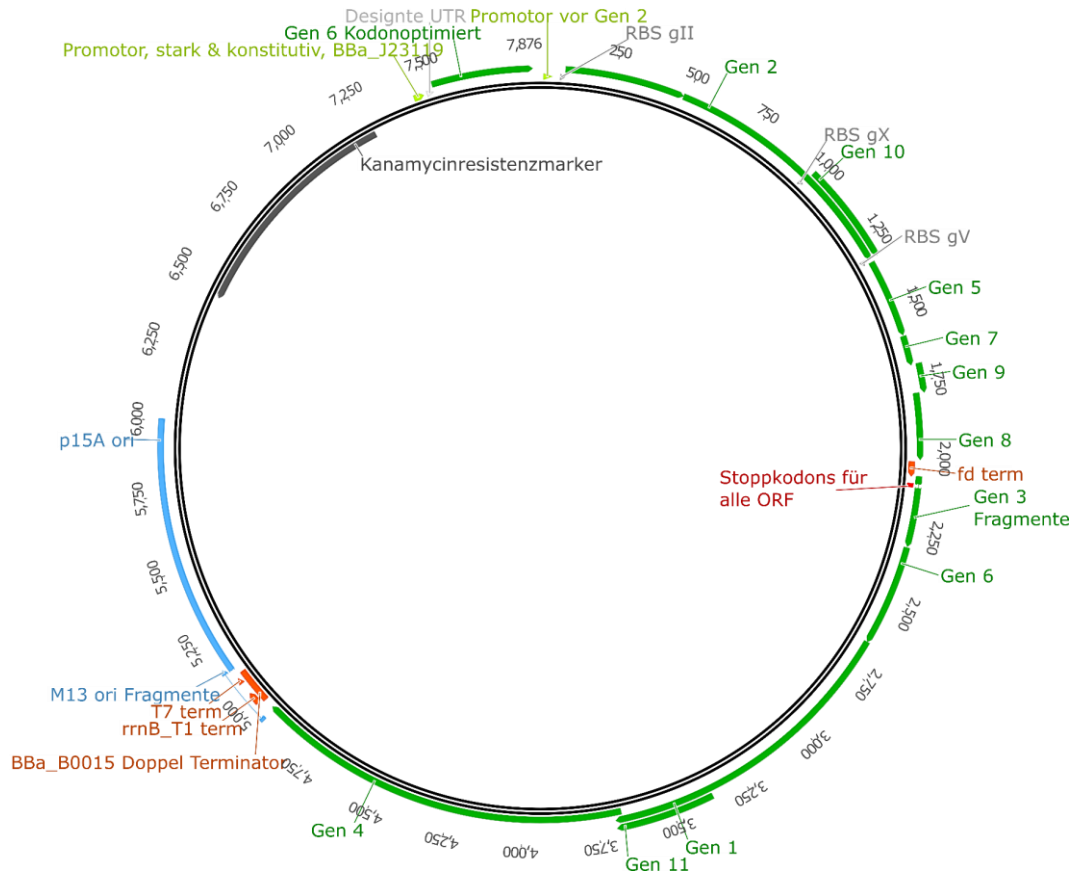


Abbildung 6.15: Plasmidkarte des Helferplasmids pfhp30. Das Helferplasmid basiert auf dem Helferplasmid pfhp24 es wurde allerdings ein starker Promotor gemeinsam mit einer Expressionskassette für Gen 6 vor dem Promotor für Gen 2 eingefügt. Die kodierende Sequenz des zusätzlichen Gen 6 wurde so kodonoptimiert, dass keine homologe Rekombination mit dem ursprünglichen Gen 6 auftritt.

Zur Expression wurde dabei ein starker, unregulierter Promotor und eine rational designte Ribosombindestelle (RBS) eingesetzt. Die RBS war so designt, dass keine besonders hohen Level an Protein 6 produziert werden. Überexpression von Gen 6 hatte bisher weder positive noch negative Effekte gezeigt. Durch den starken Promotor und den bewussten Verzicht auf einen Terminator, wurde hier jedoch ein bicistronisches Konstrukt entwickelt, wobei durch den Promotor auch die Gene 2 und 10 abgeschrieben werden. Durch die entstehende RNA wird also auch deren Expression verstärkt, was sich positiv auf die Produktivität auswirken sollte. Die restliche Sequenz des Helferplasmids pfhp30 ist identisch zu der von pfhp24.

Mit den neu designten Plasmiden wurden Hochzelldichtekultivierungen im Zulaufbetrieb wie zuvor durchgeführt. Dazu wurde für eine gute Vergleichbarkeit stets mit einer Infektionsdichte $MOI = 1 \text{ tfu cfu}^{-1}$ infiziert. Diese hatte sich in Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) als optimal für den Infektionszeitpunkt 5 Stunden nach Zulaufstart erwiesen.

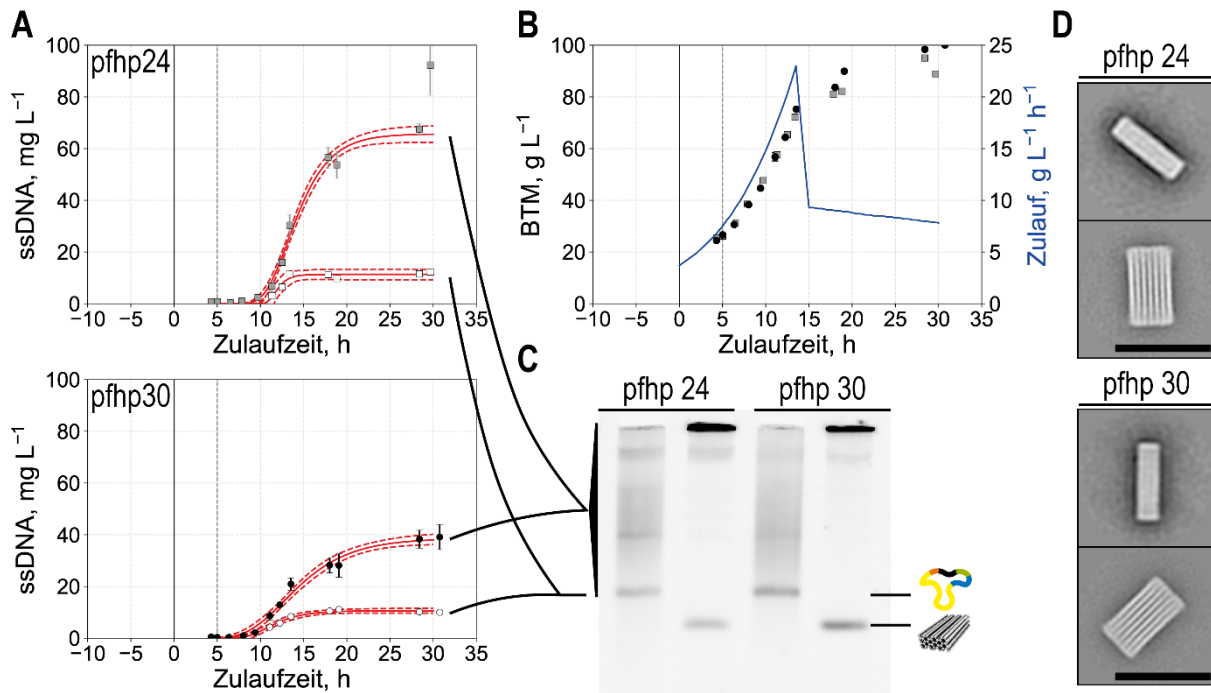


Abbildung 6.16: Zwei Hochzelldichtekultivierungen im Rührkesselreaktor bei 37°C von *E. coli* JM109 transformiert mit dem Helferplasmid pfhp24 (graue Quadrate) oder pfhp30 (schwarze Punkte). Fünf Stunden nach Zulaufstart wurde mit Phagemidpartikeln cp5(G3) infiziert. **A:** Veränderung der ssDNA Konzentration über die Prozesszeit relativ zum Zulaufstart (Zulaufzeit). Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt und anschließend der Anteil an Produkt ssDNA graphisch mit Hilfe der Software Fiji aus AGEP-Bildern bestimmt (pfhp24: weiße Quadrate; pfhp30: weiße Punkte). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung technischer Replikate dar. Rote Linien: sigmoidaler Fit (durchgehend), 95% Konfidenzbänder (gestrichelt). **B:** Änderung der Biotrockenmassekonzentration über die Zulaufzeit und Zulaufprofil für beide Prozesse. **C:** AGEP der ssDNA, die hier produziert wurde (jeweils linke Spur) sowie des 42 Helix-Bündels, welches damit gefaltet wurde (jeweils rechte Spur). **D:** Durchschnittsbilder aus TEM-Aufnahmen des gefalteten 42 Helix-Bündels. Maßstabsbalken: 50 nm.

Wie in Abbildung 6.16 gezeigt, war das Wachstum der *E. coli* hier sehr vergleichbar zu den Reaktorkultivierungen in Kapitel 6.3. Hier wurde allerdings mit *E. coli* JM109 gearbeitet, da diese weniger zu homologer Rekombination neigten als *E. coli* NEB-turbo, da JM109, wie in Kapitel 4.3.1 gezeigt, *recA1* defizient ist, NEB-turbo jedoch nicht.

Die Konzentration der isolierten ssDNA erreichte mit pfhp24 mit etwa 65 mg L⁻¹ einen höheren Wert als bei pfhp30, für den lediglich 40 mg L⁻¹ isoliert werden konnte. Bei Analyse der Proben im Prozessverlauf mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese war allerdings ersichtlich, dass mit pfhp24 ein höherer Anteil an Nebenprodukten und Verunreinigungen enthalten war.

Um die Relation zwischen Produkt und jeglichen Verunreinigungen zu ermitteln, wurden die Gelspuren der einzelnen Überstandsproben mit Hilfe der Bildanalysesoftware Fiji analysiert. Es wurde aus jeder Spur ein Intensitätshistogramm erstellt und daraus der Flächeninhalt unter der Kurve ermittelt. Dieser wurde dann in Relation zu dem Flächeninhalt des Peaks der Produktbande gesetzt. Aus den so ermittelten Verhältnissen zwischen Produkt und Verunreinigungen, konnte die produzierte cp5(G3) ssDNA-Konzentration errechnet werden. Damit ergab sich für pfhp24 eine maximale cp5(G3) ssDNA-Konzentration von etwa 12 mg L⁻¹

und für pfhp30 eine von 10 mg L^{-1} . Demnach ist die deutlich höhere messbare ssDNA Konzentration bei pfhp24 vor allem durch Verunreinigungen der Proben bedingt.

In beiden Fällen ließ sich die erzeugte Produkt ssDNA sauber zu 42 Helix-Bündel DNA-Origami-Objekten falten. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen (TEM-Aufnahmen), die von den Kooperationspartnern am Physikdepartment der TUM angefertigt wurden, zeigen, dass keine Defekte in den Strukturen vorliegen.

Diskussion

In der Zulaufkultivierung von *E. coli* JM109 transformiert mit pfhp24 im Rührkesselreaktor ist zu erkennen, dass ähnlich viel ssDNA gebildet wird, wie bei dem Prozess gezeigt in Kapitel 6.3. Demnach ist die ssDNA Produktion des hier eingesetzten Stamms *E. coli* JM109 im Zulaufverfahren nicht nennenswert anders als die von *E. coli* NEB-turbo.

Das Entfernen der Domäne B vom M13 ori in dem Hier verwendeten Phagemid cp5(G3) im Vergleich zu dem vorher verwendeten Phagemid cp4(G3) scheint zunächst auch keinen massiven Einfluss auf die maximale ssDNA-Konzentration zu haben. Wird allerdings die Bildauswertung der Agarosegelelektrophorese für den Prozess aus Kapitel 6.3 gemacht, so ergibt sich hier eine maximale cp4(G3) ssDNA-Konzentration von 55 mg L^{-1} .

Werden also die Konzentrationen der Phagemid ssDNA in den Zulaufkultivierungen mit pfhp24 verglichen (12 mg L^{-1} mit *E. coli* JM109 und Phagemid cp5(G3) zu 55 mg L^{-1} *E. coli* NEB-turbo und Phagemid cp4(G3)), kann nicht sicher gesagt werden, ob der Unterschied durch das Phagemid oder den *E. coli* Stamm bedingt ist.

Mit dem neu designten Helferplasmid pfhp30 konnte in der Zulaufkultivierung im Rührkesselreaktor zwar bereits die Nebenproduktbildung reduziert werden, die Menge an Produkt ist jedoch nicht höher, verglichen zu dem Helferplasmid pfhp24. Basierend auf vorhandener Literatur müsste eine verstärkte Expression der Gene 2 und 10 bei entfernen der Domäne B vom M13 ori (wie bei dem eingesetzten Phagemid cp5(G3) geschehen) zu höheren ssDNA-Konzentrationen führen (Dotto & Zinder, 1984; Vieira & Messing, 1987). Auch wenn zuvor in Kapitel 6.1 gezeigt werden, dass durch Überexpression von Gen 2 und 10 höhere ssDNA-Konzentrationen nach einer M13 Infektion erzielt werden konnten, konnte dies hier nicht beobachtet werden.

In beiden Zulaufkultivierungen im Rührkesselreaktor, die mit dem Phagemid cp5(G3) infiziert wurden, wurde, wenn auch weniger mit pfhp30, viel Nebenprodukt gebildet. Die Menge an Nebenprodukten zu reduzieren wäre für die Reinigung der ssDNA von Vorteil.

6.6 Verbesserung der Produktionsbedingungen durch Temperaturvariation

Um die erzielten Ausbeuten noch weiter zu verbessern, wurde anschließend der Einfluss der Temperatur während der ssDNA Produktion untersucht. Die Temperatur wurde als Parameter gewählt, da hierzu noch keine Erkenntnisse aus vorangegangenen Arbeiten vorlagen, und bekannt ist, dass sie eine entscheidende Rolle bei der Produktion von Proteinen spielt. Da Proteine für die Replikation und das Kapsid benötigt werden könnte die Temperatur auch für die ssDNA-Produktion von Bedeutung sein.

Hierfür wurden Schüttelkolbenexperimente durchgeführt, deren Inkubationstemperatur variiert wurde. Die Schüttelkolben wurden dafür zunächst bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,2$ inkubiert und anschließend bei Temperaturen zwischen 25°C und 37°C weiter inkubiert. Bei Erreichen der optischen Dichte $OD_{600} = 0,4$ wurde mit Phagemidpartikeln infiziert.

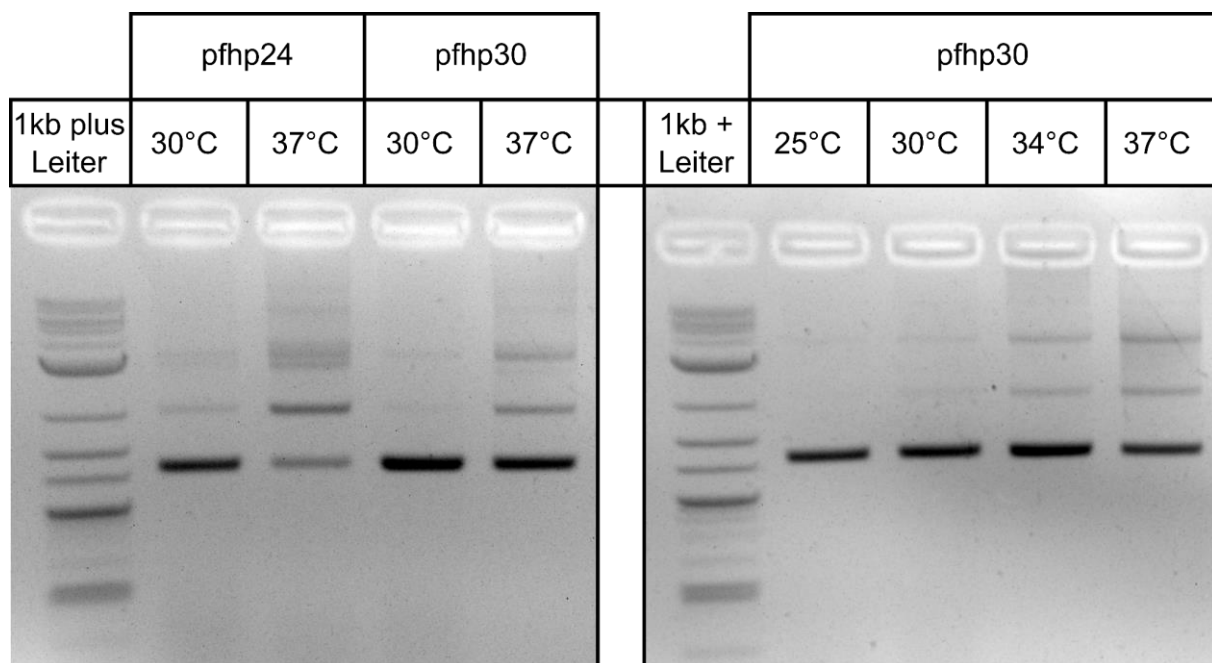


Abbildung 6.17: Agarosegelelektrophoresen der ssDNA aus verschiedenen Schüttelkolbenkultivierungen mit *E. coli* JM109 transformiert mit entweder pfhp24 oder pfhp30. Zu Beginn wurden alle Kulturen bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen von $OD_{600} = 0,2$ wurde die Temperatur auf die jeweils angegebene Temperatur reduziert. Bei Erreichen von $OD_{600} = 0,4$ wurde mit Phagemidpartikeln cp5(G3) infiziert. Bei der vorauslaufenden Bande handelt es sich um die Produkt ssDNA. Alle Nebenprodukte und Verunreinigungen sind oberhalb davon.

Wie in der Agarosegelelektrophorese in Abbildung 6.17 zu erkennen ist, war dabei eine Absenkung der Temperatur vorteilhaft für die Qualität der produzierten ssDNA. So konnte für beide Helferplasmide eine deutlich geringere Verunreinigung der ssDNA bei 30°C beobachtet werden. Für pfhp30 wurde gezeigt, dass die Qualität graduell mit sinkender Produktionstemperatur besser wird. Bei 30°C konnte dabei eine maximale ssDNA-

Konzentration von $3,25 \text{ mg L}^{-1}$ (pfhp24) bzw. $4,15 \text{ mg L}^{-1}$ (pfhp30) erreicht werden, während bei 37°C lediglich $1,7 \text{ mg L}^{-1}$ (pfhp24) und $1,36 \text{ mg L}^{-1}$ (pfhp30) erreicht wurden. Demnach wurde bei 30°C eine 3-fach höhere maximale ssDNA-Konzentration erreicht als bei 37°C , wobei dabei auch noch mehr Verunreinigungen vorlagen. Für pfhp30 war die ssDNA zwar bei 25°C noch sauberer als bei 30°C , doch die Unterschiede sind lediglich marginal und die maximale ssDNA-Konzentration war bereits wieder um das 1,68-fache reduziert.

Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde auch die Produktionstemperatur während der Hochzelldichtekultivierung im Rührkesselreaktor auf 30°C verringert. Die Temperatur wurde dafür 30 Minuten vor Infektion reduziert. Dabei wurde die sonstige Prozessführung wie zuvor beibehalten. In Abbildung 6.18 ist zu erkennen, dass dadurch starke Veränderungen in der Zulaufkultivierung mit pfhp24 auftraten. Hier war bereits nach 10 Stunden Zulaufzeit die Gelöstsauerstoffkonzentration selbst bei maximalem Sauerstoffeintrag nicht über 5% Luftsättigung zu halten. Deshalb musste zunächst die Substratzufuhr reduziert werden. Nach etwas über 16 Stunden Zulaufzeit musste der Prozess beendet werden, da die Sauerstoffsättigung durch keine Maßnahme mehr angehoben werden konnte.

In dem Prozess mit pfhp30 musste zwar auch nach 13 Stunden Zulaufzeit der Zulauf reduziert werden, allerdings war bei niedriger Zulauftrate ein Betrieb bis zum geplanten Prozessende möglich. So wurde auch die für diese Prozesse übliche maximale Biomassekonzentration erreicht. Bei der Bestimmung der ssDNA Konzentration wurde genau wie vorher bei den Prozessen bei 37°C vorgegangen. So konnte eine maximale, photometrisch messbare ssDNA Konzentration von rund 136 mg L^{-1} ermittelt werden und durch Graphische Analyse der Agarosegelelektrophorese daraus eine maximale cp5(G3) ssDNA-Konzentration von 83 mg L^{-1} errechnet werden.

Obwohl der Zulaufprozess mit pfhp24 frühzeitig abgebrochen werden musste, ließ sich aus der ssDNA aus beiden Kultivierungen sauber das 42 Helix-Bündel DNA-Origami-Objekt falten. Auch hier zeigen die TEM-Aufnahmen (die von den Kooperationspartnern am Physik-department der TUM angefertigt wurden) keinerlei Defekte in der Struktur.

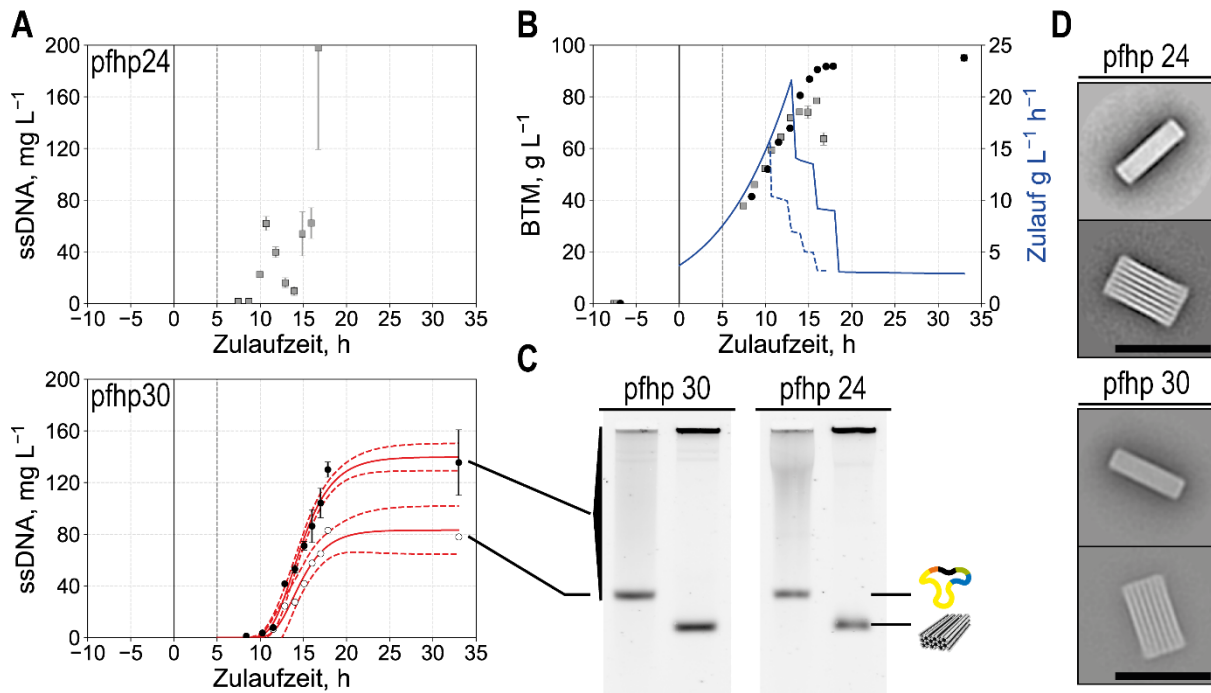


Abbildung 6.18: Zwei Hochzelldichtekultivierungen im Rührkesselreaktor bei 37°C bzw. 30°C von *E. coli* JM109 transformiert mit dem Helferplasmid pfhp24 (graue Quadrate) oder pfhp30 (schwarze Punkte). Fünf Stunden nach Zulaufstart wurde mit Phagemidpartikeln cp5(G3) infiziert. Die Temperatur wurde 30 min vor Infektion auf 30°C reduziert. **A:** Veränderung der ssDNA Konzentration über die Prozesszeit relativ zum Zulaufstart (Zulaufzeit). Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt und anschließend der Anteil an Produkt ssDNA für pfhp30 graphisch mit Hilfe der Software Fiji aus AGEP-Bildern bestimmt (pfhp30: weiße Punkte). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung technischer Replikate dar. Rote Linien: sigmoidaler Fit (durchgehend), 95% Konfidenzbänder (gestrichelt). **B:** Änderung der Biotrockenmassekonzentration über die Zulaufzeit und Zulaufprofil (durchgehende Linie: Prozess mit pfhp30; gestrichelte Linie: Prozess mit pfhp24). **C:** AGEP der ssDNA, die hier produziert wurde (jeweils linke Spur), sowie des 42 Helix-Bündels, welches damit gefaltet wurde (jeweils rechte Spur). **D:** Durchschnittsbilder aus TEM-Aufnahmen des gefalteten 42 Helix-Bündels. Maßstabsbalken: 50 nm.

Um besser zu verstehen, weshalb der Sauerstoffeintrag in die Kulturen viel schlechter wurde, kann die in Abbildung 6.19 gezeigte dynamische Viskosität der Kultur betrachtet werden, die für beide Kultivierungen prozessbegleitend aufgezeichnet wurde.

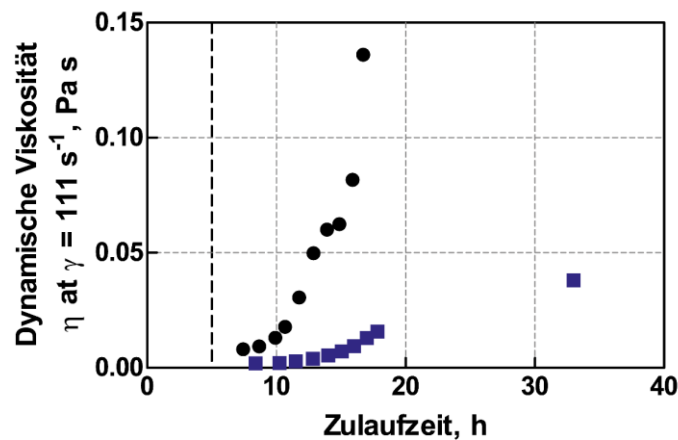


Abbildung 6.19: Veränderung der dynamischen Viskosität über die Zulaufzeit bei den beiden Hochzelldichtekultivierungen mit *E. coli* JM109 transformiert mit pfhp24 (schwarze Punkte) oder pfhp30 (blaue Quadrate) gezeigt in Abbildung 6.18. Der Infektionszeitpunkt 5 Stunden nach Zulaufstart ist durch die vertikale gestrichelte Linie gekennzeichnet.

Hier ist zu erkennen, dass in der Zulaufkultivierung im Rührkesselreaktor mit pfhp24 bei 30°C ein massiver Anstieg der Viskosität der Kultur vorliegt. Bei pfhp30 steigt die Viskosität zwar auch an, aber bei weitem nicht so stark. Es konnte nicht exakt ermittelt werden, weshalb die Viskosität so ansteigt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Lösung ein scherverdünnendes Verhalten an den Tag legt (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde noch gezeigt, dass die ssDNA Produktion mit *E. coli* JM109 transformiert mit pfhp30 bei einer Produktionstemperatur von 30°C reproduzierbar ist. In Abbildung 6.20 ist deshalb die Kultivierung aus Abbildung 6.18 (im Weiteren Kultivierung 30-1 genannt) im Vergleich zu einer weiteren Kultivierung (Kultivierung 30-2) gezeigt. Beide Zulaufprozesse wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

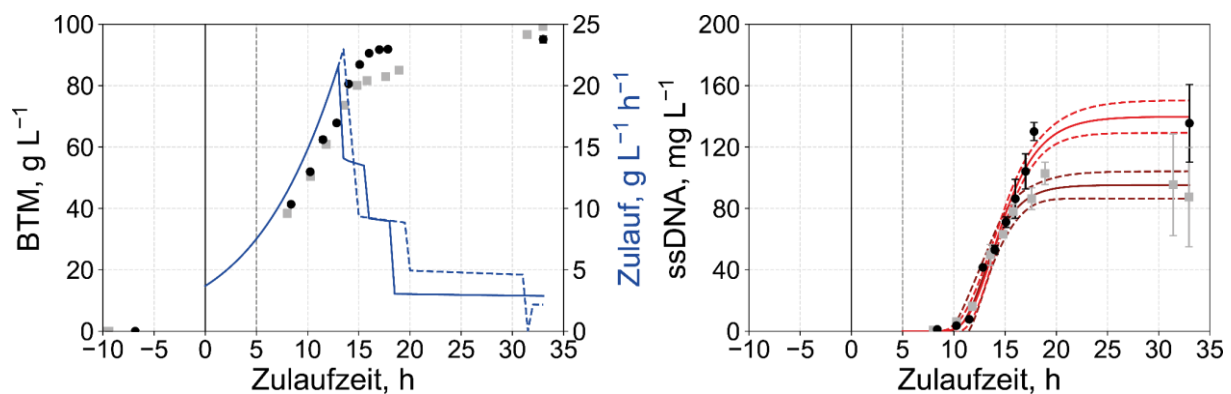


Abbildung 6.20: Vergleich zweier Hochzelldichtekultivierungen von *E. coli* JM109 transformiert mit pfhp30. 4,5 Stunden nach Zulaufstart wurde die Temperatur von 37°C auf 30°C reduziert. 5 Stunden nach Zulaufstart wurde mit Phagemidpartikeln cp5(G3) infiziert. Schwarze Punkte (Kultivierung30-1): Kultivierung gezeigt in Abbildung 6.18; graue Quadrate (Kultivierung30-2): Kultivierung bei gleichen Bedingungen als Reproduktion. Links: Biotrockenmassekonzentration über Zulaufzeit und Zulaufmassenstrom (Hauptsubstrat Glukose) über die Zulaufzeit. Durchgehende, blaue Linie korrespondiert zu schwarzen Punkten; gestrichelte, blaue Linie korrespondiert zu grauen Quadraten. Rechts: Veränderung der ssDNA Konzentration über die Prozesszeit relativ zum Zulaufstart (Zulaufzeit). Die Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung technischer Replikate dar. Rote Linien: sigmoidaler Fit (durchgehend), 95% Konfidenzbänder (gestrichelt).

Es kann erkannt werden, dass bis etwa 17 Stunden Zulaufzeit ein sehr ähnlicher Verlauf der ssDNA Konzentration zu verzeichnen ist. Danach weichen die beiden Kultivierungen leicht voneinander ab und erreichen etwas unterschiedliche maximale ssDNA Konzentrationen. Wird allerdings die Analyse mittels Agarosegelelektrophorese aller Proben der beiden Zulaufprozesse betrachtet, die in Abbildung 6.21 gezeigt ist, so ist auch zu erkennen, dass bei Kultivierung 30-2 etwas weniger Verunreinigungen zum Ende der Kultivierung im Vergleich zu Kultivierung 30-1 vorliegen.

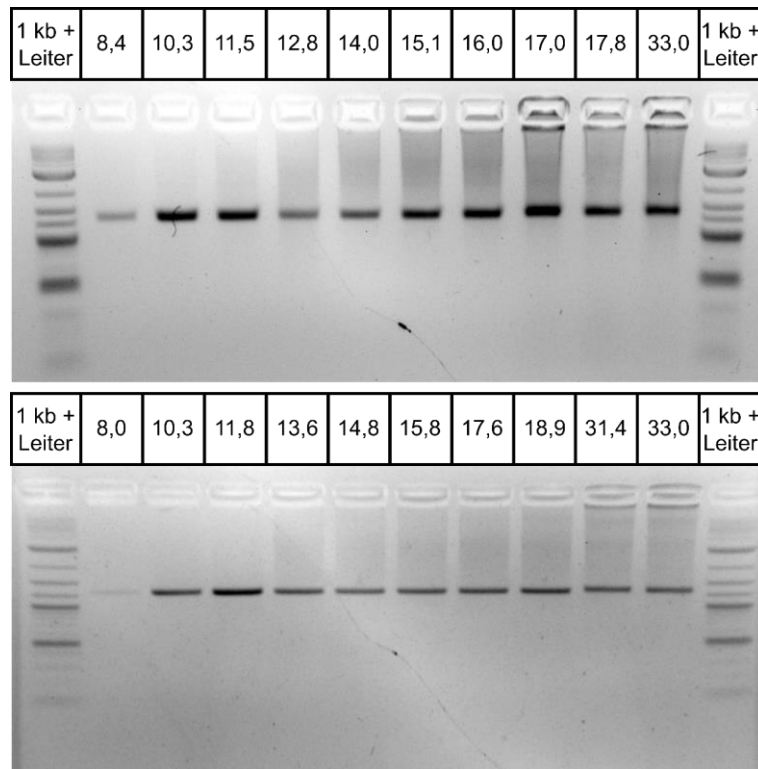


Abbildung 6.21: Agarosegelelektrophoresen der ssDNA aus den Hochzelldichtekultivierungen gezeigt in Abbildung 6.20. Zahlen über den Gelspuren stehen für die Zulaufzeit in Stunden. Oberes Gel: Kultivierung 30-1; unteres Gel: Kultivierung 30-2. Bei der vorauslaufenden Bande handelt es sich um die Produkt ssDNA. Alle Nebenprodukte und Verunreinigungen sind oberhalb davon.

Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Produktionstemperatur von 30°C nicht nur die ssDNA-Konzentration gesteigert werden kann, sondern auch die Produktreinheit deutlich verbessert werden kann. Dabei zeigte sich, dass mit Helferplasmid pfhp30 höhere Produktkonzentrationen im Schüttelkolben erzielt werden können als mit Helferplasmid pfhp24. Es ist bekannt, dass viele Proteine bei Temperaturen unter 37°C besser produziert und gefaltet werden können (Schein & Noteborn, 1988). Möglicherweise sind hier die gesenkten Temperaturen notwendig, um die Phagen-Proteine optimal produzieren zu können. Eventuell kommt nur so die stärkere Expression der Gene 2 und 10 zum Tragen.

Mit Anpassung der Produktionstemperatur auf 30°C konnte anschließend mit dem Helferplasmid pfhp30 auch die ssDNA Konzentration in der Hochzelldichtekultivierung deutlich gesteigert werden. Mit einer Ausbeute von 83 mg L⁻¹ der gewünschten Produkt-ssDNA werden vergleichbar hohe Mengen erzielt wie bei der Produktion mit Hilfe von Helferphagen (Praetorius *et al.*, 2017). Verglichen mit publizierten Prozessen zur Herstellung von ssDNA mit der Doppeltransformationsmethode konnte sogar eine Steigerung der finalen ssDNA-Konzentration um den Faktor 40 erreicht werden (Shepherd *et al.*, 2019). Angesichts der Analysen mittels Agarosegelelektrophorese und der sehr guten Ergebnisse bei der Faltung

von DNA-Origami-Objekten mit dieser ssDNA wird auch eine sehr gute Qualität der ssDNA erreicht.

Bei dem Zulaufprozess im Rührkesselreaktor mit dem Helferplasmid pfp24 konnte bei einer Produktionstemperatur von 30°C allerdings keine gute ssDNA Produktion beobachtet werden. Durch den starken Anstieg der dynamischen Viskosität konnte nicht nur kein ausreichender Sauerstoffeintrag sichergestellt werden, die Viskosität stellte auch ein Problem bei der Isolation der ssDNA dar. Durch die hohe Viskosität lassen sich die verschiedenen Zentrifugationsschritte, die Teil der ssDNA Isolierung sind nicht mehr sauber durchführen. Dadurch treten hohe Produktverluste bei gleichzeitiger Verunreinigung der Probe auf. Deshalb war die ssDNA Isolierung mit so großen Fehlern behaftet, dass hier nicht auf die gezeigten Messwerte vertraut werden kann. Unklar ist, weshalb die Viskosität so stark anstieg. Eine mögliche Erklärung könnte Zellyse sein. Durch diese wurde vermutlich genomische DNA freigesetzt, die dann die hohe Viskosität bedingt. Hierfür spricht, dass ein scherverdünnendes Verhalten beobachtet werden konnte, welches besonders für Polymerlösungen üblich ist (Chmiel *et al.*, 2018). Die genomische DNA stellt hier das hochmolekulare Polymer dar, welches dieses Verhalten hervorruft. Der Zusammenhang der Änderung der Viskosität des Reaktormediums durch Zellyse und damit freigesetzte DNA konnte bereits zuvor beschrieben werden (Castan & Enfors, 2000).

Da die Produktion von ssDNA mit *E. coli* JM109 transformiert mit Helferplasmid pfp24 bei einer Produktionstemperatur von 30°C zu einer hohen Viskosität der *E. coli* Suspension führt, was die ssDNA Isolation stark beeinträchtigt, während dieses Problem mit *E. coli* JM109 transformiert mit pfp30 nicht auftritt, wurde dieser Prozess reproduziert, um zu zeigen, dass die Ergebnisse bei gleichem Versuchsaufbau wiederholbar sind. Durch ein weiteres Zulaufverfahren konnte gezeigt werden, dass dies bis mindestens 17 Stunden Zulaufzeit der Fall ist. Da auch hier die Viskosität der Kultur nach 17 Stunden Zulaufzeit weiter zugenommen hat, ist zudem ein Prozessende nach diesen 17 Stunden zu empfehlen. Die ssDNA-Konzentration kann über diesen Zeitpunkt nicht nennenswert gesteigert werden, durch die steigende Viskosität erschwert sich jedoch die ssDNA Isolation.

6.7 Prozesssicherheit bei Kreuzkontamination

Durch Entfernen von Sequenzen die zwischen Helferplasmid und Phagemid homolog waren, konnte Rekombination vermieden werden und die in Zulaufprozessen im Rührkesselreaktor hergestellte ssDNA wies stets die korrekte Sequenz auf. Somit war sie auch immer geeignet, DNA-Origami-Objekte damit zu falten. Nun muss noch gezeigt werden, dass die in den

Prozessen hergestellten Phagemidpartikel weder selbstreplizierend sind, noch irgendwelche selbstreplizierenden Partikel enthalten.

Dazu wurden zwei Hochzelldichtekultivierungen durchgeführt. Für beide Kultivierungen wurde *E. coli* JM109 Wildtyp eingesetzt, die abgesehen vom F-Plasmid kein zusätzliches Plasmid tragen. In einer Kultivierung wurde das Wachstum und die Menge an DNA im Kultivierungsüberstand ohne Infektion durch Phagemide oder M13 Phagen untersucht. In der zweiten Kultivierung wurde dann wie in Kapitel 6.4 eine starke Kontamination des Rührkesselreaktors simuliert, indem kurz nach Inokulation Phagemidpartikel aus einem vorangegangenen Zulaufprozess zugegeben wurden.

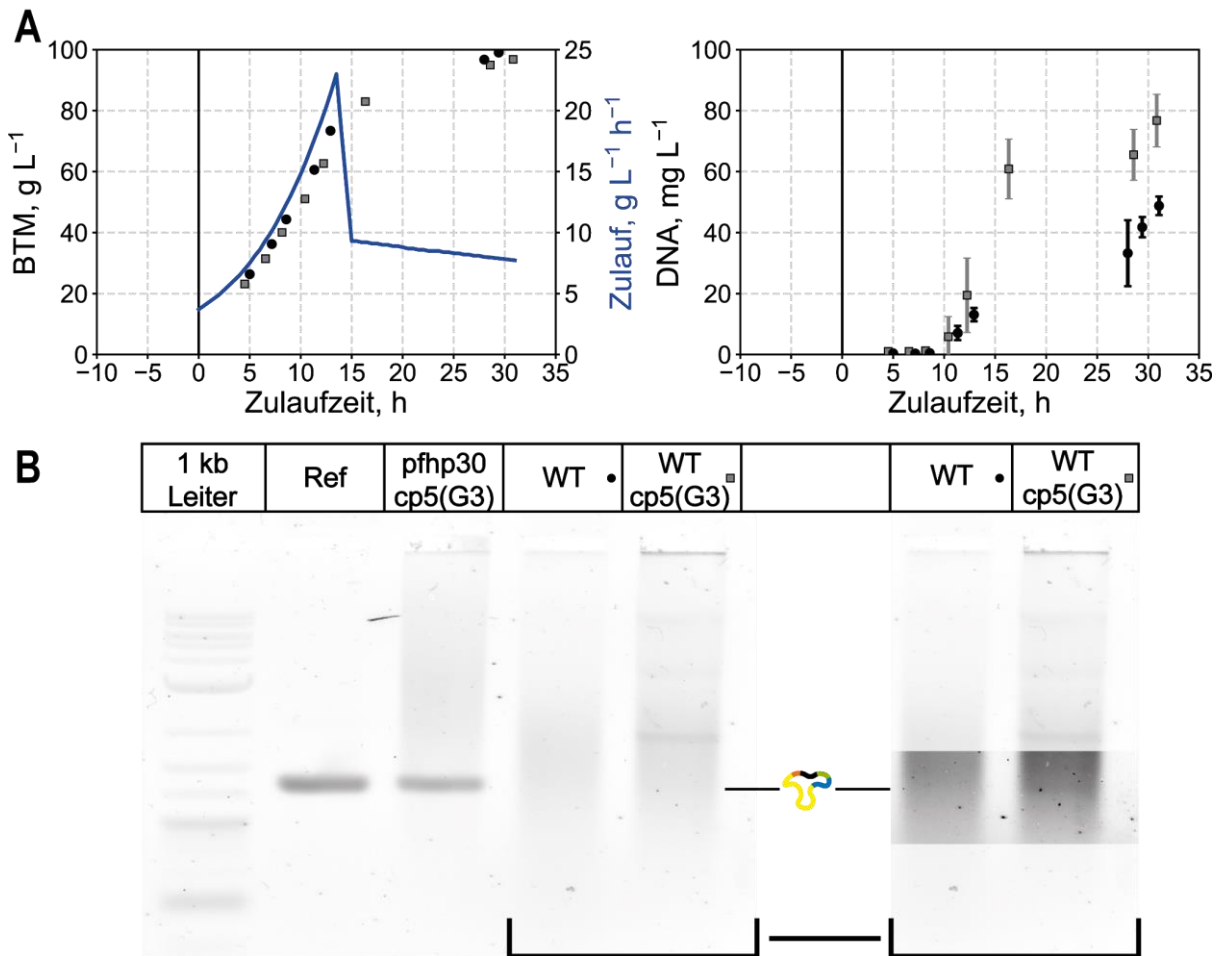


Abbildung 6.22: Zwei Hochzelldichtekultivierungen im Rührkesselreaktor von *E. coli* JM109 Wildtyp bei 37°C. **A**: Änderung der Biotrockenmassekonzentration, des Zulaufmassenstroms und der DNA-Konzentration über die Zulaufzeit. In einer der beiden Kultivierungen fand keine Infektion statt (schwarze Punkte), in der anderen wurde eine starke Kontamination mit Phagemidpartikeln (cp5(G3)) simuliert, indem diese kurz nach Inokulation zugegeben wurden (graue Quadrate). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung technischer Replikate dar. **B**: AGEP der isolierten DNA bei Ende der Kultivierungen. Die Referenz (Ref) ist die cp5(G3) ssDNA. Zusätzlich ist die cp5(G3) ssDNA aus einer Hochzelldichtekultivierung mit pfhp30 (pfhp30 cp5(G3)) als weitere Referenz aufgetragen. WT stellt die Spur ohne Infektion und WT cp5(G3) die mit simulierter Kontamination dar. Rechts sind die letzten beiden Spuren des Gels erneut dargestellt, für den Bereich in dem cp5(G3) ssDNA zu erwarten wäre wurde die Bildintensität stark angehoben. Hier sind dennoch keine Banden erkennbar.

Dabei ergab sich, wie in Abbildung 6.22 zu sehen ist, kein Unterschied im Wachstumsverhalten. Beide Zulaufprozesse erreichten eine maximale Biotrockenmassenkonzentration von nahezu 100 g L^{-1} . Die DNA im Kulturüberstand wurde genauso isoliert wie die ssDNA aus Phagemidpartikeln. So wird hier auch jegliche Phagen basierte DNA sichtbar. Es zeigt sich dabei ein linearer Anstieg nach etwa 10 Stunden Zulaufzeit. Dabei ergibt sich ein leichter Unterschied zwischen beiden Kultivierungen, wobei etwas mehr DNA im Überstand der Kultivierung mit Kontamination nachgewiesen werden kann.

In der Agarosegelelektrophorese in Abbildung 6.22 **B** wird allerdings ersichtlich, dass in keiner der beiden Kultivierungen die ssDNA des Phagemids gebildet wurde. In der Kultivierung mit Kontamination werden lediglich drei sehr blasse Banden oberhalb der erwarteten Laufweite sichtbar.

Diskussion

Dass die beiden Wachstumskurven der beiden Kultivierungen nicht stark voneinander abweichen, ist wenig verwunderlich, nachdem auch die Wachstumskurven der Produktionsprozesse keinen nennenswerten Unterschied zu der Vergleichskultivierung ohne Infektion aufweisen. Dies liegt vermutlich daran, dass die Produktion von M13 Phagen keinen starken Einfluss auf die Biomasseausbeute hat (Kick, Behler, *et al.*, 2017) und bei den hier gezeigten Prozessen die Substratzufuhr stets deutlich unter der maximalen Wachstumsrate lag.

Dass bei beiden Prozessen die Menge an DNA im Kulturüberstand nach einer gewissen Prozesszeit zunimmt, ist vermutlich über Zellyse zu erklären. Diese tritt in Hochzelldichtekultivierungen generell in geringem Ausmaß, gekoppelt an Sauerstoffversorgung und die Bildung von Stoffwechselnebenprodukten auf (Castan & Enfors, 2000, 2001). Dadurch, dass in dem Prozess mit Kontamination keine ssDNA Bande auf Höhe der ssDNA des Phagemids zu sehen ist, kann gefolgert werden, dass die Phagemidpartikel nicht selbstreplizierend sind. Dies eröffnet nur die Frage, ob neben den Phagemidpartikeln, wie in Kapitel 6.4 noch Phagen vorkommen, die eventuell doch durch Rekombination entstehen.

Werden allerdings die Agarosegelelektrophorese-Lauffronten der hier sehr blass zu erkennenden Banden mit denen des „Rekombinationsphagen“ (zum Beispiel in Abbildung 6.13) verglichen, so wird ersichtlich, dass keine Übereinstimmung vorliegt. Der „Rekombinationsphage“ läuft auf der Höhe einer linearen dsDNA von etwa 2500 bp, während die Bande hier auf der Höhe einer dsDNA von etwa 2000 bp läuft. Angesichts dessen, dass die Banden hier kaum sichtbar sind und insgesamt drei sehr blasse Banden vorliegen, ergibt sich eher der Schluss, dass es sich hierbei um Plasmid DNA handelt. Diese tritt üblicherweise in drei Formen auf. Eine ist entfaltet, eine spiralisiert und die Dritte ist superspiralisiert. Dadurch

bilden Plasmide bei Untersuchung mittels Agarosegelelektrophorese stets drei Banden, wobei die superspiralisierte Form am weitesten läuft und die entfaltete Form am wenigsten weit. Da die Phagemide, die als Kontamination zur Kultivierung zugegeben wurden nach wie vor infektiös sind, ist zu vermuten, dass sie Zellen infiziert haben, die im Anschluss das Phagemid als Plasmid in sich trugen. Es ist auch zu vermuten, dass diese Zellen bevorzugt lysieren, da sie einer höheren metabolischen Belastung ausgesetzt sind als die restlichen Zellen. So wird die Plasmid-DNA in das Medium freigesetzt.

Zusammengefasst zeigten diese Experimente, dass Phagemidpartikel, die mit der so etablierten Methode hergestellt wurden nicht selbst replizierend sind. Auch haben sich keine neuen Phagen im Produktionsprozess gebildet, wodurch es hier zu keiner weiteren Vervielfältigung der simulierten Kontamination kommt. Sollten also in der Anlage eines Lohnherstellers Toträume existieren, die nicht ausreichend gut sterilisiert werden können, so stellen Phagemidpartikel, die dort mit einer geringen Wahrscheinlichkeit zurückbleiben (Branston *et al.*, 2013) keine Gefahr für darauffolgende Kultivierungen mit *E. coli* dar.

6.8 Standardisierung des Phagemidrückgrats

Damit die Methode der „Reversen Infektion“ zur Herstellung von ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz leicht und schnell auf verschiedenen Sequenzen erweitert werden kann, wurde ein neues Phagemid designt und erstellt. Ziel war, möglichst wenig vorgegebene DNA Sequenz zu erhalten und eine Schnittstelle zu schaffen, in die möglichst einfach große DNA Sequenzen eingesetzt werden können.

Das Phagemid cp6(G3) war zu diesem Zweck aus allen essenziellen Sequenzmotiven des Phagemids cp5(G3) neu zusammengesetzt worden. In der Plasmidkarte in Abbildung 6.23 ist zu erkennen, dass alle funktionellen Sequenzen mit möglichst wenig Zwischenraum assembliert wurden. Um dennoch zu vermeiden, dass homologe Rekombination des M13 ori und Verpackungssignal auftreten kann, wurde die Gensequenz von Gen 3 komplett kodonoptimiert, um möglichst keine Sequenzhomologie mit den Gen3 Fragmenten des Helferplasmids aufzuweisen. Außerdem wurde die Expressionskassette von Gen 3 nicht mit dem natürlichen Promotor und Ribosombindestelle erstellt, sondern mit einem starken Promotor und einer *in silico* designten Ribosombindestelle. So konnte erreicht werden, dass keine direkte Sequenzhomologie zwischen CSMB und dem Helferplasmid pfp30 besteht.

Für den erleichterten Einbau von nutzerdefinierten Sequenzen wurde eine Schnittstelle für die Assemblierung mit Hilfe von *Golden-Gate-Assembly* geschaffen. Diese Schnittstelle erlaubt den Einbau von mehreren größeren DNA Fragmenten in einer einzelnen Reaktion, sodass der Einbau neuer nutzerdefinierter Sequenzen sehr einfach wird.

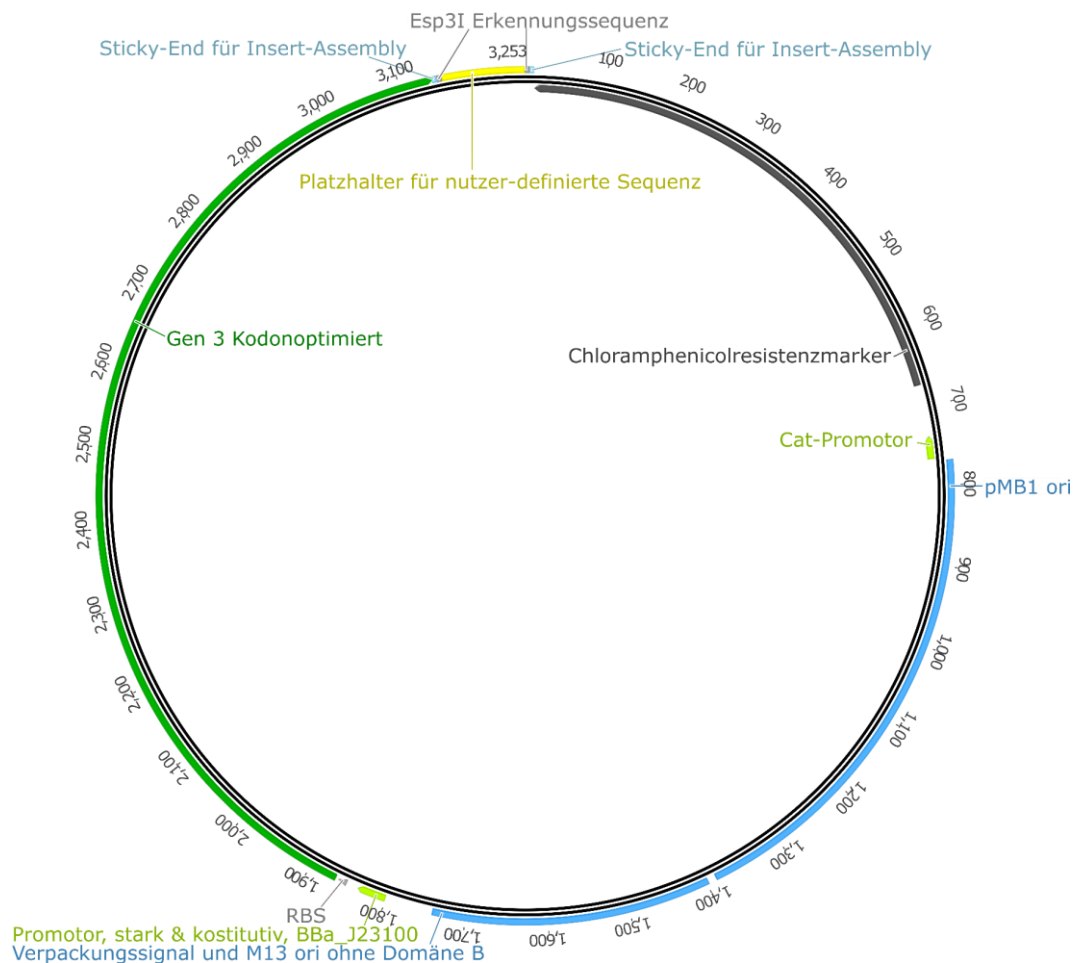


Abbildung 6.23: Plasmidkarte des Phagemids cp6(G3). Das Phagemid hat das kürzest mögliche Phagemidrückgrat das für das etablierte Produktionssystem notwendig ist. Alle als essentiell ermittelten Komponenten wurden neu sortiert und einzeln neu zusammengesetzt. Zwischen der Expressionskassette für Gen 3 und dem Chloramphenicolresistenzmarker wurde eine Klonierungsschnittstelle für zukünftige nutzerdefinierte Sequenzen eingebaut. Durch die vorhandenen Restriktionsschnittstellen kann jegliches *Insert* mittels *Golden-Gate-Assembly* eingesetzt werden.

Um anschließend zu untersuchen, wie sich nutzerdefinierte Sequenzen mit Hilfe des Phagemids cp6(G3) und dem Helferplasmid pfhp30 herstellen lassen, wurde eine Sequenz in die Schnittstelle eingefügt. Damit ergab sich das Phagemid cp7(G3). Bei der eingefügten Sequenz handelt es sich um die Sequenzen der Klammernukleotide zur Erstellung des 48 Helix-Tubes aus dem Phagemidrückgrat. Die Klammernukleotide sind dabei nach der Methode von Praetorius *et al.* (2017) zusammengefügt mit jeweils einer DNAzym-Kassette zur Unterteilung.

Der Zulaufprozess im Rührkesselreaktor wurde, wie in Kapitel 6.6 etabliert, mit *E. coli*, transformiert mit dem Helferplasmid pfhp30, bei einer Produktionstemperatur von 30°C durchgeführt. Dabei musste, wie in Abbildung 6.24 gezeigt, der Zulaufvolumenstrom bereits nach 13 Stunden reduziert werden. Nach weiterer Reduzierung konnte der Prozess bis zum geplanten Ende durchgeführt werden. Auch hier zeigte sich wieder, dass durch Zellyse die Viskosität der Kultur deutlich anstieg. Bei Betrachten des Gelbilds der Agarosegelelektrophorese wird ersichtlich, dass nach mehr als etwa 17 Stunden Zulaufzeit

der Anteil an genomischer DNA, die in das Produkt verschleppt wird, so zunimmt, dass das Laufverhalten dadurch gestört wird. Vor der Probe bei 16,4 Stunden Zulaufzeit kann allerdings erkannt werden, dass die Ziel ssDNA sauber produziert wurde.

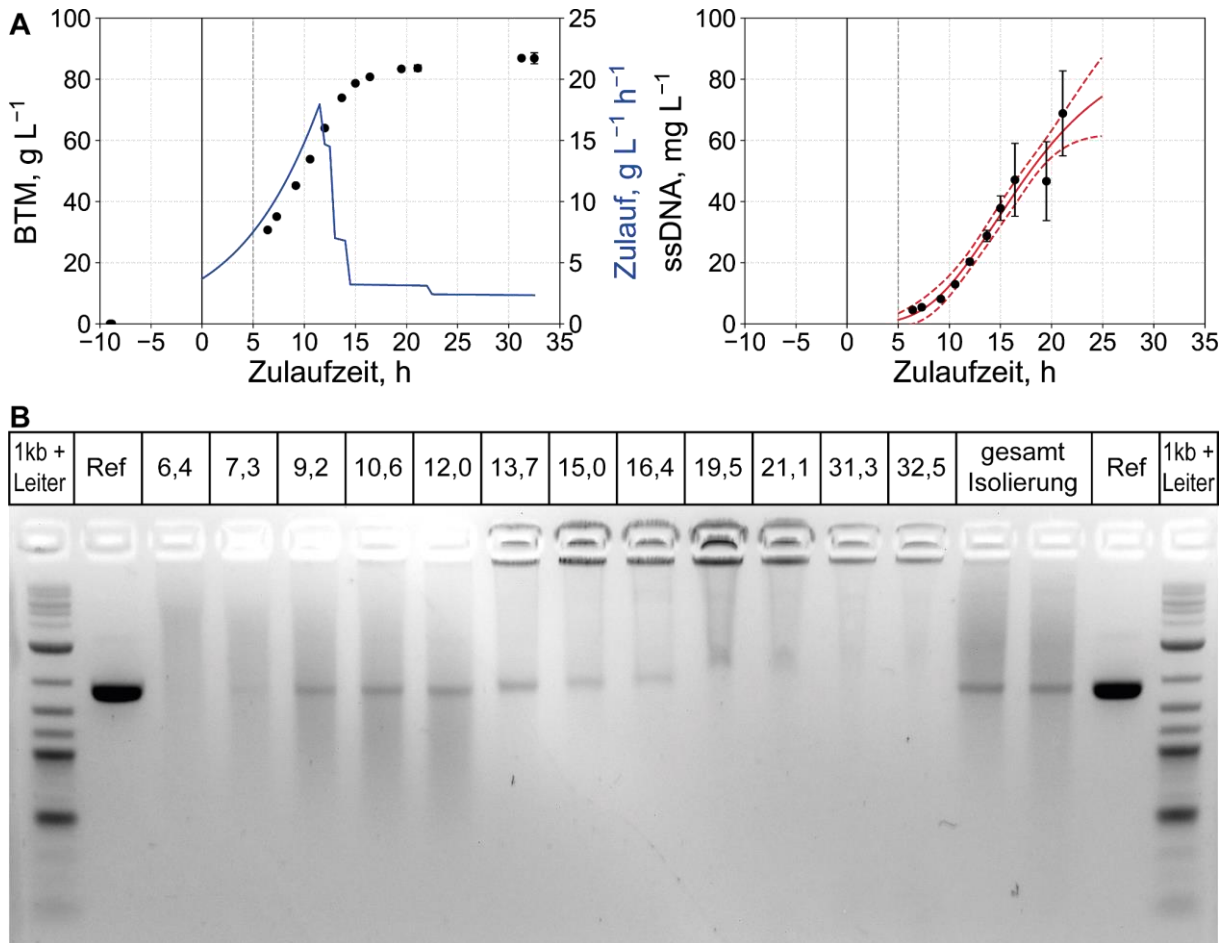


Abbildung 6.24: Hochzelldichtekultivierung im Rührkesselreaktor von *E. coli* JM109 transformiert mit dem Helferplasmid pfhp30. Fünf Stunden nach Zulaufstart wurde mit Phagemidpartikeln cp7(G3) infiziert. Die Temperatur wurde 30 min vor Infektion von 37°C auf 30°C reduziert. **A**: Änderung der Biotrockenmassenkonzentration, des Zulaufmassenstroms (Zulauf) und der ssDNA Konzentration über die Prozesszeit relativ zum Zulaufstart (Zulaufzeit). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung technischer Replikate dar. Rote Linien: sigmoidaler Fit (durchgehend), 95% Konfidenzbänder (gestrichelt). **B**: AGEP der im Prozessverlauf isolierten ssDNA. Zahlen über den Gelspuren stehen für die Zulaufzeit in Stunden. Die Referenz entspricht der ssDNA des Phagemids CSMB48HT. Rechts von den Proben im Prozessverlauf ist die ssDNA aufgetragen, die nach Prozessende aus dem gesamten Reaktorüberstand im Litermaßstab isoliert wurde (2 Spuren gesamt Isolierung).

Die Verunreinigung mit genomischer DNA konnte bei der Reinigung des gesamten Kulturüberstandes nach Ende der Kultivierung gut beseitigt werden, wodurch hier das Laufverhalten der Proben in der Agarosegelelektrophorese wieder normal wirkt. Allerdings waren die Verluste bei der Reinigung des gesamten Kulturüberstandes relativ hoch, um diese Produktreinheit zu erhalten. Die Daten der ssDNA Konzentration im Prozessverlauf wurden nur bis 21,1 Stunden abgebildet, da die Standardabweichung im Folgenden aufgrund der Verunreinigungen sehr groß wurde.

Diskussion

Mit dem neuen Phagemid cp6(G3) war es sehr leicht in nur einem Schritt das *Insert* für das Phagemid cp7(G3) einzufügen. Das wird es auch für weniger versierte Molekularbiologen erleichtern, eigene nutzerdefinierte Sequenzen in das Phagemidrückgrat einzufügen.

Die Herstellung von ssDNA des Phagemid cp7(G3) verlief bis etwa 17 Stunden nach Zulaufstart wie erwartet. Dabei stieg die Viskosität allerdings stärker an als bei den bisher gezeigten Produktionen des Phagemids cp5(G3). Da sich der Zeitpunkt von 17 Stunden Zulaufzeit bereits als idealer Erntezeitpunkt gezeigt hatte, wurde der Prozess auch nur bis dahin genauer betrachtet. Demnach wurde hier eine maximale ssDNA Konzentration von 47 mg L^{-1} erreicht. Ein gewisser Unterschied zu der Produktion von cp5(G3) war allerdings zu erwarten, da das Phagemid sowohl in Länge als auch in Aufbau unterschiedlich ist.

Insgesamt zeigt der Zulaufprozess im Rührkesselreaktor, dass eine Produktion beliebiger nutzerdefinierter Sequenzen, die in das Phagemidrückgrat eingefügt werden können, möglich ist. Dabei sind die Ausbeuten höher als bei zuvor publizierten Methoden, die ohne Phagen arbeiteten (Shepherd *et al.*, 2019).

6.9 Maßstabsübertragung in den Pilotmaßstab

Um zu zeigen, dass die Methode der „Reversen Infektion“, mit Infektion durch Phagemidpartikel, geeignet ist, in einem beliebigen Maßstab ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz zu produzieren, wurde der Herstellungsprozess in den Pilotmaßstab übertragen. Ziel war, einen speziellen Gerüststrang für die Herstellung von DNA-Origami-Strukturen zu produzieren. Da dieser lediglich eine Länge von 1033 Basen hat, wurden zwei Kopien der Sequenz in das Phagemidrückgrat eingefügt. Dieser Phagemid (cp8(G3)) wurde anschließend in 6 L „2xYT“-Medium mit der Doppeltransformationsmethode in einem Satzverfahren im Rührkesselreaktor als Phagemidpartikel hergestellt. Diese Partikel dienten für die Infektion im Pilotmaßstab.

Für die Satzphase im Pilotmaßstab wurden 20 g L^{-1} Glukose vorgelegt. Sie dauerte etwa 10 Stunden. Im Anschluss wurde ein exponentielles Zulaufprofil eingestellt, welches die Wachstumsrate auf $\mu_{\text{set}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ festlegen sollte. Nach 16 Stunden Zulaufbetrieb wurde die Ernte eingeleitet. Da bei dem großen Volumen die Trennung von Kulturüberstand und Zellen einige Zeit in Anspruch nimmt, wurde während der Ernte weiter konstant Substrat zugeführt und auch die sonstigen Kultivierungsbedingungen aufrechterhalten.

In Abbildung 6.25 ist zu erkennen, dass dabei die Biotrockenmassekonzentration lediglich auf 64 g L^{-1} ansteigt. Dabei wird die eingestellte Wachstumsrate μ_{set} über die ersten 8 Stunden der Zulaufphase erreicht, sinkt allerdings anschließend ab.

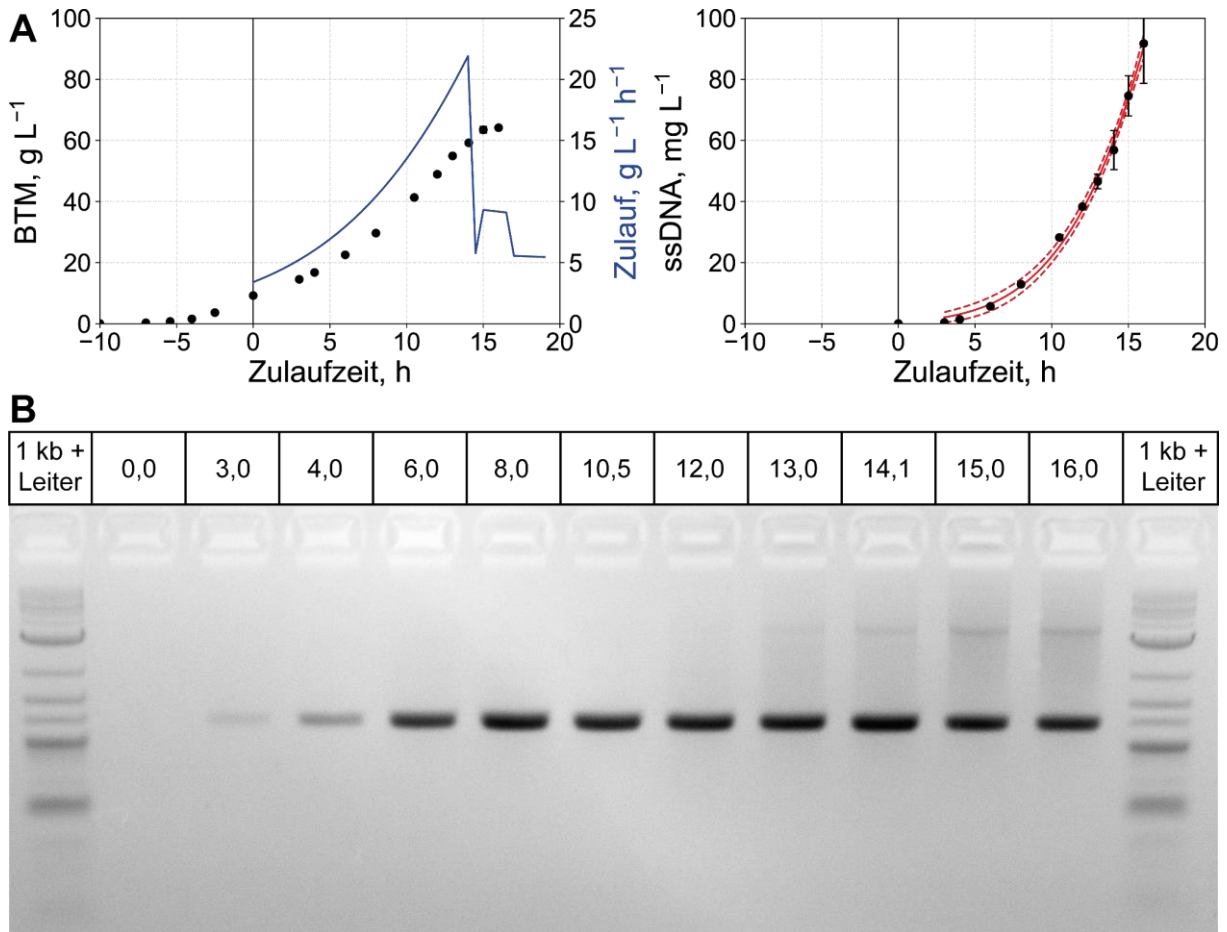


Abbildung 6.25: Hochzelldichtekultivierung im Rührkesselreaktor (1000 Liter) von *E. coli* JM109 transformiert mit dem Helferplasmid pfp30. Drei Stunden nach Zulaufstart wurde mit Phagemidpartikeln cp8(G3) infiziert. Die Temperatur wurde 30 min vor Infektion von 37°C auf 30°C reduziert. **A**: Änderung der Biotrockenmassekonzentration, des Zulaufmassenstroms (Zulauf) und der ssDNA Konzentration über die Prozesszeit relativ zum Zulaufstart (Zulaufzeit). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung technischer Replikate dar. Rote Linien: sigmoidaler Fit (durchgehend), 95% Konfidenzbänder (gestrichelt). **B**: AGEP der im Prozessverlauf isolierten ssDNA. Zahlen über den Gelspuren stehen für die Zulaufzeit in Stunden.

Die Phagemidpartikel wurden 3 Stunden nach Zulaufstart zugegeben, da nicht ausreichend Infektionsgut vorhanden war für eine Infektion mit $\text{MOI} = 1 \text{ tfu cfu}^{-1}$ nach 5 Stunden Zulaufzeit. Die ssDNA Konzentration im Überstand steigt direkt nach 3 Stunden Zulaufzeit an und erreicht zum Ende der Kultivierung nach 16 Stunden 91 mg L^{-1} . Bei Betrachtung des Gelbilds der Agarosegelelektrophorese der im Kultivierungsverlauf isolierten ssDNA wird ersichtlich, dass die Produktbande sauber zu erkennen ist. Lediglich im späteren Prozess taucht eine zusätzliche blasse Bande auf. Ansonsten sind kaum Verunreinigungen zu erkennen. Allerdings ist die ssDNA Bande bereits bei der Probe nach 3 Stunden Zulaufbetrieb zu erkennen. Da diese Probe allerdings unmittelbar vor der eigentlichen Zugabe der Phagemidpartikel entnommen wurde, wird klar, dass hier eine Kontamination vorliegt.

Um die ssDNA Reinigung im Pilotmaßstab zu untersuchen, wurde die ssDNA aus dem gesamten Reaktorüberstand isoliert. Dafür wurden zunächst die Zellen mit Hilfe eines Tellerseparators abgetrennt. Die weiteren Schritte zur Isolierung der ssDNA wurden im Grunde genauso durchgeführt wie bei der Reinigung im Liter-Maßstab. Dabei wurden alle Zentrifugationsschritte mit Hilfe des Tellerseparators durchgeführt. Um die gleiche Sedimentationsqualität zu erreichen wie in einer Becherzentrifuge wurde jeweils die Klarphase so lange im Kreislauf geführt, bis die entsprechende Klärung erreicht war. Nach der DNA Fällung mittels Ethanol wurde die ssDNA lediglich im Schwerfeld sedimentiert und der Überstand dekantiert. Die dabei verbleibende Suspension wurde anschließend in einer Becherzentrifuge zu festen Pellets sedimentiert. Diese wurden anschließend in Puffer gelöst.

Über die Reinigung konnten 84 g ssDNA gewonnen werden. In Bezug auf das Gesamtprozessvolumen von 1000 Litern bei einer Konzentration von 91 mg L⁻¹ sind das 92% Ausbeute über den Reinigungsprozess.

Für weitere Analysen wurde ein kleiner Teil der ssDNA weiter gereinigt, bis alle Trübstoffe, die in der Lösung mit bloßem Auge zu erkennen waren, entfernt wurden. Dazu wurde die ssDNA zwei weitere Male über die ssDNA-Isolierungsmethode gereinigt. Die so gewonnene reine ssDNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und dabei mit verschiedenen ssDNA Referenzen verglichen, um zu ermitteln, um welche ssDNA Spezies es sich handelt.

In dem Gelbild der Agarosegelelektrophorese in Abbildung 6.26 ist zu erkennen, dass die hergestellte ssDNA nicht das Laufverhalten des Phagemids cp8(G3) aufweist, sondern das Laufverhalten des Phagemids cp5(G3).

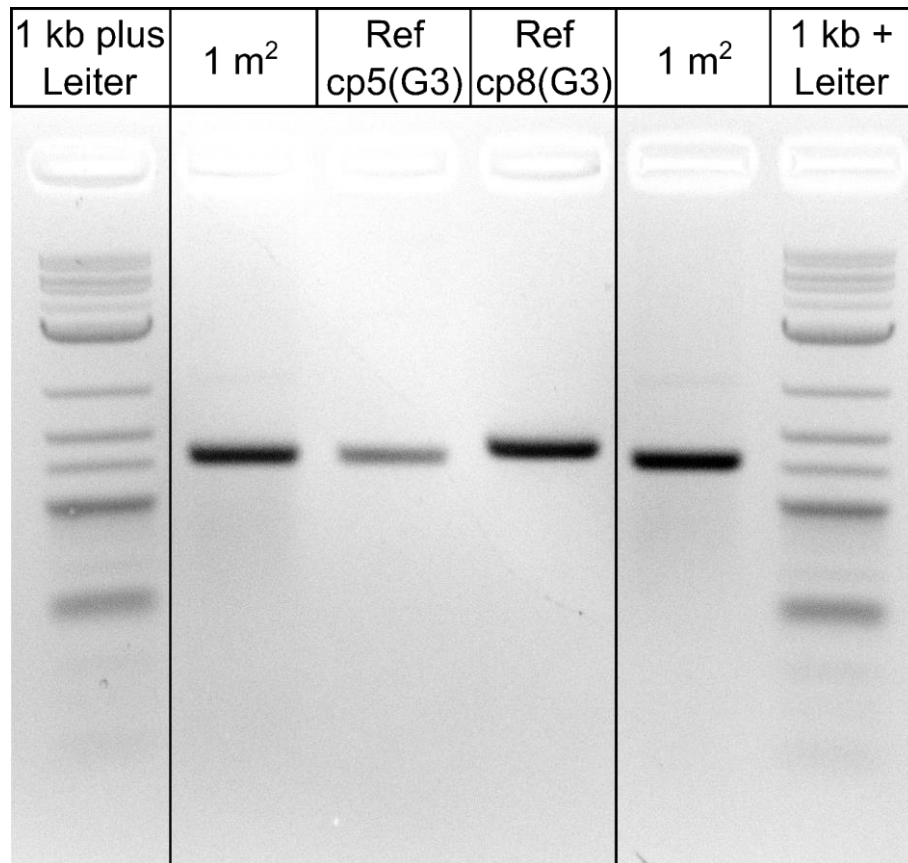


Abbildung 6.26: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus der Kultivierung im Pilotmaßstab. Die ssDNA, die für diese AGEF eingesetzt wurde, wurde aus dem gesamten Kultivierungsüberstand im Pilotmaßstab gereinigt (Bezeichnung: 1 m²). Die aufgetragenen Referenzen sind die ssDNA des Phagemid cp5(G3) (Ref cp5(G3)) und die ssDNA des Phagemids cp8(G3) (Ref cp8(G3)). Bei dem Gelbild wurde der Kontrast gleich über das ganze Bild eingestellt, hier unwichtige Gelspuren wurden allerdings ausgeschnitten und das Gel wieder ohne Verschieben der Spuren zusammengesetzt. Die Schnitte sind durch schwarze Linien markiert.

Nachdem eine Aussage über die Sequenz nicht auf Basis der Agarosegelelektrophorese gemacht werden kann, wurde die ssDNA Probe sowohl sequenziert als auch zu DNA-Origami-Objekten gefaltet. Genutzt wurden dafür Klammernukleotide, die aus cp5(G3) das 42 Helix-Bündel falten.

Bereits die Sequenzierung zeigte, dass die Sequenz des Phagemids cp5(G3) vorliegt. Aber auch die Faltungsreaktion zeigte, dass es sich um cp5(G3) ssDNA mit sehr guter Qualität handelt, wie in Abbildung 6.27 zu erkennen ist. Besonders mit der ssDNA, die aus dem gesamten Kultivierungsüberstand gewonnen wurde, konnten die Origami-Objekte fast ohne Nebenprodukte gefaltet werden.

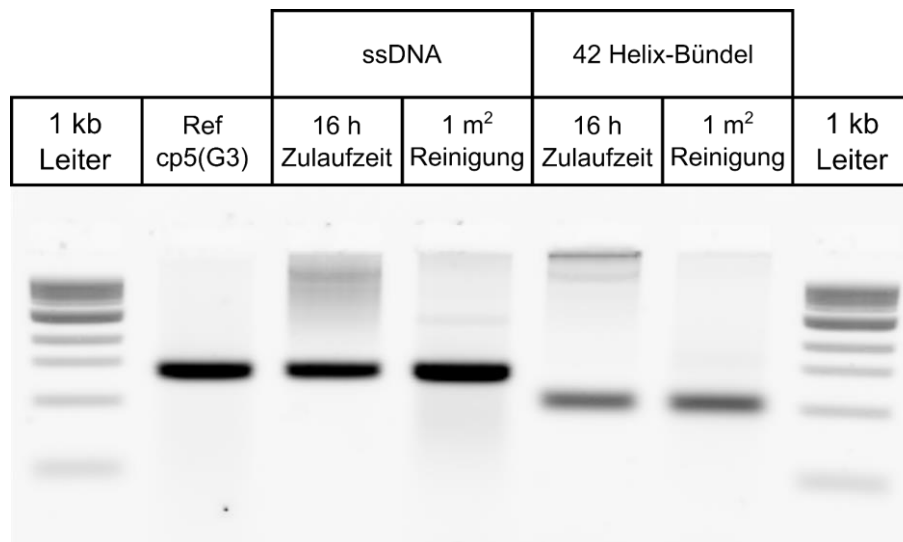


Abbildung 6.27: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus der Kultivierung im Pilotmaßstab. Aufgetragen sind die ssDNA Probe nach 16 Stunden Zulaufzeit sowie die ssDNA, die aus dem gesamten Reaktorüberstand isoliert wurde. Beide Proben sind sowohl als Gerüststrang ssDNA aufgetragen sowie gefaltet zu dem 42 Helix-Bündel. Als Referenz ist die ssDNA des Phagemids cp5(G3) aufgetragen.

Um zu identifizieren, wodurch dieser Zulaufprozess mit den Phagemiden cp5(G3) kontaminiert wurde, wurden Satzkultivierungen in Schüttelkolben durchgeführt. Dabei wurden die *E. coli* JM109 Kryokulturen eingesetzt, die auch für die Zulaufkultivierung im Pilotmaßstab eingesetzt wurden. Obwohl hierbei besonders auf kontaminationsfreies Arbeiten geachtet wurde, konnten bereits in den Schüttelkolben Phagemidpartikel cp5(G3) nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass bereits die Kryokulturen mit den Phagemidpartikeln kontaminiert waren, so dass jeder Prozess, für den diese Kryokulturen eingesetzt werden kontaminiert werden würde. Es konnte gezeigt werden, dass die Kontamination relativ gering war. Aus der Anzahl an Infizierten Zellen in einem Schüttelkolben ließ sich extrapolieren, dass die Kontamination etwa einer Infektion der Vorkultur im Rührkesselreaktor mit einer MOI von $10^{-9} - 10^{-8}$ tfu cfu⁻¹ entsprach.

Diskussion

Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass die Produktion von ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz im Pilotmaßstab möglich ist. Eine weitere Skalierung ist demnach auch möglich. Die maximale Biomassekonzentration war hier niedriger als zuvor im Labormaßstab beobachtet. Das lässt sich allerdings auch auf die veränderte Substratkonzentration im Zulauf zurückführen. Hier wurde anstelle von 750 g L⁻¹ Glukose lediglich 600 g L⁻¹ eingesetzt, um Auskristallisieren von Glukose in den Schläuchen zu vermeiden. Da es so bei gleichem Glukosemassenstrom, der für die Wachstumsrate von 0,15 h⁻¹ eingestellt wurde zu stärkerer Verdünnung durch den Zulauf kommt, hat dies einen entscheidenden Einfluss auf die Maximalwerte. So wurde bei diesem Prozess auch kein besonders starker Anstieg der Viskosität der Kultur beobachtet. Bei der geringeren Biotrockenmassekonzentration liegt

vermutlich auch weniger Zell-Lysat pro Reaktorvolumen vor, da der Anteil an Lysat wahrscheinlich gleich bleibt. So wird auch die Isolierung und Reinigung der ssDNA erleichtert.

Insgesamt konnten mit 91 mg L^{-1} eine gute maximale ssDNA-Konzentration bei sehr guter Produktreinheit erzielt werden. Auch die Ausbeute von 92% über die gesamte Produktisolierung und –reinigung ist hoch.

Allerdings handelte es sich um das falsche Produkt: ssDNA des Phagemids cp5(G3) statt cp8(G3). Bei Analysen der zu Prozessbeginn eingesetzten Kryokulturen wurde eine Kontamination dieser bestätigt. Anhand von Schüttelkolbenkultivierungen konnte abgeschätzt werden, dass so die Vorkultur im Rührkesselreaktor mit einer MOI von $10^{-9} - 10^{-8} \text{ tfu cfu}^{-1}$ infiziert gewesen sein musste. Aus dieser Kontamination lassen sich allerdings auch einige Erkenntnisse ziehen.

Zum einen ist es demnach auch möglich mit geringer Infektionsdichte zu einem sehr viel früheren Zeitpunkt zu infizieren, was die Bereitstellung von Infektionsgut sehr stark vereinfacht. Mit der frühen Infektion lässt sich dennoch die gleiche Menge an ssDNA herstellen wie mit der Infektion 5 Stunden nach Zulaufstart.

Zum anderen können so Kontaminationen zu einem späteren Zeitpunkt vermieden werden. Hier wurde die Vorkultur bereits mit Phagemidpartikeln cp5(G3) infiziert. Nachdem 3 Stunden nach Zulaufstart Phagemidpartikel cp8(G3) mit einer $\text{MOI} = 1 \text{ tfu cfu}^{-1}$ zugegeben wurden, haben diese Partikel keine weitere Infektion ausüben können und lediglich cp5(G3) der frühen Infektion wurde gebildet. Ist die Kultur bereits in der Vorkultur mit dem erwünschten Phagemid infiziert, so ist eine Kontamination in der Hauptkultur nicht mehr möglich.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass eine Übertragung der Herstellung von ssDNA mit Hilfe der „Reversen Infektion“ vom Labormaßstab (2 Liter) in den Pilotmaßstab (1000L) möglich ist. Die geringfügige Kontamination der Kryokulturen, die hier unbeabsichtigt zu einer frühen Infektion geführt hat, zeigt das mit einer frühen Infektion gute Produktkonzentrationen bei sehr guter Produktreinheit erzielt werden können. Um allerdings eine genaue Aussage über die möglichen ssDNA-Konzentrationen sowie über die Reproduzierbarkeit treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen angestellt werden.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Einzelsträngige DNA ist für einige zukunftsweisende Technologien ein wichtiger Baustein, der nicht nur in Kleinstmengen benötigt wird. In der Gentechnologie, die mit CRISPR/Cas positionsgenau und gezielt Doppelstrangbrüche in genomischer DNA erzeugen kann, wird sie als Schablone in Zellen eingebracht, um über den Reparaturmechanismus der Zellen neue Sequenzen in das Genom zu integrieren. ssDNA wird aber auch in der Nanotechnologie benötigt – dort weniger als Informationsträger der Erbinformation, sondern als Baumaterial. Mit der *scaffolded* DNA-Origami-Methode, können zwei- oder dreidimensionale Nanoobjekte hergestellt werden. Dazu wird ein langer ssDNA-Gerüststrang mit vielen kurzen ssOligonukleotiden, den Klammernukleotiden, durch Basenpaarung und unter Ausbildung verschiedenster *crossover* in eine Struktur gefaltet. In dem *bottom up* Vorgehen, werden die Strukturen *in silico* designt. Aus dem Design wird anschließend die notwendige Sequenz der Klammernukleotide in Abhängigkeit der Sequenz des Gerüststrangs berechnet. Ähnlich dazu können Gerüste für Hydrogele erzeugt werden. Auch dazu werden ssDNA-Stücke so hybridisiert, dass sie eine dreidimensionale Gitterstruktur aufspannen. Diese kann positionsgenau modifiziert sein und so die Ausbildung von Hydrogelen mit exakt designten Eigenschaften ermöglichen.

All diese Technologien haben gemeinsam, dass sie ssDNA nutzen, die keine beliebige, sondern eine genau vorgegebene Sequenz benötigt. Gleichzeitig werden für verschiedene mögliche Anwendungsfelder zum Beispiel von *scaffolded* DNA-Origami nicht nur Mengen im Mikrogrammbereich benötigt, die auch durch chemische Synthese erzeugt werden könnten, sondern Mengen im Grammbereich und darüber hinaus. Dafür ist es nicht genug, Methoden zu etablieren, die hohe ssDNA-Konzentrationen erzielen, sie müssen auch in den industriellen Maßstab skaliert werden können. Nur so kann der Preis für diese ssDNA-Mengen soweit reduziert werden, dass die Anwendungen marktfähig werden.

Bisher wird die kosteneffiziente Produktion von ssDNA mit Hilfe des M13 Phagen ermöglicht. Dazu wird dieser mit *E. coli* in Hochzelldichtekultivierung hergestellt und sein Genom als ssDNA isoliert. Dadurch wird allerdings nur natürliche ssDNA, nicht jedoch solche mit nutzerdefinierter Sequenz erzeugt. Um auch ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz herstellen zu können, wurden zwei biotechnologische Methoden vorgeschlagen. Beide nutzen ein Phagemid, einen Hybrid aus Phage und Plasmid, der neben einem Plasmidrückgrat auch den Replikationsursprung des Phagen sowie dessen Verpackungssignal trägt. Abgesehen von diesen Merkmalen kann er große Teile an nutzerdefinierter Sequenz beinhalten. Um mit einem Phagemid ssDNA herzustellen, wird ein Helfersystem benötigt. Dazu gibt es entweder

Helferphagen oder Helferplasmide. Sie ermöglichen die Produktion aller M13 Proteine in den *E. coli*-Wirtszellen und dadurch die Produktion der Phagemid-ssDNA. Diese wird dann in M13 Kapsid-Proteine verpackt und als Phagemidpartikel aus der Zelle ausgeschleust.

Helferphagen kommen für die Herstellung von ssDNA im Produktionsmaßstab bei Lohnherstellern nicht in Frage, da die selbstreplizierenden Partikel ein Kontaminationsrisiko für alle Produktionsprozesse mit *E. coli* mit sich bringen.

Werden *E. coli* mit dem Helferplasmid und dem Phagemid transformiert, beginnen sie sofort neue Phagemidpartikel zu produzieren. Da die Produktion bereits nach 10 Generationen nahezu komplett abbricht, müsste für einen skalierbaren Prozess auch die Transformation im Produktionsmaßstab stattfinden. Das ist technisch jedoch unmöglich.

Ziel dieser Arbeit war es daher, Biomasse- und Produktbildung in einem skalierbaren Zulaufprozess zur ssDNA-Herstellung mit *E. coli* im Rührkesselreaktor zu trennen, ohne dabei selbstreplizierende Phagen einzusetzen. Um das zu erreichen, wurden zwei Ansätze verfolgt.

Im ersten Ansatz wurde *E. coli* mit einem Phagemid und einem Helferplasmid transformiert, wobei die Expression der M13 Gene auf dem Helferplasmid unter die Regulation durch Lac-Operatoren gestellt wurde. Es war angedacht, durch Induktion der M13-Proteinexpression die Produktion zu initiieren und so Biomasse- und Produktbildung zu trennen. Dazu wurde zunächst das kondensierte Genom des M13 Phagen in seine einzelnen Gene aufgeteilt und neu angeordnet. Verschiedene Helferplasmide wurden erstellt, die teilweise alle oder nur einige Promotoren in dem Helferplasmid unter die Kontrolle eines Lac-Operators stellten. Da so in den meisten Fällen völliger Funktionsverlust des Helferplasmids auftrat oder die Produktion von ssDNA nicht reguliert werden konnte, konnte dieser Ansatz nicht weiterverfolgt werden.

Ziel des zweiten Ansatzes war es, die Biomasse- und Produktbildung zur ssDNA-Herstellung mit *E. coli* zu trennen, indem Helferplasmid und Phagemid zunächst nicht gemeinsam in den Zellen vorliegen. Ein *E. coli* Produktionsstamm, transformiert mit einem Helferplasmid, der alleine keine ssDNA herstellen kann, wird dann zu einem gewünschten Zeitpunkt mit Phagemidpartikeln infiziert um die Produktion zu starten. Dieses Vorgehen wurde in dieser Arbeit „Reverse Infektion“ genannt.

Dazu wurde der Einfluss aller M13 Gene einzeln auf die Infektionsresistenz von *E. coli* gegen über M13 Phagen untersucht. Es zeigte sich, dass das Produkt von Gen 3 die Infektionsresistenz hervorruft. Da es nicht ausreichend war, die Expression von Gen 3 unter die Kontrolle durch einen Lac-Operator zu stellen, wurde der Großteil der kodierenden Sequenz auf dem Helferplasmid entfernt. *E. coli*-Zellen, die dieses Helferplasmid ohne Gen 3 tragen waren nicht resistent gegen eine Infektion mit Phagemidpartikeln. Um dennoch alle M13 Gene für die

Produktion von Phagemidpartikeln bereitzustellen, wurde die Expressionskassette für Gen 3 auf dem Phagemid eingefügt. Das Konzept dieses Vorgehens war, dass die nicht infektionsresistenten *E. coli* mit den Phagemidpartikeln infiziert werden und dadurch die Expression von Gen 3 gestartet wird, wodurch dann gleichzeitig die Phagemid-ssDNA mit der nutzerdefinierten Sequenz produziert und in Phagemidpartikel verpackt wird.

Mit dieser Kombination aus einem Helferplasmid ohne Gen 3 und einem Phagemid mit Gen 3 konnte ein Zulaufverfahren im Rührkesselreaktor zur Hochzelldichtekultivierung von *E. coli* etabliert werden, in dem zunächst Biomasse gebildet wird und dann durch Infektion mit Phagemidpartikeln die ssDNA-Produktbildung gestartet wird.

In einem ersten Versuchsansatz wurden $70,5 \text{ mg L}^{-1}$ ssDNA als maximale Produktkonzentration gemessen. Bei der Produktanalyse zeigte sich allerdings, dass dabei nicht nur ssDNA des Phagemids produziert wurde, sondern auch vollständige M13 Phagen ssDNA. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Phage durch Rekombination zwischen dem Helferplasmid und dem Phagemid in *E. coli* entstanden war. Ursache der Rekombination waren homologe Sequenzen von Helferplasmid und Phagemid, durch die der M13 ori zusammen mit dem Verpackungssignal in *E. coli* ausgetauscht wurde.

Alle homologen Sequenzen und somit die Ursache der Rekombination, wurden nachfolgend auf Seiten des Phagemids entfernt. Zusätzlich wurde ein optimiertes Helferplasmid gestaltet, welches durch höhere Expression von Gen 2 und Gen 10 eine höhere Produktkonzentration ermöglichen sollte. Durch Variation der Produktionstemperatur konnte mit diesem optimierten Helferplasmid sowohl die maximale ssDNA-Konzentration als auch die Produktreinheit gesteigert werden. So konnte ein ssDNA Herstellungsprozess, wie in Abbildung 7.1 schematisch dargestellt, auf Basis einer Hochzelldichtekultivierung mit *E. coli* im Zulaufverfahren in einem Rührkesselbioreaktor etabliert werden, der mit dem optimierten Helferplasmid bei einer Produktionstemperatur von 30°C eine maximale Produktkonzentration von 83 mg L^{-1} ssDNA bei gleichzeitig sehr geringerer Bildung von ssDNA- und DNA-Nebenprodukten liefert.

Die Phagemidpartikel aus diesem Produktionsprozess wurden anschließend auf Selbstreplikation untersucht. Dazu wurde ein Zulaufprozess im Rührkesselreaktor mit Wildtyp *E. coli* gezielt mit diesen Phagemidpartikeln kontaminiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass keine weitere ssDNA gebildet wurde, und somit keine Selbstreplikation der Phagemidpartikel möglich war, wodurch die Produktion bei Lohnherstellern prinzipiell ermöglicht ist.

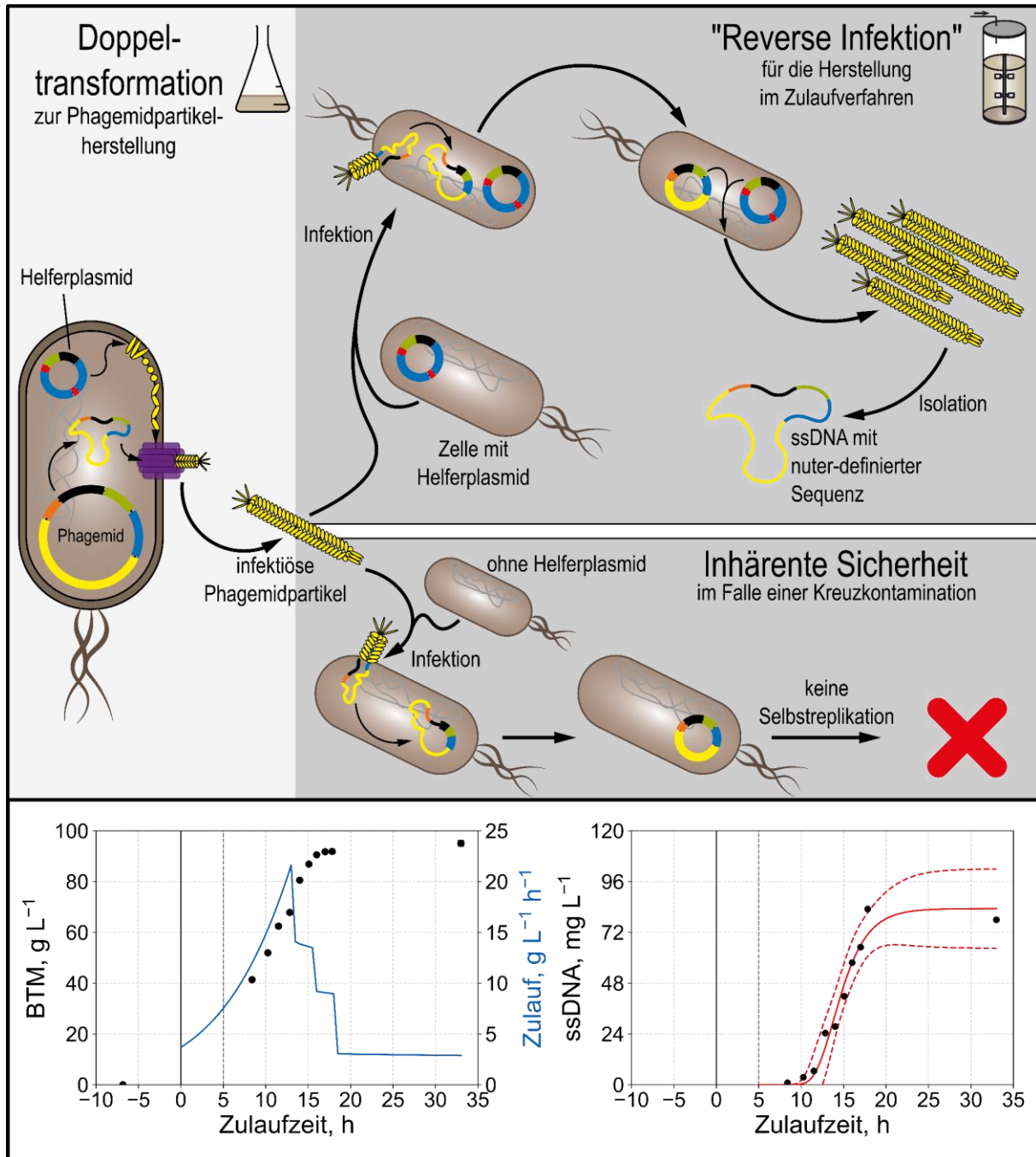


Abbildung 7.1: Biotechnologischer Herstellungsprozess für ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz. Oben: schematische Darstellung des Herstellungsprozesses. Durch Doppeltransformation wird das Infektionsgut für die „Reverse Infektion“ bereitgestellt. Mit der „Reversen Infektion“ kann die ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz in Hochzelldichtekultivierungen im Zulaufverfahren hergestellt werden. Da die Partikel nicht selbstreplizierend sind, wird eine Prozesssicherheit geschaffen, die Durchseuchung bei Kreuzkontamination verhindert. Unten: Hochzelldichtekultivierung im Rührkesselreaktor von *E. coli* JM109 transformiert mit dem optimierten Helferplasmid. Fünf Stunden nach Zulaufstart wurde mit Phagemidpartikeln infiziert. Eine halbe Stunde vor Infektion wurde die Temperatur von 37°C auf 30°C gesenkt. Gezeigt sind der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration (links, schwarze Punkte), des Zulaufmassenstroms (links, blaue Linie) und der ssDNA-Konzentration (rechts, schwarze Punkte) über die Zulaufzeit.

Der Prozess wurde abschließend vom Labormaßstab (2 Liter) in den Pilotmaßstab (1000 Liter) mit 2 Vorkulturstufen (200 mL Schüttelkolben, 3 L Rührkesselreaktor) übertragen. Hierbei wurde eine *E. coli* Kryokultur verwendet, die bereits einige wenige Phagemidpartikel enthielt. Damit wurden im Zulaufprozess im 1000 L-Maßstab die *E. coli*-Zellen nicht alle zu einem

festgelegten Zeitpunkt infiziert, sondern langsam über die Vorkulturstufen hinweg, bis die gesamte Kultur infiziert war. Dennoch ließ sich auch so ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz herstellen. Es konnte eine maximale ssDNA-Konzentration von 91 mg L⁻¹ im 1000 L-Maßstab erreicht werden. Die ssDNA-Isolierung wurde auch in den Pilotmaßstab übertragen, wobei insgesamt 84 g ssDNA gewonnen wurden. Somit konnte eine Gesamtausbeute bei der Isolierung der ssDNA von 92% erreicht werden.

Ausblick

Durch die Variation der Produktionstemperatur in der Hochzelldichtekultivierung von *E. coli*, transformiert mit dem optimierten Helferplasmid, konnte die maximale Produktkonzentration sowie die Produktqualität stark verbessert werden. Weitere Prozessparameter wurden nicht variiert. Auch für die Infektion wurde bisher lediglich gezeigt, dass bei einer Infektion 5 Stunden nach Zulaufstart mit einer Infektionsdichte von einem Phagemidpartikel pro Zelle hohe maximale ssDNA-Konzentrationen erreicht werden. Es konnte allerdings bei der Maßstabsübertragung in den 1000 L-Maßstab beobachtet werden, dass ein früherer Infektionszeitpunkt bei geringerer Infektionsdichte auch zu guten Ergebnissen führt. Deshalb ist die weitere prozesstechnische Charakterisierung dieses Herstellungsverfahrens sinnvoll. Hier wäre die Identifikation eines Optimums zwischen Infektionszeitpunkt und -dichte interessant. Dabei könnte auch untersucht werden, ob durch geschickte Prozessführung die starke Lyse, die zum Ende der Zulaufverfahren beobachtet werden konnte, vermieden werden kann.

Mit Hilfe des bistabilen Promotors des Phagen Lambda konnte die Länge zwingend notwendiger Sequenzen des Phagemidrückgrats (Fix-Sequenz) von 3138 Basen auf 2060 Basen reduziert werden (vgl. Kapitel 9.1). Für M13 Phagen ist bekannt, dass ihre Größe in Abhängigkeit der Länge der verpackten ssDNA variieren kann. Dabei gelten allerdings 12000 Basen als praktische Grenze, da die Effizienz, mit der die Phagen verpackt werden, stark nachlässt (Rakonjac *et al.*, 2011; Mai-Prochnow *et al.*, 2015). Für ein besseres Verständnis, welche Phagemid-Größe optimal für die Herstellung von ssDNA ist, könnte deshalb die Abhängigkeit der maximalen Produktkonzentration von der Größe des Phagemids untersucht werden. Dabei wäre die Verwendung unterschiedlicher, nutzerdefinierter Sequenzen von Interesse, um einen Einfluss der Sequenz auszuschließen. Gleichzeitig sollte weiter untersucht werden, durch welche Maßnahme die Fix-Sequenz des Phagemidrückgrats reduziert werden kann.

Zum jetzigen Zeitpunkt enthält das Phagemidrückgrat einen M13 ori, das Verpackungssignal, einen Plasmid ori, einen Selektionsmarker und die Expressionskassette für das Gen CRO. Für die eigentliche Produktion von Phagemidpartikeln wird allerdings nur das Verpackungssignal, der M13 ori und die CRO Expressionskassette benötigt. Die restlichen Sequenzen sind nur für die Klonierung und Vorbereitung der Phagemidpartikel zur Infektion notwendig. Eine

Möglichkeit die Fix-Sequenz weiter zu reduzieren wäre der *split-ori*, der ermöglicht, dass bei der Bildung von Phagemid-ssDNA nur ein Teil der Sequenz abgeschrieben wird (Specthrie *et al.*, 1992; Engelhardt *et al.*, 2019). Dazu werden zwei M13 Replikationsursprünge auf dem Phagemid untergebracht. Einer von beiden wird allerdings so beschnitten, dass er nur den ssDNA-Abschrieb beendet. Dadurch startet die ssDNA Produktion an einem ori und endet an dem zweiten. Alle Sequenzen, die zwischen Stopp und Start liegen, werden nicht in ssDNA umgesetzt. So kann das rein für die Klonierung notwendige Plasmidrückgrat des Phagemids bei der Produktion von Phagemidpartikeln ausgelassen werden. Mit dem *split-ori* könnte die Fix-Sequenz auf unter 600 Basen reduziert werden.

Durch das optimierte Helferplasmid und das Reduzieren der Produktionstemperatur auf 30°C konnte auch die Reinheit des Produkts deutlich verbessert werden. Da allerdings einige der möglichen Anwendungen der ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz im Bereich der Pharmazeutika liegen, ist nicht nur wichtig, die Menge an Nebenprodukten und DNA-Verunreinigungen zu reduzieren, sondern auch die Verunreinigung mit Endotoxinen zu minimieren. Dazu ist eine chromatographische Reinigung des Produkts notwendig. Es würde sich anbieten, die ssDNA von jeglichen Verunreinigungen zu trennen, so lange sie noch in dem Phagemidkapsid verpackt ist. Bereits in vielen vorangegangenen Studien wurde der M13 Phage bzw. Phagemide für das *phage display* genutzt (Qi *et al.*, 2012). Dabei werden Fusionsproteine aus M13 Kapsid-Proteinen und Zielproteinen gebildet. Diese werden dann gemeinsam mit ihrer genetischen Information produziert und können nach Funktion oder anderen Eigenschaften selektiert werden. Denkbar wäre die Fusion von Protein P3 mit einem Affinitäts-*tag*, wodurch gezielt Phagemidpartikel aus dem Kulturüberstand gebunden werden können. Chromatographisch könnte dann in nur einem Schritt sowohl eine starke Volumenreduktion als auch eine sehr hohe Reinheit erreicht werden.

8 Literaturverzeichnis

Ali, M. M. *et al.* (2014) 'Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine', *Chemical Society Reviews*, 43(10), p. 3324. doi: 10.1039/c3cs60439j.

Asano, S., Higashitani, A. and Horiuchi, K. (1999) 'Filamentous phage replication initiator protein gpII forms a covalent complex with the 5' end of the nick it introduced', *Nucleic Acids Research*, 27(8), pp. 1882–1889. doi: 10.1093/nar/27.8.1882.

Bai, H. *et al.* (2020) 'CRISPR/Cas9-mediated precise genome modification by a long ssDNA template in zebrafish', *BMC Genomics*, 21(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12864-020-6493-4.

Bellot, G. *et al.* (2013) 'DNA nanotubes for NMR structure determination of membrane proteins', *Nature Protocols*, 8(4), pp. 755–770. doi: 10.1038/nprot.2013.037.

Berg, J. M. *et al.* (2018) *Stryer Biochemie*. 8th edn. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH Deutschland. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54620-8>.

Boeke, J. D., Model, P. and Zinder, N. D. (1982) 'Effects of Bacteriophage f1 Gene III Protein on the Host Cell Membrane', 16, pp. 185–192.

Branston, S. D. *et al.* (2013) 'Determination of the survival of bacteriophage M13 from chemical and physical challenges to assist in its sustainable bioprocessing', *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(3), pp. 560–566. doi: 10.1007/s12257-012-0776-9.

Brechner, E., Dinkelaker, B. and Dreesmann, D. (2015) *Kompaktlexikon der Biologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. Available at: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/>.

Brödel, A. K., Jaramillo, A. and Isalan, M. (2016) 'Engineering orthogonal dual transcription factors for multi-input synthetic promoters', *Nature Communications*, 7, p. 13858. doi: 10.1038/ncomms13858.

Brödel, A. K., Jaramillo, A. and Isalan, M. (2017) 'Intracellular directed evolution of proteins from combinatorial libraries based on conditional phage replication', *Nature protocols*. Nature Publishing Group, 12(9), pp. 1830–1843. doi: 10.1038/nprot.2017.084.

Bush, J. *et al.* (2020) 'Synthesis of DNA origami scaffolds: Current and emerging strategies', *Molecules*, 25(15), pp. 1–18. doi: 10.3390/molecules25153386.

Castan, A. and Enfors, S. O. (2000) 'Characteristics of a DO-controlled fed-batch culture of

- Escherichia coli', *Bioprocess Engineering*, 22(6), pp. 509–515. doi: 10.1007/s004499900094.
- Castan, A. and Enfors, S. O. (2001) 'Formate accumulation due to DNA release in aerobic cultivations of Escherichia coli', *Biotechnology and Bioengineering*, 77(3), pp. 324–328. doi: 10.1002/bit.1198.
- Chandrasekaran, A. R. *et al.* (2016) 'Beyond the Fold: Emerging Biological Applications of DNA Origami', *ChemBioChem*, pp. 1081–1089. doi: 10.1002/cbic.201600038.
- Chasteen, L. *et al.* (2006) 'Eliminating helper phage from phage display', *Nucleic Acids Research*, 34(21), pp. 1–11. doi: 10.1093/nar/gkl772.
- Chen, J. *et al.* (2020) 'Tailoring DNA Self-assembly to Build Hydrogels', *Topics in Current Chemistry*. Springer International Publishing, 378(2), p. 32. doi: 10.1007/s41061-020-0295-7.
- Chen, J. and Seeman, N. C. (1991) 'Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube', *Nature*, 350(6319), pp. 631–633. doi: 10.1038/350631a0.
- Chmiel, H. (2011) *Bioprozesstechnik*. 3rd edn. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Chmiel, H., Takors, R. and Weuster-Botz, D. (2018) *Bioprozesstechnik*. 4th edn. Berlin: Springer Spektrum. doi: 10.1007/978-3-662-54042-8.
- Citartan, M. *et al.* (2011) 'Conditions optimized for the preparation of single-stranded DNA (ssDNA) employing lambda exonuclease digestion in generating DNA aptamer', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), pp. 1167–1173. doi: 10.1007/s11274-010-0563-8.
- Citartan, M. *et al.* (2012) 'Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation', *Analyst*, 137(6), pp. 1307–1315. doi: 10.1039/c2an15905h.
- Clarke, M. *et al.* (2008) 'F-pili dynamics by live-cell imaging', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(46), pp. 17978–17981. doi: 10.1073/pnas.0806786105.
- Derr, N. D. *et al.* (2012) 'Tug-of-war in motor protein ensembles revealed with a programmable DNA origami scaffold', *Science*, 338(6107), pp. 662–665. doi: 10.1126/science.1226734.
- Deutscher, J., Francke, C. and Postma, P. W. (2006) 'How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), pp. 939–1031. doi: 10.1128/mmb.00024-06.
- Dittrich, C. R., Bennett, G. N. and San, K.-Y. (2005) 'Characterization of the Acetate-Producing Pathways in Escherichia coli', *Biotechnology Progress*, 21(4), pp. 1062–1067. doi: 10.1021/bp050073s.
- Dotto, G. P., Enea, V. and Zinder, N. D. (1981) 'Gene II of phage f1: Its functions and its

products', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(9 II), pp. 5421–5424. doi: 10.1073/pnas.78.9.5421.

Dotto, Gian Paolo, Enea, V. and Zinder, N. D. (1981) 'Functional analysis of bacteriophage f1 intergenic region', *Virology*, 114(2), pp. 463–473. doi: 10.1016/0042-6822(81)90226-9.

Dotto, G. P., Horiuchi, K. and Zinder, N. D. (1982) 'Initiation and termination of phage f1 plus-strand synthesis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(23), pp. 7122–7126. doi: 10.1073/pnas.79.23.7122.

Dotto, G. P., Horiuchi, K. and Zinder, N. D. (1984) 'The functional origin of bacteriophage f1 DNA replication', *Journal of Molecular Biology*, 172(4), pp. 507–521. doi: 10.1016/S0022-2836(84)80020-0.

Dotto, G. P. and Zinder, N. D. (1983) 'The morphogenetic signal of bacteriophage f1', *Virology*, 130(1), pp. 252–256. doi: 10.1016/0042-6822(83)90136-8.

Dotto, G. P. and Zinder, N. D. (1984) 'Reduction of the minimal sequence for initiation of DNA synthesis by qualitative or quantitative changes of an initiator protein', *Nature*, 311(5983), pp. 279–280. doi: 10.1038/311279a0.

Douglas, S. M. *et al.* (2009) 'Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes', *Nature*, 459, pp. 414–418. doi: 10.1038/nature08016.

Douglas, S. M., Bachelet, I. and Church, G. M. (2012) 'A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads', *Science*, 335(6070), pp. 831–834. doi: 10.1126/science.1214081.

Douglas, S. M., Chou, J. J. and Shih, W. M. (2007) 'DNA-nanotube-induced alignment of membrane proteins for NMR structure determination', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(16), pp. 6644–6648. doi: 10.1073/pnas.0700930104.

Endo, M. *et al.* (2015) 'Single-Molecule Visualization of the Activity of a Zn²⁺-Dependent DNAzyme', *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(36), pp. 10550–10554. doi: 10.1002/anie.201504656.

Engelhardt, F. A. S. *et al.* (2019) 'Custom-Size, Functional, and Durable DNA Origami with Design-Specific Scaffolds', *ACS Nano*, 13(5), pp. 5015–5027. doi: 10.1021/acsnano.9b01025.

Engler, C., Kandzia, R. and Marillonnet, S. (2008) 'A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability', *PLoS ONE*, 3(11). doi: 10.1371/journal.pone.0003647.

- Escherich, T. (1885) 'Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings', *Sitzungsberichte der Gesellschaft für Morphologie und Physiologie*, 2(1), p. 135.
- Feng, J. N., Russel, M. and Model, P. (1997) 'A permeabilized cell system that assembles filamentous bacteriophage', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), pp. 4068–4073. doi: 10.1073/pnas.94.8.4068.
- Feng, J. nong, Model, P. and Russel, M. (1999) 'A trans-envelope protein complex needed for filamentous phage assembly and export', *Molecular Microbiology*, 34(4), pp. 745–755. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01636.x.
- Forsheit, A., Ray, D. and Lica, L. (1971) 'Replication of Bacteriophage M13', *Journal of Molecular Biology*, 57, pp. 117–127.
- Fu, T. J. and Seeman, N. C. (1993) 'DNA double-crossover molecules', *Biochemistry*, 32(13), pp. 3211–3220. doi: 10.1021/bi00064a003.
- Funke, J. J. *et al.* (2016) 'Uncovering the forces between nucleosomes using DNA origami', *Science Advances*, 2(11). doi: 10.1126/sciadv.1600974.
- Funke, J. J. and Dietz, H. (2016) 'Placing molecules with Bohr radius resolution using DNA origami', *Nature Nanotechnology*. Nature Publishing Group, 11(1), pp. 47–52. doi: 10.1038/nnano.2015.240.
- Gibson, D. G. *et al.* (2009) 'Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases.', *Nature methods*, 6(5), pp. 343–5. doi: 10.1038/nmeth.1318.
- Gillmore, J. D. *et al.* (2021) 'CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis', *New England Journal of Medicine*, pp. 1–10. doi: 10.1056/nejmoa2107454.
- Gu, H. *et al.* (2013) 'Small, highly active DNAs that hydrolyze DNA', *Journal of the American Chemical Society*, 135(24), pp. 9121–9129. doi: 10.1021/ja403585e.
- Gu, H. and Breaker, R. R. (2013) 'Production of single-stranded DNAs by self-cleavage of rolling-circle amplification products', *BioTechniques*, 54(6), pp. 337–343. doi: 10.2144/000114009.
- Gyllensten, U. B. and Erlich, H. A. (1988) 'Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(20), pp. 7652–7656. doi: 10.1073/pnas.85.20.7652.
- Hewitt, C. J. *et al.* (2000) 'Studies related to the scale-up of high-cell-density *E. coli* fed-batch fermentations using multiparameter flow cytometry: Effect of a changing microenvironment

with respect to glucose and dissolved oxygen concentration', *Biotechnology and Bioengineering*, 70(4), pp. 381–390. doi: 10.1002/1097-0290(20001120)70:4<381::AID-BIT3>3.0.CO;2-0.

Hoffmann-Thoms, S. *et al.* (2013) 'Initiation of phage infection by partial unfolding and prolyl isomerization', *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), pp. 12979–12991. doi: 10.1074/jbc.M112.442525.

Hofschneider, P. H. (1963) 'Untersuchungen über „kleine“ E.coli K 12 Bakteriophagen', *Zeitschrift für Naturforschung*, 18 b, pp. 203–210.

Hohn, B., Lechner, H. and Marvin, D. A. (1971) 'Filamentous Bacterial Viruses I. DNA Synthesis during the Early Stages of Infection with fd', *Journal of Molecular Biology*, 56, pp. 143–154.

Holliday, R. (1964) 'A mechanism for gene conversion in fungi', *Genetical Research*. Technische Universitaet Muenchen, 5(2), pp. 282–304. doi: 10.1017/S0016672300001233.

Horn, U. *et al.* (1996) 'High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in Escherichia coli , using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5–6), pp. 524–532. doi: 10.1007/s002530050855.

Jungmann, R. *et al.* (2010) 'Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami', *Nano Letters*, 10(11), pp. 4756–4761. doi: 10.1021/nl103427w.

Karlsson, F. *et al.* (2005) 'Genome-wide comparison of phage M13-infected vs. uninfected Escherichia coli.', *Canadian journal of microbiology*, 51(1), pp. 29–35. doi: 10.1139/w04-113.

Ketterer, P., Willner, E. M. and Dietz, H. (2016) 'Nanoscale rotary apparatus formed from tight-fitting 3D DNA components', *Science Advances*, 2(2), pp. e1501209–e1501209. doi: 10.1126/sciadv.1501209.

Kick, B. *et al.* (2015) 'Efficient Production of Single-Stranded Phage DNA as Scaffolds for DNA Origami', *Nano Letters*, 15, pp. 4672–4676. doi: 10.1021/acs.nanolett.5b01461.

Kick, B., Behler, K. L., *et al.* (2017) 'Chemostat studies of bacteriophage M13 infected Escherichia coli JM109 for continuous ssDNA production', *Journal of Biotechnology*, 258(January), pp. 92–100. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.409.

Kick, B., Hensler, S., *et al.* (2017) 'Specific growth rate and multiplicity of infection affect high-cell-density fermentation with bacteriophage M13 for ssDNA production', *Biotechnology and Bioengineering*, 114(4), pp. 777–784. doi: 10.1002/bit.26200.

- Kong, R. M. *et al.* (2013) 'Pyrophosphate-regulated Zn²⁺-dependent DNAzyme activity: An amplified fluorescence sensing strategy for alkaline phosphatase', *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 50, pp. 351–355. doi: 10.1016/j.bios.2013.06.064.
- Langecker, M. *et al.* (2012) 'Synthetic lipid membrane channels formed by designed DNA nanostructures.', *Science (New York, N.Y.)*, 338(6109), pp. 932–6. doi: 10.1126/science.1225624.
- Lee, B. *et al.* (2021) 'Optimizing protein V untranslated region sequence in M13 phage for increased production of single-stranded DNA for origami', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, pp. 1–8.
- Levene, P. A. (1919) 'Yeast Nucleic', *Journal of Biological Chemistry*, 40, pp. 415–124.
- Lewis, M. (2005) 'The lac repressor', *Comptes Rendus Biologies*, 328(6), pp. 521–548. doi: 10.1016/j.crv.2005.04.004.
- Li, S. *et al.* (2018) 'A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger in vivo', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 36(3), pp. 258–264. doi: 10.1038/nbt.4071.
- Linko, V. and Dietz, H. (2013) 'The enabled state of DNA nanotechnology', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 24(4), pp. 555–561. doi: 10.1016/j.copbio.2013.02.001.
- Loeb, T. (1960) 'Isolation of a bacteriophage specific for the F plus and Hfr mating types of Escherichia coli K-12.', *Science (New York, N.Y.)*, 131(7), pp. 932–933. doi: 10.1126/science.131.3404.932.
- Mai-Prochnow, a. *et al.* (2015) "Big things in small packages: the genetics of filamentous phage and effects on fitness of their host", *FEMS Microbiology Reviews*, (March 2014), pp. 1–23. doi: 10.1093/femsre/fuu007.
- Marras, A. E. *et al.* (2015) 'Programmable motion of DNA origami mechanisms', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(3), pp. 713–718. doi: 10.1073/pnas.1408869112.
- Marvin, D. (1998) 'Filamentous phage structure, infection and assembly', *Current Opinion in Structural Biology*, 8(2), pp. 150–158. doi: 10.1016/S0959-440X(98)80032-8.
- Marvin, D. A., Symmons, M. F. and Straus, S. K. (2014) 'Structure and assembly of filamentous bacteriophages', *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, pp. 80–122. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2014.02.003.
- Mastrorade, D. N. (2005) 'Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements', *Journal of Structural Biology*, 152(1), pp. 36–51. doi:

10.1016/j.jsb.2005.07.007.

Messing, J. *et al.* (1977) 'Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a HindIII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(9), pp. 3642–3646. doi: 10.1073/pnas.74.9.3642.

Messing, J., Crea, R. and Seeburg, P. H. (1981) 'A system for shotgun DNA sequencing.', *Nucleic Acids Research*, 9(2), pp. 309–21. doi: 10.1093/nar/9.2.309.

Messing, J. and Vieira, J. (1982) 'A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments', *Gene*, 19, pp. 269–276. doi: 10.1016/0378-1119(82)90016-6.

Miescher, F. (1871) 'Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzelle', in Hoppe-Seyler, F. (ed.) *Medizinsch-chemische Untersuchungen*. Berlin: August Hirschwald, pp. 441–460.

Model, P. *et al.* (1982) 'The replication of bacteriophage f1: gene V protein regulates the synthesis of gene II protein', *Cell*, 29(2), pp. 329–35.

Monod, J. (1949) 'THE GROWTH OF BACTERIAL CULTURES', *Annual Review of Microbiology*, 3(1), pp. 371–394. doi: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103.

Norrande, J., Kempe, T. and Messing, J. (1983) 'Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis', *Gene*, 26, pp. 101–106. doi: doi:10.1016/0378-1119(83)90040-9.

Notley, L. and Ferenci, T. (1995) 'Differential expression of mal genes under cAMP and endogenous inducer control in nutrient-stressed *Escherichia coli*', *Molecular Microbiology*, 16(1), pp. 121–129. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02397.x.

Oppenheim, A. B. *et al.* (2005) 'Switches in Bacteriophage Lambda Development', *Annual Review of Genetics*, 39(1), pp. 409–429. doi: 10.1146/annurev.genet.39.073003.113656.

Pfützner, E. *et al.* (2013) 'Rigid DNA beams for high-resolution single-molecule mechanics', *Angewandte Chemie - International Edition*, 52(30), pp. 7766–7771. doi: 10.1002/anie.201302727.

Praetorius, F. *et al.* (2017) 'Biotechnological mass production of DNA origami', *Nature*. Nature Publishing Group, 552(7683), pp. 84–87. doi: 10.1038/nature24650.

Pratt, D. and Erdahl, W. S. (1968) 'Genetic control of bacteriophage M13 DNA synthesis.', *Journal of molecular biology*, 37(1), pp. 181–200. doi: 10.1016/0022-2836(68)90082-X.

Qi, H. *et al.* (2012) 'Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 417(3), pp. 129–143. doi:

10.1016/j.jmb.2012.01.038.

Quadros, R. M. *et al.* (2017) 'Easi-CRISPR: A robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins', *Genome Biology*. *Genome Biology*, 18(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s13059-017-1220-4.

Rakonjac, J. *et al.* (2011) 'Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications.', *Current issues in molecular biology*, 13(2), pp. 51–76. doi: 10.1002/9780470015902.a0000777.

Rakonjac, J. and Bennett, N. J. (2009) 'Filamentous Bacteriophage : Biology , Phage Display and Nanotechnology Applications', pp. 51–76.

Rakonjac, J., Feng, J. nong and Model, P. (1999) 'Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII', *Journal of Molecular Biology*, 289(5), pp. 1253–1265. doi: 10.1006/jmbi.1999.2851.

Rasched, I. and Oberer, E. (1986) 'Ff coliphages: structural and functional relationships.', *Microbiological reviews*, 50(4), pp. 401–427.

Reddy, P. and McKenney, K. (1996) 'Improved method for the production of M13 phage and single-stranded DNA for DNA sequencing', *BioTechniques*, 20(5), pp. 854–860. doi: 10.2144/96205st05.

Riesenberg, D. (1991) 'High-cell-density cultivation of Escherichia coli.', *Current opinion in biotechnology*, 2(3), pp. 380–384. doi: 10.1016/S0958-1669(05)80142-9.

Riesenberg, D. *et al.* (1991) 'High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate.', *Journal of biotechnology*, 20(1), pp. 17–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1367313>.

Riesenberg, D. and Guthke, R. (1999) 'High-cell-density cultivation of microorganisms', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(4), pp. 422–430. doi: 10.1007/s002530051412.

Roossinck, M. J. (2020) *Viren!*, *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-662-61684-0.

Rosano, G. L. and Ceccarelli, E. A. (2014) 'Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges', *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), pp. 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.

Rothemund, P. W. K. (2006) 'Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns.', *Nature*, 440(7082), pp. 297–302. doi: 10.1038/nature04586.

- Russel, M. and Model, P. (1989) 'Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with it.', *Journal of virology*, 63(8), pp. 3284–95. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=250900&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sadler, J. R., Sasmor, H. and Betz, J. L. (1983) 'A perfectly symmetric lac operator binds the lac repressor very tightly.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(22), pp. 6785–9. doi: 10.1073/pnas.80.22.6785.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) 'DNA sequencing with chain-terminating inhibitors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), pp. 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Schein, C. H. and Noteborn, M. H. M. (1988) 'Formation of Soluble Recombinant Proteins in Escherichia Coli is Favored by Lower Growth Temperature', *Nature Biotechnology*, 6(3), pp. 291–294. doi: 10.1038/nbt0388-291.
- Scheres, S. H. W. (2012) 'RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination', *Journal of Structural Biology*. Elsevier Inc., 180(3), pp. 519–530. doi: 10.1016/j.jsb.2012.09.006.
- Seeman, N. C. (1982) 'Nucleic acid junctions and lattices', *Journal of Theoretical Biology*, 99(2), pp. 237–247. doi: 10.1016/0022-5193(82)90002-9.
- Senn, H. *et al.* (1994) 'The growth of Escherichia coli in glucose-limited chemostat cultures: a re-examination of the kinetics', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1201(3), pp. 424–436. doi: 10.1016/0304-4165(94)90072-8.
- Seo, S. W. *et al.* (2013) 'Predictive design of mRNA translation initiation region to control prokaryotic translation efficiency', *Metabolic Engineering*. Elsevier, 15(1), pp. 67–74. doi: 10.1016/j.ymben.2012.10.006.
- Shaw, A. *et al.* (2014) 'Spatial control of membrane receptor function using ligand nanocalipers', *Nature Methods*, 11(8), pp. 841–846. doi: 10.1038/nMeth.3025.
- Shepherd, T. R. *et al.* (2019) 'Bioproduction of pure, kilobase-scale single-stranded DNA', *Scientific Reports*. Springer US, 9(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-019-42665-1.
- Shiloach, J. and Fass, R. (2005) 'Growing E. coli to high cell density - A historical perspective on method development', *Biotechnology Advances*, 23(5), pp. 345–357. doi: 10.1016/j.biotechadv.2005.04.004.
- Sigl, C. *et al.* (2021) 'Programmable icosahedral shell system for virus trapping', *Nature*

- Materials*. Springer US. doi: 10.1038/s41563-021-01020-4.
- Silverman, S. K. (2005) 'In vitro selection, characterization, and application of deoxyribozymes that cleave RNA', *Nucleic Acids Research*, 33(19), pp. 6151–6163. doi: 10.1093/nar/gki930.
- Simons, A. *et al.* (1984) 'Possible ideal lac operator: Escherichia coli lac operator-like sequences from eukaryotic genomes lack the central G X C pair', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(6), pp. 1624–1628. doi: 10.1073/pnas.81.6.1624.
- Slonczewski, J. and Foster, J. (2012) *Mikrobiologie*. 2nd edn. Heidelberg: Springer Spektrum.
- Smeal, S. W. *et al.* (2017a) 'Simulation of the M13 life cycle I: Assembly of a genetically-structured deterministic chemical kinetic simulation', *Virology*. Elsevier, 500, pp. 259–274. doi: 10.1016/j.virol.2016.08.017.
- Smeal, S. W. *et al.* (2017b) 'Simulation of the M13 life cycle II: Investigation of the control mechanisms of M13 infection and establishment of the carrier state', *Virology*. Elsevier, 500, pp. 275–284. doi: 10.1016/j.virol.2016.08.015.
- Sobczak, J.-P. J. *et al.* (2012) 'Rapid Folding of DNA into Nanoscale Shapes at Constant Temperature', *Science*, 338(6113), pp. 1458–1461. doi: 10.1126/science.1229919.
- Spechthrie, L. *et al.* (1992) 'Construction of a microphage variant of filamentous bacteriophage', *Journal of Molecular Biology*, 228(3), pp. 720–724. doi: 10.1016/0022-2836(92)90858-H.
- Steinsiek, S. and Bettenbrock, K. (2012) 'Glucose Transport in Escherichia coli Mutant Strains with Defects in Sugar Transport Systems', *Journal of Bacteriology*, 194(21), pp. 5897–5908. doi: 10.1128/JB.01502-12.
- Stömmer, P. *et al.* (2021) 'A synthetic tubular molecular transport system', *Nature Communications*. Springer US, 12(1), p. 4393. doi: 10.1038/s41467-021-24675-8.
- Tataurov, A. V., You, Y. and Owczarzy, R. (2008) 'Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids', *Biophysical Chemistry*, 133(1–3), pp. 66–70. doi: 10.1016/j.bpc.2007.12.004.
- Tenaillon, O. *et al.* (2010) 'The population genetics of commensal Escherichia coli', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 8(3), pp. 207–217. doi: 10.1038/nrmicro2298.
- Vieira, J. and Messing, J. (1987) 'Production of single-stranded plasmid DNA.', *Methods in enzymology*, 153(1982), pp. 3–11. doi: 10.1016/0076-6879(87)53044-0.
- Wagenbauer, K. F. *et al.* (2017) 'How We Make DNA Origami', *ChemBioChem*, 18(19), pp. 1873–1885. doi: 10.1002/cbic.201700377.

Watson, J. and Crick, F. (1953) 'Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid', *Nature*, 171(4356), pp. 737–738. doi: <https://doi.org/10.1038/171737a0>.

Weuster-Botz, D. (1999) *Die Rolle der Reaktionstechnik in der mikrobiellen Verfahrenstechnik*. Jülich.

Weuster-Botz, D. *et al.* (2005) 'Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design.', *Bioprocess and biosystems engineering*, 28(2), pp. 109–19. doi: 10.1007/s00449-005-0011-6.

van Wezenbeek, P. M., Hulsebos, T. J. and Schoenmakers, J. G. (1980) 'Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd.', *Gene*, 11(1–2), pp. 129–148. doi: 10.1016/0378-1119(80)90093-1.

Xue, C. and Greene, E. C. (2021) 'DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing', *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd, 37(7), pp. 639–656. doi: 10.1016/j.tig.2021.02.008.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) 'Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.', *Gene*, 33(1), pp. 103–119. doi: 10.1016/0378-1119(85)90120-9.

Zadeh, J. N. *et al.* (2011) 'NUPACK: Analysis and Design of Nucleic Acid Systems', *Journal of computational chemistry*, 32, pp. 170–173. doi: 10.1002/jcc.21596.

Zhou, C., Duan, X. and Liu, N. (2015) 'A plasmonic nanorod that walks on DNA origami', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 8102. doi: 10.1038/ncomms9102.

Zinder, N. D. and Boeke, J. D. (1982) 'The filamentous phage (Ff) as vectors for recombinant DNA- a review', *Gene*, 19(1), pp. 1–10. doi: 10.1016/0378-1119(82)90183-4.

9 Anhang

9.1 Zusatzarbeiten zur Reduktion der Fix-Sequenz des Phagemidrückgrats

Durch den Transfer von Gen 3 vom Helferplasmid auf das Phagemid konnte die Methode der „Reversen Infektion“, bei der *E. coli*, transformiert mit einem Helferplasmid, mit Phagemidpartikeln infiziert werden, ermöglicht werden. So lassen sich nutzerdefinierte Sequenzen als ssDNA herstellen. In das Phagemidrückgrat können beliebige Sequenzen einfach und schnell eingefügt werden und mit Hilfe von DNAzymen können die hergestellten ssDNA Moleküle geschnitten werden. So kann im Nachhinein auch das Phagemidrückgrat wieder von der nutzerdefinierten Sequenz getrennt werden. Dabei besteht die Möglichkeit, das Phagemidrückgrat als Gerüststrang für DNA-Origami zu nutzen und so ganze Origami-Strukturen auf einem Phagemid zu Kodieren. Ist allerdings Ziel der ssDNA Produktion die Herstellung einer bestimmten Sequenz, entweder als eigener Gerüststrang mit besonderen Eigenschaften oder gar für eine gänzlich andere Anwendung als DNA-Origami, so fällt das Phagemidrückgrat als „Abfall“ an. Es kann dann chromatographisch von der Zielsequenz getrennt werden (Praetorius *et al.*, 2017). Der Teil des Phagemids, der allerdings nicht benötigt wird, schmälert die Produktausbeute, während gleichzeitig die Größe des Inserts begrenzt ist. Denn auch für Phagemide gilt, dass ssDNA Produkte von über 12000 Basen Länge nur deutlich erschwert produziert werden können.

Um also größere *Inserts* zu ermöglichen und gleichzeitig weniger „Abfall“ zu erzeugen, muss die Länge des Phagemidrückgrats, die bisher bei 3138 Basen liegt (cp6(G3)), reduziert werden. Da allerdings die meisten Sequenzen funktionell essentiell sind, kann nur bei der Expressionskassette für Gen 3 gespart werden. Diese Expressionskassette bietet mit einer Länge von 1340 Basen zusätzlich einiges an Potenzial für Einsparungen.

Eine mögliche Lösung für die Problematik wäre Gen 3 auf dem Helferplasmid zu platzieren und mit einem entsprechend gut regulierten Promotor zu versehen, so dass keine Expression auftritt, solange kein Induktionsmittel zu der Kultur gegeben wurde. Auch wenn dieses Vorgehen möglicherweise auch die „Reverse Infektion“ ermöglichen würde, so kann die Kultur nur im Ganzen induziert werden. Da allerdings zuvor gezeigt werden konnte, dass eine frühe, aber partielle Infektion vorteilhaft sein kann, ist eine Induktion nachteilhaft, da dafür stets eine komplette Infektion nötig ist. Demnach sollte die Möglichkeit erhalten bleiben, die Expression von Gen 3 durch die Infektion mit einem Phagemidpartikel zu induzieren.

Dies kann durch einen Promotor erreicht werden, der wiederum durch die Expression eines Proteins induziert wird. In dieser Arbeit wurde dafür der bistabile Schalter des Lambda Phagen genutzt.

Der Lambda Schalter ist ein bidirektionaler Promotor der im Genom des Bakteriophagen Lambda liegt und durch zwei kleine Proteine (CRO und CI) reguliert wird. Natürlicherweise schaltet er zwischen dem Lysogenen und dem Lytischen Zyklus des Phagen um. Auf dem (+)-Strang wird das Gen CRO exprimiert und auf dem (-)-Strang das Gen CI. Ihre Produkte reprimieren jeweils die Expression des anderen. So wird der Schalter bistabil, da eine Abschriebrichtung solange stabil ist, bis durch exogene Faktoren das Gleichgewicht gestört wird und der Schalter in die andere Richtung umgelegt wird (Oppenheim *et al.*, 2005).

Dieses Funktionsprinzip wurde hier genutzt, um die Gen 3 Expression auf dem Helferplasmid stabil ein und ausschalten zu können. Wie in Abbildung 9.1 gezeigt, wird dazu der Lambdaschalter in das Helferplasmid eingebaut, wobei die Expression in (+)-Strang-Richtung für die Expression von Gen 3 genutzt wird. Ohne äußere Einwirkung wird dadurch nur das Protein CI gebildet, welches die Expression von Gen 3 stabil reprimiert. In das Phagemid wird eine starke Expressionskassette für das Gen CRO eingefügt, die mit einer Länge von lediglich 262 Basen deutlich kleiner ist als die ursprüngliche Gen 3 Expressionskassette. Nach Infektion einer Zelle mit Helferplasmid durch das Phagemid beginnt diese das Protein CRO zu bilden. Dieses verdrängt die CI Proteine von den Operator-Stellen, wodurch die Expression von Gen CI beendet wird und die Expression von Gen 3 induziert wird.

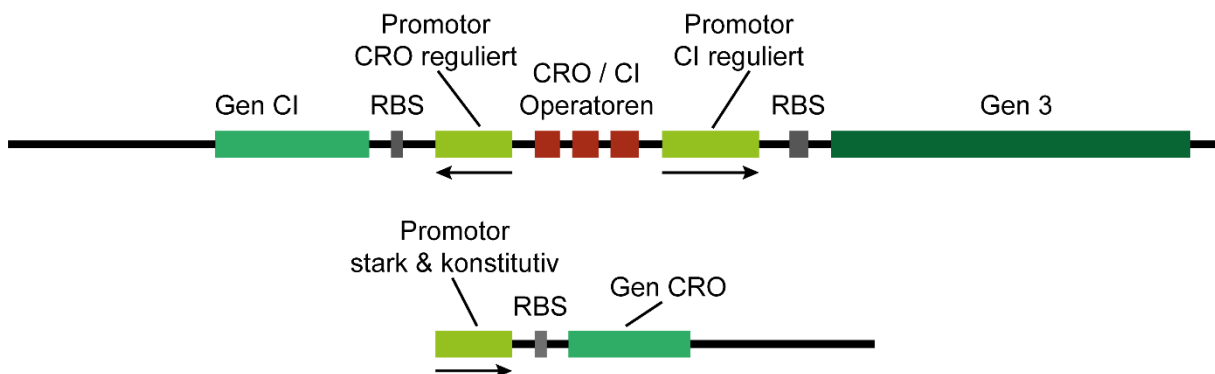


Abbildung 9.1: Schematische Darstellung der DNA Sequenzen, die in das Helferplasmid (oben) und das Phagemid (unten) eingefügt werden, um das Konzept des Lambda-Schalters zu ermöglichen. Durch das Helferplasmid wird zunächst das Gen CI exprimiert, wodurch der CI regulierte Promotor reprimiert wird. Es wird demnach kein Protein P3 gebildet. Auf dem Phagemid befindet sich eine Expressionskassette für das Gen CRO. Diese sorgt für eine sehr hohe Produktion von Protein CRO bei Infektion durch ein Phagemidpartikel. Die vielen CRO Proteine verdrängen CI von den Operator-Stellen, wodurch die Expression von Gen CI reprimiert und die Expression von Gen 3 induziert wird.

Mit diesem Konzept wurden wiederum ein Phagemid und ein Helferplasmid erstellt. Das Phagemid, dargestellt in Abbildung 9.2, basierte auf cp5(G3), wobei die Expressionskassette für Gen 3 durch die für Gen CRO ersetzt wurde. Ansonsten wurde die Sequenz des cp5(G3) beibehalten.

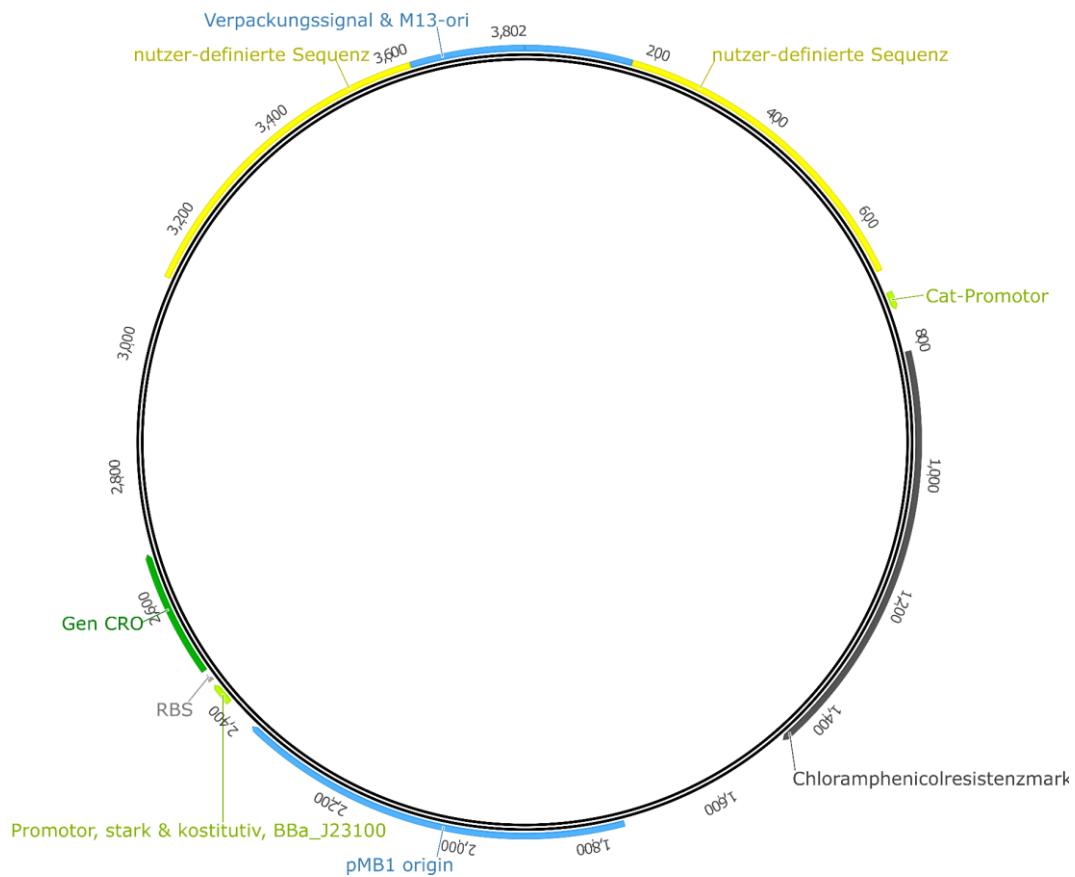


Abbildung 9.2: Plasmidkarte des Phagemids cp9(CRO). Das Phagemid beruht auf cp5(G3), wobei die Expressionskassette für Gen 3 entfernt wurde und eine starke, konstitutive Expressionskassette für Gen CRO eingefügt wurde.

Das neue Helferplasmid pfhp31, dargestellt in Abbildung 9.3, basierte auf dem Helferplasmid pfhp30. Zwischen dem Gen 4 und dem Doppelterminator vor dem p15A ori wurde der Lambdасhalter eingefügt. Dabei wurde in (-)-Strang-Richtung nicht nur das Gen CI mitgenommen, sondern auch die Gene *rexa* und *rexb* sowie weitere CRO Operatoren. Diese verhindern während der Abwesenheit von Protein CRO eine übermäßige Produktion von CI.

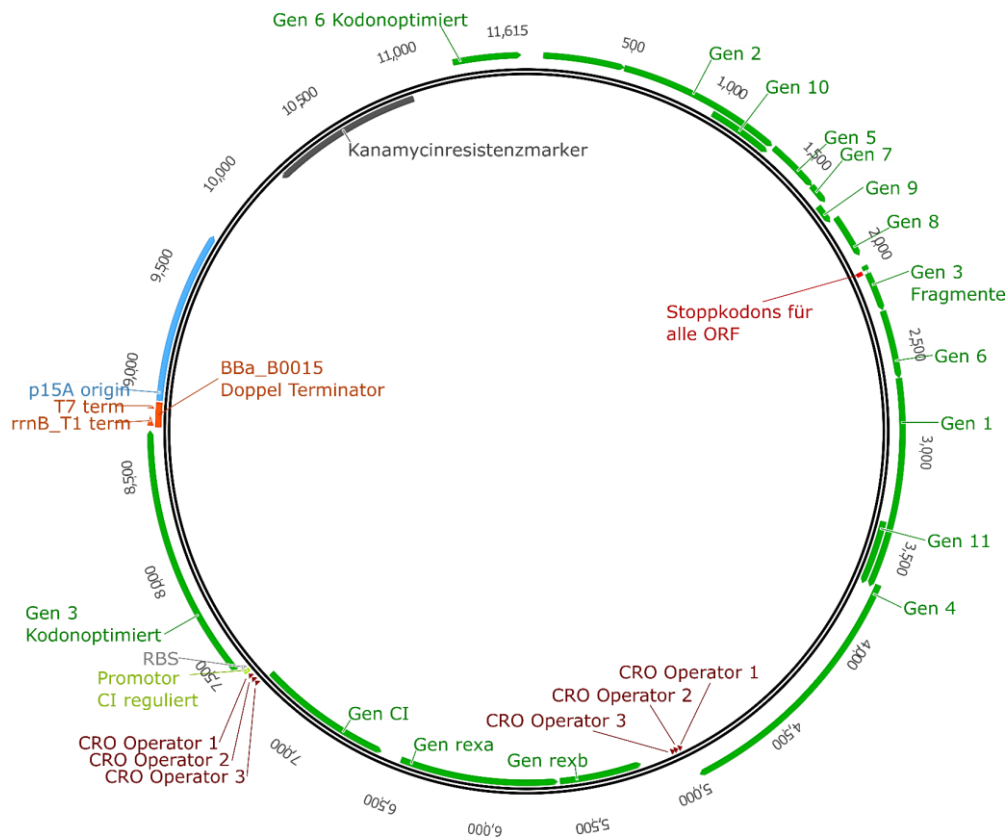


Abbildung 9.3: Plasmidkarte des Helferplasmids pFhp31. Das Helferplasmid basiert auf pFhp30. Der Lambda-Schalter ist hier zusätzlich zwischen Gen4 und dem Doppelterminator eingefügt. Dabei bleibt die CI Seite ((-)-Strang) des Schalters komplett erhalten, während die CRO Seite ((+)-Strang) anstelle des Gen CRO das Gen 3 exprimiert. Durch den zweiten Satz CRO Operatoren nach den Genen rexa und rexb wird eine übermäßige Produktion von Protein CI vermieden.

Mit den so designten Plasmiden wurde eine Hochzelldichtekultivierung zur Produktion von ssDNA durchgeführt. Dabei wurde grundsätzlich so vorgegangen, wie bereits etabliert. *E. coli* JM109 transformiert mit dem Helferplasmid pFhp31 wurden in der Satzphase kultiviert. Nach Ende der Satzphase wurde die Kultur auf 30°C temperiert und nach 30 Minuten gleichzeitig der Zulauf gestartet und mit Phagemidpartikeln cp9(CRO) infiziert. Die Infektion wurde bewusst früher durchgeführt als bisher, da damit die Zeit für das Umschalten des Lambda-Schalters berücksichtigt wurde.

In Abbildung 9.4 ist zu erkennen, dass auch in diesem Prozess der Zulauf frühzeitig reduziert werden musste, da die Viskosität der Kultur eine ausreichende Sauerstoffversorgung erschwerte. Dementsprechend wurde auch lediglich eine Biotrockenmassekonzentration von etwa 76 g l⁻¹ erreicht. Bei der ssDNA Konzentration ist zu erkennen, dass nach 10 Stunden Zulaufzeit die Standardabweichung bei einigen Proben sehr groß wurde. Dies war durch die erschwerte Isolierung der ssDNA bedingt. Für die Regression der Daten wurden diese Datenpunkte ausgelassen.

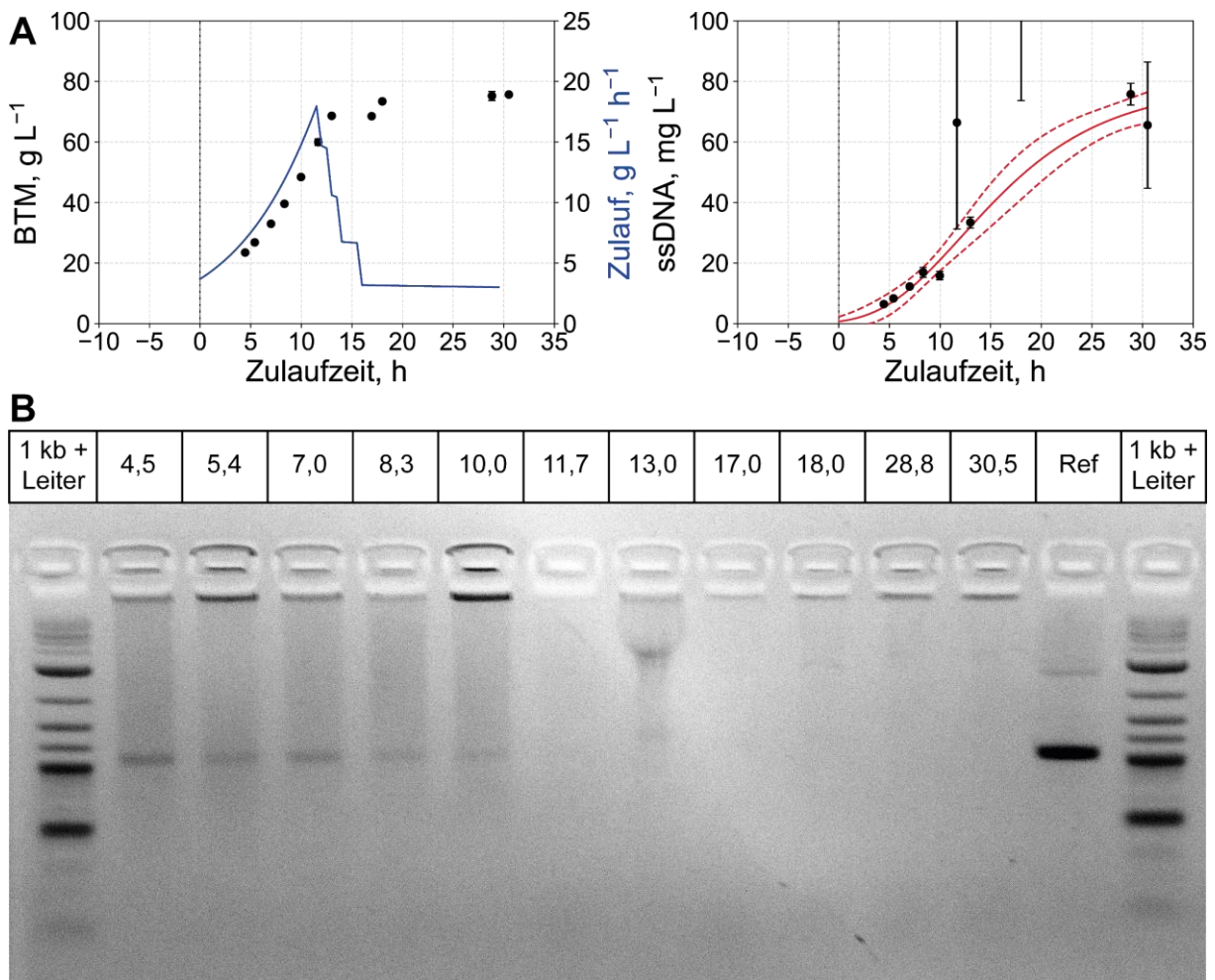


Abbildung 9.4: Hochzelldichtekultivierung im Rührkesselreaktor von *E. coli* JM109 transformiert mit dem Helferplasmid pfp31. Bei Zulaufstart wurde mit Phagemidpartikeln cp9(CRO) infiziert. Die Temperatur wurde 30 min vor Infektion von 37°C auf 30°C reduziert. **A**: Änderung der Biotrockenmassekonzentration, des Zulaufmassenstroms (Zulauf) und der ssDNA Konzentration über die Prozesszeit relativ zum Zulaufstart (Zulaufzeit). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung technischer Replikate dar. Rote Linien: sigmoidaler Fit (durchgehend), 95% Konfidenzbänder (gestrichelt) Datenpunkte mit sehr hoher Standardabweichung (>25% des Mittelwerts) wurden nicht für die Regression genutzt. **B**: AGEP der im Prozessverlauf isolierten ssDNA. Zahlen über den Gelspuren stehen für die Zulaufzeit in Stunden. Die Referenz (Ref) ist die ssDNA des Phagemids cp9(CRO).

In dem Gelbild der Agarosegelelektrophorese der ssDNA Proben im Verlauf dieser Kultivierung ist zu erkennen, dass nach 10 Stunden Zulaufzeit keine Produktbande mehr zu erkennen ist. Da diese allerdings zuvor gut ersichtlich ist, muss hier davon ausgegangen werden, dass Verunreinigungen der Proben eine saubere Analyse mittels Agarosegelelektrophorese unmöglich gemacht haben. Da die Proben bis 10 Stunden auf Höhe der Referenz laufen ist gegeben, dass hier die korrekte ssDNA produziert wurde. Da die Proben nach 10 Stunden Zulaufzeit nicht ordentlich analysiert werden konnten, kann hier lediglich die ssDNA-Konzentration zu dem Zeitpunkt, etwa 20 mg L⁻¹, als Maximum betrachtet werden.

Diskussion

Der Einsatz des Lambda-Schalters birgt das Potential die festgelegte Sequenz des Phagemidrückgrats von 3138 Basen auf 2060 Basen zu reduzieren. Dabei bleibt die

Funktionsweise der „Reversen Infektion“ komplett erhalten, da die Expression von Gen 3 nach wie vor durch die Infektion mit einem Phagemidpartikel induziert wird.

In der Hochzelldichtekultivierung in der das Konzept des Lambda-Schalters erprobt wurde, zeigte sich eine Zunahme der Kultur-Viskosität und damit ein erhöhtes Maß an Zellyse. Dies führte dazu, dass nach mehr als 10 Stunden Zulaufzeit der Anteil an Verunreinigungen in dem Produkt so hoch war, dass eine saubere Analyse mittels Agarosegelelektrophorese nicht mehr möglich war. Bis dahin wurden etwa 20 mg L⁻¹ ssDNA gebildet. Damit liegt die maximale Produktkonzentration zwar deutlich unter den etwa 83 mg L⁻¹, gleichzeitig konnte so der Anteil unnötiger Sequenz um etwa ein Drittel reduziert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit diesem Produktionssystem grundsätzlich ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz hergestellt werden kann. Hier sind jedoch weitere Untersuchungen zu Infektionsdichte und Infektionszeitpunkt nötig. Des Weiteren könnten verschiedenen Versionen der Expressionskassette für Gen CRO untersucht werden, die CRO unterschiedlich stark exprimieren. Nur wenn die Produktionsphase in diesem Prozess verlängert werden kann, ohne dabei durch Zellyse das Produkt stark zu verunreinigen, kann diese Produktionssystem einen Mehrwert für die Herstellung von ssDNA mit nutzerdefinierter Sequenz darstellen.

9.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
2xYT Medium	2-fach Hefe Trypton Medium
Å	Angström
ABC	<i>ATP binding cassette</i> , ATP Bindekassette
AGEP	Agarosegelelektrophorese
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BTM	Biotrockenmasse
cfu	<i>colony forming unit</i> , kolonieformende Einheit
CM	Chloramphenicolresistenzmarker
cp	<i>Chimeric plasmid</i> , Phagemid
CS	<i>custom scaffold</i> , Maßgefertigter Gerüststrang
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA

Abkürzung	Bedeutung
g	Gramm
h	Stunde
HCDC	<i>high cell density cultivation</i> , Hochzelldichtekultivierung
KLF	Kleinlaborfermenter
L	Liter
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> Medium
m	Meter
M	Molar
Min	Minute
MOI	Multiplizität der Infektion
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pfhp	<i>phage free helper plasmid</i> , Phagen freier Helferplasmid
pfu	<i>plaque forming unit</i> , Plaque formende Einheit
RB-Medium	Riesenberg Medium, Mineralmedium nach Riesenberg <i>et al.</i> 1991
RCA	<i>rolling circle amplification</i>
RF	replikative Form des M13 Genoms, dsDNA
RFP	rot fluoreszierendes Protein
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelstängige DNA
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer
tfu	<i>transforming unit</i> , transformierende Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
VIS	Spektrum sichtbaren Lichts
w/v	Gewichtsanteil bezogen auf Volumen

9.3 Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung, Einheit
μ	Spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
μ_{\max}	Maximale spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
μ_{set}	vorgegebene spezifische Wachstumsrate, h^{-1}
a	Parameter: maximal erreichbare ssDNA Konzentration, mg L^{-1}
b	Parameter: x-Achsenverschiebung, -
c	Parameter: maximale Steigung am Wendepunkt, -
C_i	Konzentration der Komponente i, g L^{-1}
$C_{i,\text{aus}}$	Konzentration der Komponente i im Ablauf, g L^{-1}
$C_{i,\text{ein}}$	Konzentration der Komponente i im Zulauf, g L^{-1}
C_P	Produktkonzentration, g L^{-1}
$C_{\text{Phagen/Phagemide}}$	Konzentration der Phagen bzw. Phagemidpartikel, pfu mL^{-1} bzw. tfu mL^{-1}
C_S	Substratkonzentration, g L^{-1}
C_{ssDNA}	Konzentration der ssDNA im Reaktormedium, mg L^{-1}
C_{ssDNA}	Konzentration der ssDNA in der Probe, mol mL^{-1}
C_X	Biomassekonzentration, g L^{-1}
C_{X0}	Biomassekonzentration zu Beginn der Reaktion, g L^{-1}
C_{Zellen}	Konzentration der Zellen, cfu mL^{-1}
F_{aus}	Ablaufvolumenstrom, L h^{-1}
F_{ein}	Zulaufvolumenstrom, L h^{-1}
K_S	Affinitätskonstante des Substrats, g L^{-1}
m_i	Masse der Komponente i, g
MOI	Multiplizität der Infektion, pfu cfu^{-1}
m_S	Substrataufnahmerate des Erhaltungsstoffwechsels, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
N_A	Avogadrokonstante, $\sim 6,0221 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
n_{Partikel}	Anzahl der Phagen- bzw. Phagemidpartikel in einem Milliliter, mL^{-1}
q_P	Spezifische Produktbildungsrate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
q_S	Spezifische Substrataufnahmerate, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_{S,\mu}$	Spezifische Substrataufnahmerate für das Zellwachstum, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
$q_{S,P}$	Substrataufnahmerate für die Produktbildung, $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$
r_i	Reaktionsgeschwindigkeit der Komponente i, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
r_P	Produktbildungsrate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
r_S	Substrataufnahmerate, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$

Symbol	Bedeutung, Einheit
r_x	Wachstumsgeschwindigkeit, $g L^{-1} h^{-1}$
rz_b	Relative Zentrifugalbeschleunigung, -
t	Zeit, h
upm	Umdrehungen pro Minute, min^{-1}
V_R	Reaktionsvolumen, L
$V_{R,0}$	Initiales Reaktionsvolumen, L
Y_{PS}	Produktselektivität, $g g^{-1}$
Y_{XS}	Biomasseertragskoeffizient, $g g^{-1}$
ϵ	Absorptionskoeffizient, $L mol^{-1} cm^{-1}$
η	Dynamische Viskosität, Pa s

9.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Rolling Circle Amplification.....	9
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung einer stabilen <i>Holliday Junction</i> (Seeman, 1982).11	
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des <i>scaffolded</i> DNA-Origami.....	12
Abbildung 3.4: Darstellung verschiedener DNA-Origami-Strukturen.....	13
Abbildung 3.5: Schematische Darstellung einer <i>E. coli</i> Zelle (nach Brechner <i>et al.</i> , 2015)....	15
Abbildung 3.6: Darstellung der enzymkatalysierten Reaktionsschritte der Glykolyse.....	16
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Reaktionen im Citratzyklus.....	17
Abbildung 3.8: Schematische Darstellung eines M13 Phagen.....	21
Abbildung 3.9: Elektronenmikroskopische Aufnahme von M13 Phagen.	22
Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des Infektionsmechanismus von M13	23
Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der Replikation von M13-Phagen.....	25
Abbildung 3.12: Theoretische Sekundärstruktur der intergenen Region (IG).	26
Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Sättigungskinetik nach Monod.	29
Abbildung 3.14: Schematisch dargestelltes Wachstum von Mikroorganismen.....	33
Abbildung 4.1: Schematische Abbildung des KLF Rührkesselreaktors.....	51
Abbildung 4.2: Agarosegelelektrophorese von Zn^{2+} hydrolysiertes ssDNA.....	64
Abbildung 5.1: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus Schüttelkolbenkultivierungen.....	72
Abbildung 5.2: Agarosegelelektrophorese der ssDNA hergestellt im Satzverfahren	73
Abbildung 5.3: Kultivierung von <i>E. coli</i> JM109 doppelt transformiert.....	74
Abbildung 5.4: Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> JM109 im Rührkesselreaktor.....	75
Abbildung 5.5: Agarosegelelektrophorese (AGEP) der ssDNA aus Zulaufkultivierung.....	76
Abbildung 5.6: Plasmidkarte des Helferplasmids mit sortiertem M13 Genom.	79

Abbildung 5.7: Plasmidkarte des Helferplasmids mit induzierbarem M13 Genom.....	80
Abbildung 5.8: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus Schüttelkolbenkultivierungen.....	81
Abbildung 5.9: Agarosegelelektrophoresen der ssDNA aus Satzprozessen.	82
Abbildung 6.1: Plasmidkarte von pCoIA.....	86
Abbildung 6.2: Analyse der Infektionsresistenz von <i>E. coli</i> JM109.....	88
Abbildung 6.3: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus Schüttelkolbenkultivierungen.....	89
Abbildung 6.4: Plasmidkarte des Helferplasmids pfhp 21.	92
Abbildung 6.5: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus Schüttelkolbenkultivierungen.....	93
Abbildung 6.6: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus Schüttelkolbenkultivierungen.....	94
Abbildung 6.7: Plasmidkarte des Helferplasmids pfhp24.	96
Abbildung 6.8: Plasmidkarte des Phagemids cp4(G3).....	97
Abbildung 6.9: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus Schüttelkolbenkultivierungen.....	98
Abbildung 6.10: Zulaufkultivierung im Rührkesselreaktor von <i>E. coli</i> NEB-turbo.....	100
Abbildung 6.11: Drei Zulaufkultivierungen im Rührkesselreaktor von <i>E. coli</i> NEB-turbo.	104
Abbildung 6.12: Agarosegelelektrophorese der cp4(G3) ssDNA.	105
Abbildung 6.13: Zulaufkultivierung von <i>E. coli</i> JM109 Wild Typ.	106
Abbildung 6.14: Plasmidkarte des Phagemids cp5(G3).....	110
Abbildung 6.15: Plasmidkarte des Helferplasmids pfhp30.	111
Abbildung 6.16: Zwei Hochzelldichtekultivierungen im Rührkesselreaktor bei 37°C.	112
Abbildung 6.17: Agarosegelelektrophoresen der ssDNA aus Schüttelkolbenkultivierungen	114
Abbildung 6.18: Zwei Hochzelldichtekultivierungen im Rührkesselreaktor bei 30°C.	116
Abbildung 6.19: Veränderung der dynamischen Viskosität über die Zulaufzeit.	116
Abbildung 6.20: Vergleich zweier Hochzelldichtekultivierungen von <i>E. coli</i> JM109.	117
Abbildung 6.21: AGEP der ssDNA aus Hochzelldichtekultivierungen.	118
Abbildung 6.22: Zwei Hochzelldichtekultivierungen im Rührkesselreaktor.	120
Abbildung 6.23: Plasmidkarte des Phagemids cp6(G3).....	123
Abbildung 6.24: Hochzelldichtekultivierung im Rührkesselreaktor.	124
Abbildung 6.25: Hochzelldichtekultivierung im Rührkesselreaktor (1000 Liter).	126
Abbildung 6.26: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus Pilotmaßstab.	128
Abbildung 6.27: Agarosegelelektrophorese der ssDNA aus Pilotmaßstab.	129
Abbildung 7.1: Biotechnologischer Herstellungsprozess für ssDNA.....	134
Abbildung 9.1: Schematische Darstellung der DNA Sequenzen für den Lambda-Schalter.	150
Abbildung 9.2: Plasmidkarte des Phagemids cp9(CRO).....	151
Abbildung 9.3: Plasmidkarte des Helferplasmids pfhp31.	152
Abbildung 9.4: Hochzelldichtekultivierung im Rührkesselreaktor von <i>E. coli</i> JM109.	153

9.5 Geräte

Tabelle 9.1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Analysenwaage	Ohaus GmbH	Explorer
Analysenwaage	Sartorius AG	Extend
Autoklav	H+P Labortechnik	Varioklav
Autoklav	H+P Labortechnik	Varioklav Zyklondampf
Autoklav	Systemec	5075 ELV
Bunsenbrenner	WLD-TEC	Fuego SCS
DC-Stromquelle	VWR	-
Eismaschine	Scotsman	AF80
Elektrophoresekammer	Thermo Fisher Scientific	OWL-Easycast B1
Elektroporator	Bio-Rad	Gene Pulser Xcell Microbial
Fluoreszenzphotokammer	Intas	-
Inkubator	Infors	Multitron Standard
Inkubator	witeg Labortechnik	WiseCube WIS-20
Kamera	Canon	EOS 70D
Laserscanner	GE-Healthcare	Typhoon 9500 FLA
Magnetrührgerät	Janke & Kunkel	IKA-COMBIMAG RET
Magnetrührgerät	Monotherm	Variomag Electronicrührer
pH-Elektrode	Mettler-Toledo	405-DPAS-SC-K8S/325
pH-Messgerät	METTLER TOLEDO	SevenMulti
pH-Messgerät	Schott	Lab 850
Photometer	Implen	NanoPhotometer N120
Photometer	Thermo Fisher Scientific	Genesys 10S UV-VIS
Pipette	BRAND GmbH	Transferpette S 10ml
Pipette	BRAND GmbH	Transferpette S 1000µl
Pipette	BRAND GmbH	Transferpette S 200µl
Pipette	BRAND GmbH	Transferpette S 20µl
pO ₂ -Elektrode	Mettler-Toledo	InPro 6800
Rührkesselreaktor	Bioengineering	W30522, Jahr 2013
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific	MSC Advantage
Sterilbank	Walder	SWB, Klasse 1

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Steuergerät	2mag	-
Vortex-Gerät	neoLab	7-2020
Vortex-Gerät	Scientific Industries	Vortex Genie 2
Waage	Ohaus GmbH	E1M213 SNR 1120081093
Wasserbad	Julabo	ME
Zentrifuge	Hettich Zentrifugen	Rotixa 50 RS
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Espresso

9.6 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Reinheit, %
Agar	AppliChem	-
Agarose NEEO Ultra	Roth	-
Ammoniak	Honeywell	25,0
Ammoniumsulfat	Roth	≥ 99,5
Antifoam 204	Sigma-Aldrich	-
Borsäure	Merck	≥ 99,8
Carbenicillin	Roth	≥ 88
Chloramphenicol	Roth	≥ 98,5
Citronensäure	AppliChem	≥ 99,5
Cobaltchlorid-Hexahydrat	Merck	≥ 99,0
di-Ammoniumhydrogenphosphat	Roth	≥ 97,0
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth	≥ 99,0
Eisen-(III)-citrat	Sigma-Aldrich	-
Ethanol	CLS	≥ 99
Ethanol	CLS	≥ 96
EDTA	Roth	≥ 99
Glucose-Monohydrat	Roth	≥ 99,5
Hefeextrakt	Deutsche Hefewerke	-
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	≥ 99,0
Kanamycinsulfat	Roth	≥ 750 I.U./mg
Kupferchlorid-Dihydrat	Merck	≥ 99,0

Chemikalie	Hersteller	Reinheit, %
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth	≥ 99,0
Manganchlorid-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich	≥ 99,0
Natiumdodecylsulfat (SDS)	Roth	-
Natrium EDTA	Merck	≥ 99,0
Natriumchlorid	Roth	≥ 99,5
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck	≥ 99,5
Pepton	Roth	-
Polyethylenglykol 8000	Roth	≥ 99,0
Pufferlösungen pH 4 und pH 7	Schott Instruments	pH ± 0,01
Thiamin-HCL	Roth	≥ 98,5
Thiamin-Hydrochlorid	AppliChem	≥ 99,0
Tris-Base	Roth	≥ 99,0
Tris-HCL	Roth	≥ 99,0
Zinkacetat-Dihydrat	Merck	≥ 99,5
