

Zürcher Hochschule  
für Angewandte Wissenschaften

**zh  
aw**

**Life Sciences und  
Facility Management**

ICBT Institut für  
Chemie und Biotechnologie

**Bachelorarbeiten  
2019**

**Biotechnologie**



Selbständiges Arbeiten, Kreativität, Teamfähigkeit, Kommunikation und ganzheitliches Denken sind gefragt.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b>	<b>5</b>		
<b>Die Diplomandinnen und Diplomanden</b>			
Blättler Maria Fernanda	6	Mitreska Veronika	38
Bolt Valentin	7	Müller Ramona	39
Borner Oriana	8	Nägeli Daniel	40
Braun Tobias	9	Räth Joel	41
Coppo Simone	10	Rosenberger Robin	42
De Simoni Mario	11	Rossi Lia	43
Eggler Viviane	12	Sabani Besmira	44
Eichenberger Andrea	13	Scherbel Anna	45
Flückiger Simon	14	Schneider Samuel	46
Frei Andrina	15	Steiner Sandra	47
Frei Yannick	16	Stocker Joel	48
Furrer Rafael	17	Strang Jaan	49
Fürrutter Nils	18	Sulja Arburon	50
Graf Matthias	19	Tasselli Livio	51
Hänni Mona Andrea Iris	20	Tharmakulasingham Tharsika	52
Hartmann Miriam	21	Tharmalingam Laavanneya	53
Hartmann Raphael	22	Tophinke Alissa Helena	54
Herzog Christoph	23	Türkcan Deniz	55
Hofland Bram	24	Urech Selina	56
Hubmann Dario	25	Waltenspül Letizia	57
Kanagarajah Ravena	26	Wechsler Martina	58
Kerhanaj Fllanza	27	Willi Romina	59
König Livio	28	Wüthrich Thierry	60
Kritzer Bettina	29	Zanga Alina	61
Kunjappu Maria	30	Zihlmann Carla	62
Kuruparan Keerthanah	31		
Lustenberger Kevin	32	<b>Institut für Chemie und Biotechnologie</b>	<b>65</b>
Manjaly Sivitha	33	<b>Perspektiven</b>	<b>66</b>
Markovic Nikola	34	<b>Porträt Masterabsolventin</b>	<b>69</b>
Mathis Simon	35	<b>Internationaler Austausch</b>	<b>70</b>
Maurhofer Patrick	36	<b>Forschungsprojekt: Exosomen – die Cargo-Transporter des Körpers</b>	<b>72</b>
Memeti Nurdzane	37	<b>ALUMNI ZHAW</b>	<b>74</b>
		<b>ZHAW LSFM</b>	<b>75</b>



Die Absolventinnen und Absolventen des Bachelorjahrgangs BT16

# Vorwort

Wädenswil, Oktober 2019

## Liebe Absolventinnen und Absolventen des BT16

Unseren «Herzlichsten Glückwunsch» zum soeben erhaltenen Diplom als «Bachelor of Sciences ZFH in Biotechnologie», dass Sie sich nach Ihrer 3-jährigen Ausbildungszeit redlich verdient haben.

Sie alle haben sich mit Elan 2016 für den Einstieg ins Biotechnologiestudium entschieden. Diese Energie haben Sie während der vergangenen Jahre als Klasse beibehalten. Sie haben sich engagiert dazu biotechnologisches Fachwissen angeeignet.

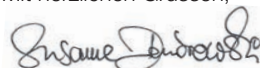
Weitblick, Innovationsfreude und professionelle Gelassenheit stellte Ihr Klassen-Motto dar. Die neue Idee, aus dem Studiengang einen «Ambassador» zu entsenden, um Studieninteressierten einen realistischen Eindruck des Studienalltags zu vermitteln, wurde von Ihnen unterstützt; ebenso haben Sie sich mit dem Blick «über den Tellerrand» dafür eingesetzt, dass der Studiengang im neuen Studierendenparlament vertreten war. Professionelle Gelassenheit und Weitsichtigkeit haben wir erfreut bei Ihnen festgestellt, als es um Veränderungen im Curriculum ging, die sich konkret im Ablauf Ihrer Bachelorarbeit geäussert haben.

Ausbildung äussert sich nicht nur in der Ansammlung von Fachwissen, sondern vielmehr durch das Erlangen von übergeordneten Perspektiven, wie schon ein kluger Schweizer vor Ihnen anmerkte:

«Education is not the learning of facts, but the TRAINING of the mind to THINK.»  
(Albert Einstein, 1879–1955)

Für Ihre Zukunftsgestaltung wünschen wir Ihnen alles Gute und viel Erfolg. Bewahren Sie sich Ihre grosse Portion Weitblick, genügend Innovationskraft und Ideen, um Letztere clever umzusetzen.

Mit herzlichen Grüssen,



Susanne Dombrowski  
Leiterin Studiengang Biotechnologie

# ***Aristotelia chilensis*: establishment and characterization of callus suspension cultures, their secondary metabolites and antiplatelet activity (confidential)**



Diplomandin	Maria Fernanda Blättler
Korrektor/-in ZHAW	Dr. Evelyn Wolfram, BSc Oliver Oros
Korrektorin extern	Prof. Dr. Hermine Vogel, Universidad de Talca, Chile

The popularity of the Chilean shrub *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz commonly known as «maqui» rose over the last years due to the reported antioxidant properties of its berries, which contain high amounts of polyphenols. The industry's growing demand for the fruit threatened its occurrence in the wild, leading to domestication efforts by the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Talca, Chile. These efforts resulted in the isolation and propagation of the clones «Luna Nueva», «Morena» and «Perla Negra» that proved to have berries with high polyphenol content. An alternative way to produce plant secondary metabolites is the biotechnological manufacturing of plant cell suspension cultures. This has the advantage that, maqui cells can be cultivated under controlled conditions independent of seasonal fluctuations, pest and diseases. In this bachelor's thesis, several plant cell suspension cultures of the «Luna

Nueva» clone were cultivated in Erlenmeyer flasks between 23 and 36 days under different conditions such as with or without baffles and with or without light irradiation (Fig. 1). To characterize the cultures, several parameters were measured such as the appearance, vitality, packed cell volume (PCV), cell dry weight (CDW), cell fresh weight (CFW), electrical conductivity and pH. In addition, culture samples were extracted with acidified methanol for the quantification of anthocyanins as well as for the measurement of their human antiplatelet effects with the turbidimetric method of Born and Cross (1962) (Fig. 2). These results are relevant for the establishment of a future high-yielding maqui cell line capable of producing the highly desired secondary metabolites *in vitro* for commercial purposes. Due to confidentiality reasons, details concerning the results are not published in this abstract.

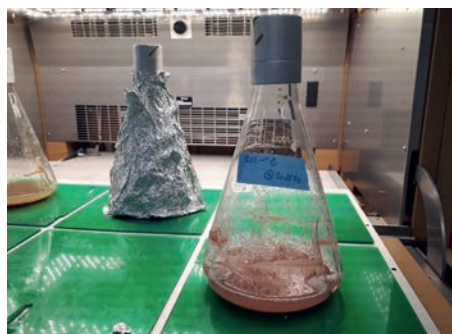


Fig. 1: The experiments were carried out in Erlenmeyer flasks under different cultivation conditions.

Fig. 2: Antiplatelet activity measurement with the Aggro-Meter.

# Zein – Ein Nanocarriersystem mit hohem Potential für pharmazeutische Anwendungen



Diplomand	Valentin Bolt
Korrektor/-in ZHAW	Dr. Andrea Baier, BSc Jannik Saladin

Das Interesse an der Nanotechnologie nimmt in der pharmazeutischen Industrie exponentiell zu. Die Verabreichung von Wirkstoffen in nanoskalierten Systemen bietet viele Vorteile gegenüber herkömmlichen Arzneiformen, wie die Erhöhung der Bioverfügbarkeit von wasserunlöslichen Wirkstoffen, das Einwirken der Wirkstoffe direkt am Zielgewebe oder die kontrollierbare Wirkstofffreisetzung. Da die Nanocarriersysteme sich untereinander stark unterscheiden, ist deren Charakterisierung zwingend notwendig.

Nanopartikel wie Mizellen besitzen aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften ein besonders grosses Potential, um hydrophobe Wirkstoffe mit einer erhöhten Effizienz auf den menschlichen Körper einwirken zu lassen. Im Rahmen der Bachelorarbeit wurden, durch eine Copolymerisation von Zein und Methoxy-Poly(ethylenglykol) (mPEG), Mizellen hergestellt und mit Cannabidiol, Curcumin beziehungsweise Fluorescein beladen. Anschliessend wurden die Zein-mPEG-Mizellen auf ihre Partikelgrössenverteilung, ihre Oberflächencharakteristika, ihr Zeta-Potential, ihre Wirkstoffbeladungs- und auf ihre Wirkstofffreisetzungseffizienz überprüft.

Anhand der erhaltenen Resultate konnten einige Aussagen bezüglich der Eigenschaften der Zein-mPEG-Mizellen getroffen werden. Die Zein-mPEG-Mizellen besaßen Partikelgrössen von 75–150 nm und hatten eine kugelförmige Form. Die Messungen der Zeta-Potentiale ergaben Werte von -13.8–7.47 mV. Bei der

Beladung der Mizellen mit den jeweiligen Wirkstoffen wurden in den Zein-mPEG-Mizellen Wirkstoff-Wiederfindungsraten von 125.96 % für CBD und 74.25 % für Curcumin berechnet. Mit einer weiteren Methode wurde die Wirkstofffreisetzung bestimmt, wobei Werte von  $78.95 \pm 14.04$  % für die CBD- beziehungsweise  $52.44 \pm 5.90$  % für die Curcumin-beladenen Zein-mPEG-Mizellen ermittelt wurden. Die erhaltenen Resultate wurden diskutiert und weiterführende Analysen beschrieben. Neben dem Optimieren der angewandten Methoden wäre es in einem nächsten Schritt beispielsweise sinnvoll, die Zytotoxizität der Zein-mPEG-Mizellen zu untersuchen. Um diesen Versuch zu starten, muss zuvor jedoch noch eine Sterilisierungsstrategie entwickelt werden.

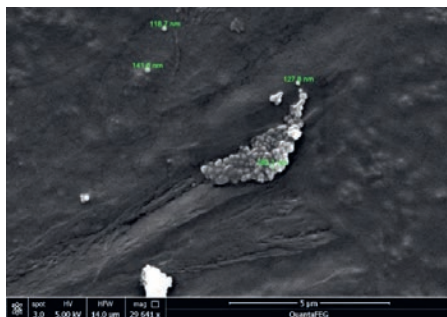


Abb. 1: **Untersuch der Zein-mPEG-Mizellen auf deren morphologische Eigenschaften.**

Die Zein-mPEG-Mizellen besitzen im getrockneten Zustand starke Agglomerationskräfte. Auch einzelne Zein-mPEG-Mizellen sind detektierbar. Die Mizellen besitzen eine Grösse zwischen 110 nm und 170 nm. Gut ersichtlich ist, dass die Zein-mPEG-Mizellen eine kugelförmige Struktur besitzen.

# Analytik von Leachables und Extractables (vertraulich)



<b>Diplomandin</b>	Oriana Borner
<b>Korrektor/-in ZHAW</b>	Prof. Dr. Caspar Demuth, Dr. Susanne Kern
<b>Korrektor extern</b>	Dr. rer. nat. Rudolf Köhling, Merck Group, Sigma-Aldrich Production GmbH

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Merck, ehemalig Sigma-Aldrich Production GmbH, durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Extractables und Leachables (E&L) sind in der Pharmabranche ein grosses Thema, da es sich bei diesen Substanzen häufig um schädliche Chemikalien/Verunreinigungen aus Primärverpackungen handelt, die in pharmazeutische Produkte übergehen und die Sicherheit von Patienten gefährden können. Trotz Zunahme der regulatorischen Richtlinien für die Anwendung, Durchführung sowie der Berichterstattung von solchen Studien stellt sich die Analyse dieser Substanzen noch immer als schwierig dar. Zum einen ist mit einer grossen Vielfalt an möglichen E&L-Substanzen zu rechnen, zum anderen sind die Konzentrationen gering. Ziel dieser Bachelorarbeit war die Prüfung der Eignung von zwei neu zusammengestellten Referenzmaterialien von Merck im Bereich E&L in Pharma- und Lebensmittelanwendungen. Hierfür wurden eine pharmazeutische und drei lebensmitteltechnische Kunststoffverpackungen extrahiert und mit GC/MS und LC/MS auf Extractables untersucht. Die Referenzmaterialien halfen dabei, die Messmethoden für GC/MS und LC/MS zu entwickeln und zu validieren. Im Bereich pharmazeutische Verpackungen wurde ein Sal-

bentiegel aus Polypropylen mit verschiedenen Extraktionsmethoden auf Extractables untersucht. Eine geeignete Extraktionsmethode wurde dann auf Lebensmittelverpackungen, eine Milchflasche aus Polycarbonat und zwei Joghurtbecher aus Polyethylenterephthalat und Polystyrol, angewandt und die Extrakte mittels GC/MS und LC/MS analysiert. Es zeigte sich, dass die beiden Referenzmaterialien sich für die Identifizierung von E&L im Pharmabereich gut eignen und einige Extractables in der Salbentiegel-Verpackung gefunden und halbquantitativ bestimmt werden konnten. In den untersuchten Lebensmittelverpackungen wurden einige Substanzen identifiziert oder postuliert, welche nicht in den Referenzmaterialien enthalten waren, aber für weitere E&L-Studien wichtig sein können. Zudem sind Leachables ein grosses Thema, zu deren Untersuchung aufwändigere Langzeitstudien und Spurenanalytik mit Hilfe des Referenzmaterials gemacht werden sollten.

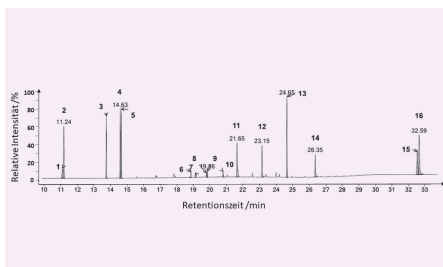


Abb. 1: GC/MS-Chromatogramm von Referenzmaterial mit E&L-Substanzen.



# Bestimmung von physikochemischen Parametern von Wirkstoffkandidaten: Methodenentwicklung und Validierung (vertraulich)



Diplomand	Tobias Braun
Korrektor ZHAW	Prof. Dr. Caspar Demuth
Korrektor extern	Dr. Reto Näf, Topadur Pharma AG

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Topadur Pharma AG durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Die Entwicklung von neuen Wirkstoffen und deren Zulassung ist ein sehr komplexer Prozess. Um die Erfolgchancen von Wirkstoffkandidaten zu erhöhen, müssen diese möglichst frühzeitig und gezielt anhand physikochemischer Eigenschaften und experimentell bestimmter bzw. berechneter Parameter kategorisiert und selektioniert werden. Diese können unter anderem aus *in silico*, zellulären und enzymatischen Methoden stammen. Das pharmazeutische Start-up Topadur Pharma AG in Schlieren entwickelt unter anderem Wirkstoffe, welche zur Heilung chronischer Wunden beitragen. Diese Arbeit unterstützte die Selektion von möglichen Wirkstoffkandidaten des Unternehmens, indem Methoden zur Bestimmung von relevanten physikochemischen Parametern entwickelt wurden. Dazu zählen der Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient ( $\log P$ ), die topologische polare Oberfläche eines Moleküls (TPSA) und die Plasmaproteinbindung (PPB). Im Verlauf dieser Abschlussarbeit wurde eine HPLC-Methode für die Bestimmung von  $\log P$  entwickelt, anschliessend anhand von Referenzsubstanzen mit bereits bekannten physikochemischen Parametern validiert und

für das Drug Screening möglicher Wirkstoffkandidaten eingesetzt. Sowohl die TPSA als auch die kalkulierten  $\log P$ -Werte wiesen eine Korrelation zu den durch die HPLC-Methode experimentell ermittelten Verteilungskoeffizienten  $\log P$  auf. Der Abgleich mit den Daten zur Plasmaprotein-Bindung konnte die anhand der  $\log P$ -Werte gemachten Vorhersage zur Lipophilie der Wirkstoffe bestätigen. Zusammenfassend wurde im Verlauf dieser Abschlussarbeit der Einfluss der chemischen Struktur und deren spezifischen Substituenten auf die physikochemischen Parameter von Wirkstoffgruppen untersucht und ermittelt. Die entwickelten und validierten *in vitro*- und *in silico*-Methoden ermöglichten die Kategorisierung und anschliessende Selektion von möglichen Wirkstoffkandidaten (siehe Abb. 1).

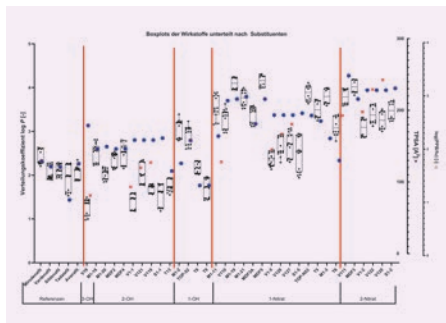
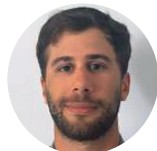


Abb. 1: Kastendiagramm der  $\log P$ -Daten im Vergleich zur TPSA und PPB.

# Nachweis und Erzielen einer Punktmutation in einem bestimmten Genabschnitt zur Bestimmung einer Wirkstoffbindungsstelle



<b>Diplomand</b>	Simone Coppo
<b>Korrektor ZHAW</b>	Prof. Dr. Martin Sievers
<b>Korrektor extern</b>	Dr. Valentino Cattori, Inthera Bioscience AG

Im klinischen Bereich ist Krebs eine der Hauptursachen für den Tod. Statistiken zeigen, dass der Trend zu Krebs im Laufe der Jahre zunimmt, im Jahr 2018 wurde bei 18,6 Millionen Menschen Krebs diagnostiziert. Krebs ist damit die zweithäufigste Todesursache der Welt. Durch die Entwicklung von Molekülen wie Oxopiperazin-Helix-Mimetika (OHM) kann die Interaktion zwischen bestimmten Proteinen gestört werden, was einen wesentlichen Einfluss auf die Tumorentwicklung hat. Die OHMs sind «*nonpeptidic*»-Moleküle, die als nanomolare Liganden für bestimmte Domäne eines Proteins wirken. Der Prozess der Entwicklung eines Medikaments ist essentiell, um seine Wirksamkeit und Sicherheit zu gewährleisten. Diese werden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* definiert, bevor die klinischen Studien durchgeführt werden können. Um die Wirksamkeit des Medikaments *in vitro* analysieren zu können, wurde das System CRISPR/Cas9 verwendet. Damit wurde eine DNA-Sequenz verändert, die für eine Region eines Proteins kodiert. Dies wurde durchgeführt, um die Wirksamkeit des Medikaments *in vitro* indirekt zu bestimmen. Das CRISPR-System (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) ist ein adaptives Immunsystem, welches in einigen Arten der Bakterien- und Archea-Domäne vorkommt. Eine vereinfachte Version dieses Systems (CRISPR/Cas9) wurde angewendet, um ein sehr leistungsfähiges und präzises Werkzeug für die genetische Veränderung zu bieten, welches viel einfacher

zu bedienen und gleichzeitig wirtschaftlicher ist als bestehende Technologien. Das Enzym Cas9 hat zwei verschiedene Zustände, einer ist, wenn die gRNA nicht vorhanden ist, und der andere, wenn die gRNA sich innerhalb des Enzyms befindet. In Abwesenheit der gRNA ist das Enzym völlig inaktiv. Stattdessen bewirkt das Vorhandensein der gRNA die Veränderung der Konformation des Enzyms und macht es somit aktiv. Sobald das Enzym aktiv ist, ist es in der Lage, die Aktivität der Spaltung einer spezifischen DNA-Sequenz durchzuführen, die durch die Komplementarität der gRNA- und PAM-Sequenz erkannt wird.

# Expression, Aufreinigung und Charakterisierung einer neuartigen N-Glykanase (vertraulich)



<b>Diplomand</b>	Mario De Simoni
<b>Korrektorin ZHAW</b>	Dr. Sabina Gerber
<b>Korrektorin extern</b>	Dr. Paula Carranza

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Die N-Glykosylierung ist eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen in eukaryotischen Proteinen, welche Expression, Faltung und Lokalisierung sowie Stabilität, molekulare Interaktionen und Signalübermittlung im Organismus moduliert. Die Glykane können enzymatisch vom Protein getrennt und nachfolgend auf ihre Zusammensetzung und Struktur geprüft werden. Pflanzliche Glykoproteine tragen oft eine Kern  $\alpha$ -1,3-verknüpfte Fukose, welche eine enzymatische Hydrolyse der N-Glykane durch kommerziell erhältliche Enzyme vom intakten Protein verhindert. Eine N-Glykanase mit der enzymatischen Funktionalität zur Abspaltung von Kern  $\alpha$ -1,3-fukosylierten Glykanen von intakten Glykoproteinen wurde in dieser Bachelorarbeit hergestellt und auf ihre Aktivität hin untersucht. Mehrere Varianten des Enzyms wurden in *E. coli* rekombinant hergestellt und mittels Affinitätschromatographie und Grössenaus-

schlusschromatographie bis zu hoher Reinheit aufgereinigt. Die Varianten wurden bioanalytisch charakterisiert (Abb. 1) und die Aktivitäten wurden durch eine Deglykosylierung von HRP mittels Gelelektrophoresen (Abb. 2) und Glykoprotein-Färbung (Abb. 3) erfolgreich nachgewiesen. Nach Methodenoptimierung konnten weitere Zielproteine deglykosyliert werden. Die Aktivitätsprofile und Stabilitäten der Varianten wurden in Bezug auf pH- und Temperaturoptima, Konzentrationen und Reaktionszusätze umfassend charakterisiert.

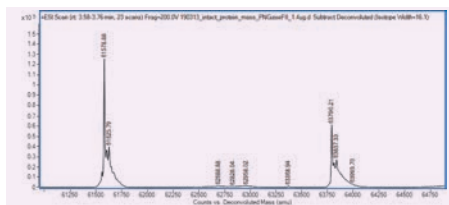


Abb. 1: Massenspektrum einer N-Glykanase-Variante.

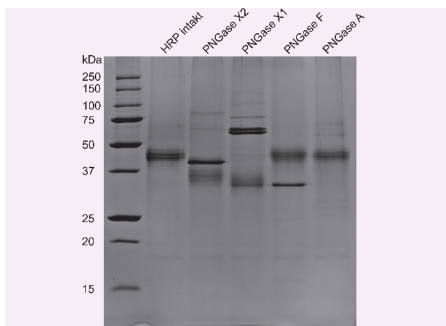


Abb. 2: Gelelektrophoretischer Nachweis der Deglykosylierung.

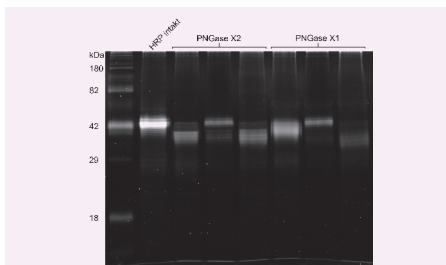


Abb. 3: Glykanfärbung der HRP vor und nach Deglykosylierung.

# Testing two different resazurin reagents for their proliferative and cytotoxic effect on different cell lines



<b>Diplomandin</b>	Viviane Egger
<b>Korrektor/-in ZHAW</b>	Prof. Dr. Jack Rohrer, Dipl. Ing. (FH) Bettina Keller Abu Seda

Resazurin reduction test is a very suitable tool to measure cytotoxic effects and cell proliferation. It has been used since the late 1920s, first to monitor bacterial contamination of milk and yeast. Nonfluorescent, blue resazurin is irreversibly reduced to fluorescent and pink resorufin. In this reduction respiratory chain in the inner membrane of the mitochondrion is involved. It can be further reduced reversibly to hydroresorufin, which is colourless and nonfluorescent. It is a nontoxic and sensitive assay. As few as 80 cells give a reproducible signal. Endpoint and kinetic readings are possible.

Since 1993, Alamar Blue has the leading role on the market. However, assay can be performed with pure resazurin too. Resazurin sodium salt is a much cheaper and easy alternative but to get comparable results with reductions generated with Alamar Blue same concentration of resazurin must be used. The initial aim of this thesis is to test resazurin

sodium salt against commercial Alamar Blue. An assay is established to find resazurin concentration which has the same reduction as Alamar Blue. An additional aim is to measure cytotoxicity of Alamar Blue on mesenchymal stem cells.

Quantitative measurements are performed, which included multiple determination by performing assay on different days, multiple wells with same concentrations, different cell concentrations per well and a detailed statistical analysis. It was not possible to detect exact resazurin concentration but resazurin concentration is clearly limited to a range of 350–525  $\mu\text{M}$ . As a side trial it was detected that long storage time at different temperatures of produced resazurin solutions did not affect quality of these solutions. Furthermore, no cytotoxic effect of Alamar Blue on mesenchymal stem cells was observed. Resazurin sodium salt can be a cheaper alternative to the more expensive Alamar Blue dye.

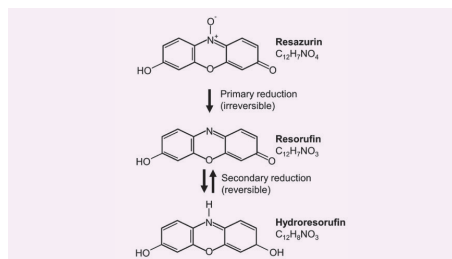


Fig. 1: Reduction of resazurin to resorufin and hydro-resorufin. In primary reduction resazurin is irreversibly reduced. In secondary reduction resorufin can be further reversibly reduced to hydroresorufin.

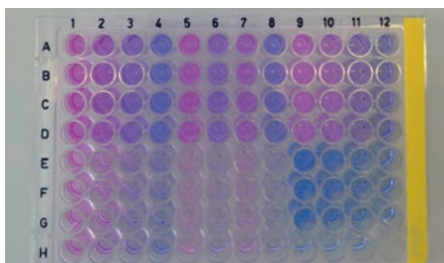


Fig. 2: Example of a resazurin assay. After adding resazurin reagent to seeded cells, reduction takes place during 4 h incubation. Amount of reduction is visible through colour transformation from blue to pink.

# Pflanzenzellkulturbasierte Kakaobutter für Zellkulturschokolade (vertraulich)



<b>Diplomandin</b>	Andrea Eichenberger
<b>Korrektoren/-in ZHAW</b>	Prof. Dr. Regine Eibl-Schindler, MSc Philipp Meier, BSc Raphael Gnehm

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit werden keine Details zur Arbeit veröffentlicht.



Abb. 1: *Theobroma cacao*-Kalluskultur.

# Bioprocess development and optimization for the medium-scale production of a live attenuated bacterial vaccine against *Campylobacter jejuni* (vertraulich)



Diplomand	Simon Flückiger
Korrektor ZHAW	Dr. Lukas Neutsch
Korrektorin extern	Dr. Christine Neupert, Malcisbo AG

In den letzten Jahren wurde *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) zu einer der führenden Ursachen für bakterielle Gastroenteritis. Kontaminiertes Hühnerfleisch als Hauptinfektionsquelle für Menschen kann derzeit nur mit Antibiotika behandelt werden. Durch immer häufiger auftretende Antibiotikaresistenzen gewinnt die Impfstoffentwicklung zunehmend an Bedeutung.

Die Malcisbo AG arbeitet daran, einen effizienten, kostengünstigen Impfstoff gegen *C. jejuni* in Hühnern zu entwickeln. Hierfür wurde das Bakterium *Salmonella typhimurium* (Impfbakterium) genetisch so modifiziert, dass es auf seiner Zelloberfläche einen *C. jejuni*-spezifischen Zucker präsentiert. Wenn dieser spezielle Zucker dem Hühnerimmunsystem präsentiert wird, wird eine Immunreaktion aufgebaut, die dazu führt, dass *C. jejuni* in den Hühnern erkannt und bekämpft wird. Das Infektionsrisiko über kontaminiertes Hühnerfleisch für den Menschen nimmt ab oder schwindet komplett.

Diese Bachelorarbeit hatte zum Ziel, das Impfbakterium von der Produktion im Labormassstab auf das Niveau der industriellen Herstellung mit Bioreaktoren anzuheben. Erste entscheidende Schritte waren eine Umstellung auf chemisch definierte Medien sowie die Entwicklung einer Kultivierungsstrategie nach Batch-Verfahren. Hergestellte Biomasse sowie die Menge der auf der Impfstammoberfläche präsentierten *C. jejuni*-spezifischen Zucker waren wichtige Zielparame-  
ter. Es

konnte der Einfluss verschiedener C-Quellen auf die Präsentation des *C. jejuni*-spezifischen Antigens abgeklärt werden und eine Analysemethode für die Bestimmung der entsprechenden Zucker auf der Oberfläche des Impfstammes etabliert werden. Diese Methoden können zukünftig für qualitative Kontrollen des Impfstammes während der Produktion genutzt werden.



Abb. 1: Kultivierung des Lebendimpfstoffes gegen *Campylobacter jejuni* in einem Benchtop-Bioreaktorsystem.

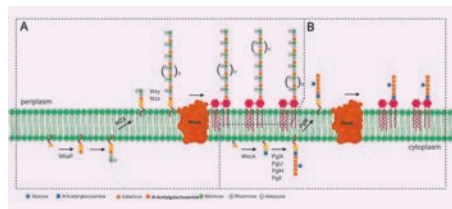


Abb. 2: Manipulation der Zuckerbiosynthese in *Salmonella typhimurium* zur Herstellung eines Impfbakteriums gegen *Campylobacter jejuni* (Durchfallerreger im Mensch).

# Beschichtung von Silikonbrustimplantaten mit bioaktivem Glas (vertraulich)



<b>Diplomandin</b>	Andrina Frei
<b>Korrektor/-in ZHAW</b>	Dr. Steffi Lehmann, Dr. Dominik Brühwiler
<b>Korrektor extern</b>	Dr. med. Roger Gmür, Klinik Tiefenbrunnen

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Brustvergrößerungen und Brustrekonstruktionen mit Implantaten auf Silikonbasis sind die am häufigsten eingesetzten Verfahren in der plastischen Chirurgie. Dabei tritt bei 9–10 % der Empfänger die Komplikation der sogenannten Kapselfibrose auf, die Ausbildung einer schmerzhaften Bindegewebskapsel rund um die Implantate. Sie entwickelt sich aufgrund einer übermässigen Fremdkörperreaktion, welche mit einer chronischen Entzündung einhergeht. Man geht davon aus, dass diese Entzündung durch die Bildung eines bakteriellen Biofilms, welcher sich auf der Implantatoberfläche bildet, entsteht. Neuste Bestrebungen in der Forschung versuchen deshalb zu verhindern, dass nach einer subklinischen Kontamination die Einnistung von Bakterien stattfindet. Bioaktives Glas ist aufgrund seiner antimikrobiellen Wirkung eine Möglichkeit, die Ausbildung eines solchen Biofilms zu verhindern. Steht es in Kontakt mit Körperflüssigkeiten, kann bioaktives Glas zudem biochemische Reaktionen hervorrufen, die für eine Gewebsregeneration relevant sind. Das Ziel dieser Bachelorarbeit war es deshalb, zu untersuchen, wie sich die Beschichtung von Silikonimplantaten mit bioaktivem Glas auf das Zellwachstum auf der Implantatober-

fläche sowie die Ausbildung eines Biofilms auswirkt.

Zuerst wurde eine Technik für die Herstellung von mit bioaktivem Glas beschichteten Silikonimplantaten etabliert, die eine möglichst gleichförmige und gut reproduzierbare Beschichtung ermöglicht. In der zweiten Phase der Arbeit wurde die biologische Wirkung des bioaktiven Glases mittels Zell-Experimenten untersucht, wobei einerseits das Wachstum, die Vitalität und eine Entzündungsreaktion von Bindegewebs- und Immun-Zellen getestet und andererseits die Ausbildung eines Biofilms auf den beschichteten Implantaten untersucht wurden. Die erzielten Resultate zeigen, dass das bioaktive Glas keinen Einfluss auf das Zellwachstum und die Vitalität von Zellen hat. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass bioaktives Glas in der Tat das Bakterienwachstum hemmt.

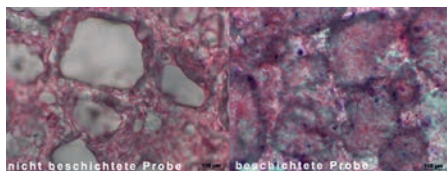


Abb. 1: Wachstum von Maus-Fibroblasten-Zellen auf mit bioaktivem Glas beschichteten Implantatproben. Die Implantate weisen eine texturierte Oberfläche auf. Es kann erkannt werden, dass die beschichteten Proben nach 48 h Wachstum auch über der Textur Zellen aufweist.

# Dynamische Prozessführungsstrategien zur Herstellung von therapeutisch und präventiv einsetzbarer Phagen (vertraulich)



Diplomand	Yannick Frei
Korrektoren ZHAW	Dr. Lukas Neutsch, Prof. Dr. Lars Fieseler

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit werden keine Details zur Arbeit veröffentlicht.

Durch die unbedachte Abgabe von Antibiotika, Selbstmedikation und unabgeschlossene Behandlungen, entwickeln immer mehr Bakterien-Resistenzen. Bereits heute sind Bakterienstämme zu finden, die gegen jegliche konventionellen Antibiotika resistent sind. Durch diesen Umstand rücken Therapien mit Bakteriophagen zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien befallen und abtöten, wobei sie eine hohe Spezifität aufweisen. Das menschliche Mikrobiom wird so nicht beeinträchtigt. Somit könnten Phagentherapien eine effiziente und schonende Alternative zu Antibiotikabehandlungen darstellen. Um

die erhöhte Nachfrage nach Bakteriophagen zu befriedigen, müssen jedoch Verfahren für eine grosstechnische Produktion entwickelt werden.

In dieser Arbeit wurden Versuche in Erlenmeyerkolben mit verschiedenen Infektionszeitpunkten und Infektionsraten durchgeführt, wobei das Wachstum der Kulturen in Echtzeit durch spezielle Sensoren erfasst wurde. Die Kultivierungsversuche wurden von Analysen begleitet, die der Etablierung von verbesserten Methoden zur Bestimmung kritischer Qualitätsparameter (z. B. Phagentiter) dienen. Die optimalen Bedingungen für eine Phagenproduktion im Reaktormassstab können so effizient ermittelt werden und Patienten in Zukunft mit Präparaten in GMP-Qualität versorgt werden.

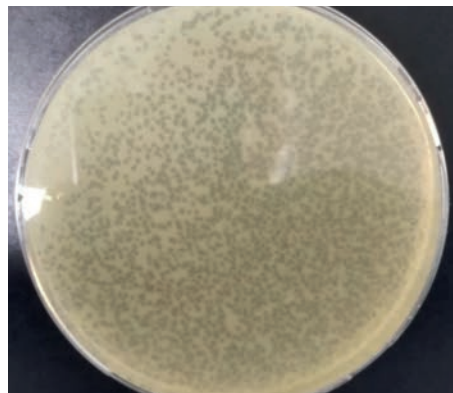
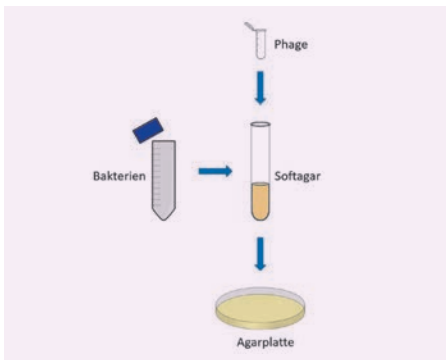


Abb. 1: Schematischer Ablauf für die Bestimmung des Phagentiters durch den Plaque Assay.

Abb. 2: Semikonfluente Platte für die Phagenpropagation.



# Biologische Methanisierung (vertraulich)



<b>Diplomand</b>	Rafael Furrer
<b>Korrektorinnen ZHAW</b>	Dr. Judith Krautwald, MSc Lona Moosberger

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit werden keine Details zur Arbeit veröffentlicht.

# Charakterisierung und Strukturanalyse einer optimierten Halogenase (vertraulich)



Diplomand	Nils Furrutter
Korrektor/-in ZHAW	Prof. Dr. Rebecca Buller, Dr. Lukas Neutsch

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit werden keine Details zur Arbeit veröffentlicht.

Enzyme, die Katalysatoren der Natur, ermöglichen es, chemische Reaktionen regio- und enantiospezifisch sowie nachhaltig durchzuführen und bieten so eine attraktive Alternative zu klassischen chemischen Methoden. Die in dieser Arbeit untersuchte Enzymfamilie der Fe(II)/ $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängigen Halogenasen katalysiert die Aktivierung von C-H-Bindungen und ist so in der Lage, kleine Moleküle zu halogenieren. Halogenierungen spielen vor allem in der pharmazeutischen Industrie und in der Agrochemie eine bedeutende Rolle.

In einer vorhergehenden Forschungsarbeit wurde die Halogenase WelO5\* mittels gezielter Mutagenese auf erhöhte Aktivität und Spezifität gegenüber einem nicht natürlichen Substrat optimiert. Dabei wurden Varianten entwickelt, die das gewählte Substrat an unterschiedlichen Positionen enantiospezifisch halogenieren können.

Ziel dieser Bachelorarbeit war es, eine Strukturanalyse des Wildtyps-Enzyms WelO5\* sowie von evolvierten Varianten durchzuführen und auf diese Weise strukturelle Merkmale, die für die erhöhte Aktivität und Selektivität verantwortlich sind, zu untersuchen. Das native WelO5\* sowie eine evolvierte Variante wurden im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) exprimiert, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschliessend erfolgreich durch die «hanging drop vapour diffusion»-Methode kristallisiert. Während der Laufzeit dieser Bachelorarbeit konnte die Struktur des nativen Enzyms gelöst werden. Es zeigte sich, dass sich WelO5\* von seinem literaturbekannten Homolog WelO5 (PDB ID: 5IQS) in der Anordnung einer  $\alpha$ -Helix unterscheidet (Abb. 1). Diese alternative Anordnung ist wahrscheinlich die Basis der unterschiedlichen Substratazeptanz: Während WelO5\* das nicht-native Substrat akzeptiert, konnte beim Enzym WelO5 keine Aktivität beobachtet werden. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass das nicht-native Substrat sehr genau in die aktive Tasche des Enzyms dockt (Abb. 2).

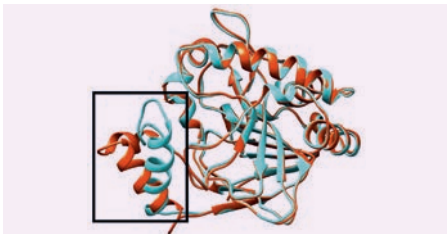


Abb. 1: Strukturvergleich zwischen WelO5 (orange) und WelO5\* (Cyan).

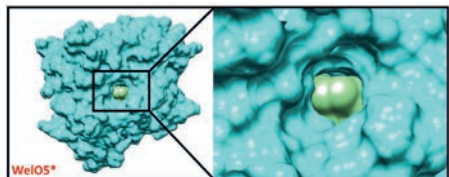


Abb. 2: Darstellung der Proteinoberfläche von WelO5\* (Cyan) mit dem gedockten nicht-nativen Substrat (grün).

# *Xylopi*a *aromatica* leaves as potential treatment of breast adenocarcinoma and glioblastomax (confidential)



Diplomand	Matthias Graf
Korrektorin ZHAW	Dr. Evelyn Wolfram
Korrektorin extern	Prof. Dr. Rosy Ribeiro, Universidade Federal de São João del-Rei, Brasilien

Breast cancer is one of the most frequent forms of cancer. Treatments of cancer are often very invasive and lower life quality. This Bachelor thesis focuses on the cancer inhibitory effects of leaves from the south American tree *Xylopi*a *aromatica* (Lam.) Mart. Crude extract was received by extracting the leaves by using a Soxhlet apparatus and a solvent of 70 % ethanol, and evaporation and lyophilization. Total phenolic content calculated as gallic acid, the flavonoid content calculated as rutin and a TLC with NP/PEG and Dragen-dorff was performed in a first step. In a second part, using the cell lines MDA-MB-231 (Breast cancer), 4T1 (Breast cancer) and U-251 (Brain cancer) MTT assays, zymographs and modified HET CAM assays were applied. The MTT showed no remarkable inhibitory effects of crude extracts on 4T1 and U-251. Zymograms showed an inhibitory effect of crude extract on MMP 2 and MMP 9 at a concentration of 20 µg/ml and above. MMP 2 was



Fig. 1: *Xylopi*a *aromatica* (The Encyclopedia of Life ©Andres Hernandez).

more inhibited by the extract than MMP 9. An anti-angiogenetic effect of crude extract was observed in the HET CAM assay using the cell line U-251. Another HET CAM showed that natural blood vessel growth was not clearly inhibited by crude extract of *Xylopi*a *aromatica* leaves. The Bachelor Thesis delivered valuable results for future studies in collaboration between the two Universities.

Further details of this work cannot be published for confidentiality reasons.



Fig. 2: HET CAM with U-251 cells ex ovo. Control and 95 µg/ml crude extract after 3 days.



Fig. 3: Writer with advisers, from the left: Prof Chagas, M. Graf, Dr. Wolfram, Prof. Ribeiro.

# Entwicklung von Methoden für die Bestimmung von Orangenblüten



Diplomandin	Mona Andrea Iris Hänni
Korrektor/-in ZHAW	Dr. Evelyn Wolfram, Dipl. Chemiker (FH) Samuel Peter

Ziel der Arbeit war es, für die Europäische Pharmakopöe (Ph. Eur.) eine Identitätsprüfung mittels HPTLC sowie eine Gehaltsbestimmungsmethode mittels UPLC für Bitter- (*Aurantii amari flos*) und Süssorangenblüten (*Aurantii dulcis flos*) zu entwickeln respektive zu optimieren. Die vorhandene Identitätsprüfung für geschlossene *A. amari flos* ermöglicht laut Industrie keine eindeutige Identifizierung. Zudem wurde die Robustheit der Gehaltsbestimmung bemängelt.

Aus der Literaturrecherche gingen Naringin, Neohesperidin und Neohesperidin als mögliche Kandidaten für Referenzsubstanzen bei Bitterorangenblüten hervor. Bei Süssorangen fand sich keine Forschung zu Inhaltsstoffen der Blüten, weshalb, basierend auf den gefundenen Substanzen für Schalen und Fruchtfleisch, Hesperidin und Narirutin getestet wurden. Die Methode der Identitätsprüfung mittels HPTLC konnte leicht verbessert werden, wobei eine mobile Phase aus Wasser R: Ameisensäure R: Ethylacetat R (20:15:65 v/v/v) das beste Ergebnis erzielte. Für die Referenzbanden wurde eine Kombination aus Naringin und Rutin gewählt. Basierend auf den Chromatogrammen liessen sich die Proben, welche mit einem Gemisch aus Wasser R: Methanol R (1:1 v/v) extrahiert wurden, in drei relativ einheitliche Gruppen unterteilen. Jedoch waren die Muster der Süssorangenblüten jenen der Bitterorangen zu ähnlich, als dass eine Bei-

mischung zu Bitterorangen erkennbar wäre. Die Bitterorangenblüten konnten anhand ihrer deutlichen roten Bande auch in Mischungen erkannt werden.

Für die Gehaltsbestimmung konnte erfolgreich ein UPLC-Gradient entwickelt werden. In den anschliessenden Bestimmungen fanden sich für die geschlossenen Bitterorangenblüten im Schnitt  $12.84 \pm 2.16$  %/m als Gesamtflavonoide, bestehend aus Neohesperidin ( $5.8 \pm 1.18$  %/m) und Naringin ( $3.86 \pm 0.77$  %/m) sowie Narirutin ( $0.64 \pm 0.18$  %/m), Neohesperidin ( $0.69 \pm 0.12$  %/m) und Hesperidin ( $0.68 \pm 0.13$  %/m). Für die Blüten der Süssorangen wurden abhängig von der Gruppe  $1.18 \pm 0.05$  %/m (Gruppe 2) und  $0.97 \pm 0.1$  %/m (Gruppe 3) gefunden, zusammengesetzt aus Hesperidin ( $0.58 \pm 0.02$  %/m) und Rutin ( $0.38 \pm 0.015$  %/m) sowie in kleineren Mengen Narirutin ( $0.04 \pm 0.001$  %/m).

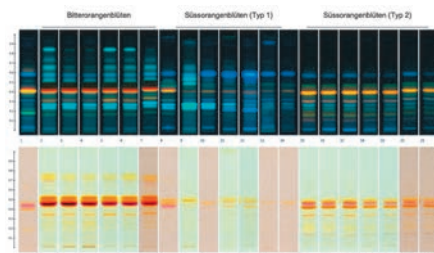


Abb. 1: HPTLC aller Proben.

# Recombinant hydrophobins as biomimetic surfactants for chemistry and biomedicine (confidential)



Diplomandin	Miriam Hartmann
Korrektor ZHAW	Dr. Lukas Neusch
Korrektorin extern	Dr. Alexandra Hofer, Securecell AG

Hydrophobins (HFBs) are small, cysteine-rich, amphiphilic proteins, secreted by filamentous fungi (Fig. 1). When confronted with a hydrophobic/hydrophilic interface, HFBs spontaneously assemble to robust films, while reducing the water surface tension. Owing to these properties, HFBs are ideal surfactants to stabilize and modify particle-based drug delivery systems. A promising host to produce recombinant HFBs is the yeast *Pichia pastoris*, which is characterized by high cell densities, efficient targeted protein expression by tightly regulated promoters, and correctly folded proteins with eukaryotic glycosylation pattern. The aim of this thesis was to optimize the cultivation conditions for HFBs expression, using

a strain with fluorescence tag (RFP/GFP) for easy and fast protein product analysis. Different fed-batch strategies were evaluated for space-time yield and volumetric productivity, and the impact of specific growth rates on protein productivity was investigated in further detail. Precise statements on dynamic shifts in productivity were possible due to high-resolution online sampling with the Numera PAT-System (Securecell, CH), and further analysis via fluorescence readout, flow cytometry and microscopy imaging.

Further details of this work cannot be published for confidentiality reasons.

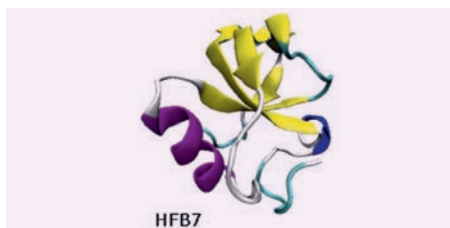


Fig. 1: Ribbon diagram of HFB7, the hydrophobin under investigation.

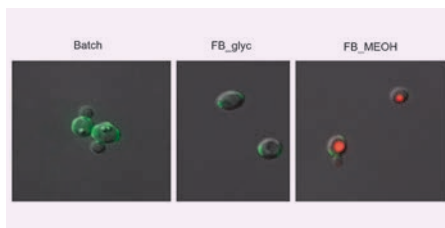


Fig. 2: HFB protein formation over different process phases. From left to right: (1) budding yeast cells, (2) single yeast cells during glycerol fed-batch, (3) induced yeast cells with intracellular HFB::RFP.

# Charakterisierung von Prozess-Sensoren in biotechnologischen Anwendungen (vertraulich)



<b>Diplomand</b>	Raphael Hartmann
<b>Korrektor ZHAW</b>	Prof. Dr. Caspar Demuth
<b>Korrektor extern</b>	Dr. Hendrik Schulenburg, Metroglas AG

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Metroglas AG in Affoltern am Albis durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit werden keine Details zur Arbeit veröffentlicht.

# Rückstreulichtmessung zur Biomassebestimmung für Zellkultivierungen im Schüttelkolbenmasstab



Diplomand	Christoph Herzog
Korrektoren ZHAW	Prof. Dr. Dieter Eibl, Dipl. Ing. Rüdiger Maschke, MSc Jan Müller

Der Einsatz nicht invasiver Sensoren zur Online-Überwachung von Bioprozessen hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Das Ziel dieser Bachelorarbeit war es, über die Messung des Rückstreulichts die Biomasse im Schüttelkolbenmasstab verschiedener Zelllinien zu bestimmen. Eines der wenigen, nicht invasiven Systeme zur Online-Überwachung der Biomasse in Schüttelkolben ist das Messsystem SFR vario der Firma PreSens, welches Rückstreulicht, pH sowie Sauerstoffpartialdruck misst. In dieser Arbeit wurde die Kultivierung von *E. coli*, *S. cerevisiae*, *V. vinifera* und CHO-Zellen bei unterschiedlichen Kultivierungsparametern mittels des SFR varios überwacht. Gleichzeitig wurde die Biomasse über alternative offline-Methoden bestimmt und zu den Messwerten des Rückstreulichts in Beziehung gesetzt. Die Resultate dieser Arbeit sowie die Literatur zeigen, dass die Messung des Rückstreulichts durch Parameter wie die Schüttelrate, das Füllvolumen, den Messbereich, den Messwinkel, die Biomassekonzentration, die Geometrie der Schüttelkolben (Schikanen) sowie die Zelllinie und ihre Morphologie beeinflusst wird. Die kontinuierliche Messung von Rückstreulicht, pH und  $pO_2$  ermöglichte es, Stoffwechselforgänge der Organismen zeitnah zu erkennen. Bei der Kultivierung von *S. cerevisiae* zeigte sich der Substratwechsel von Glucose auf Ethanol durch einen kleinen Einbruch im Sauerstoffpartialdruck, einen Anstieg des pH-Werts und einen schwächeren Anstieg

des Signals des Rückstreulichts (siehe Abb. 1). Während der Kultivierung von *V. vinifera* werden die Zucker Saccharose, Glucose und Fructose zu unterschiedlichen Zeitpunkten komplett verstoffwechselt; zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden kleine Einbrüche im Signal des Sauerstoffpartialdrucks beobachtet. Das gemessene Rückstreulicht aus den Kultivierungen von *E. coli*, *S. cerevisiae* und *V. vinifera* korrelierte gut mit der Trockenbiomasse, der Frischbiomasse, dem PCV und der  $OD_{600}$ . Bei den CHO-Zellen zeigte sich lediglich eine Korrelation zwischen dem Rückstreulicht und der Totzellidichte. Die Lebendzellidichte korrelierte während der exponentiellen Wachstumsphase mit der Abnahme des Sauerstoffpartialdrucks.

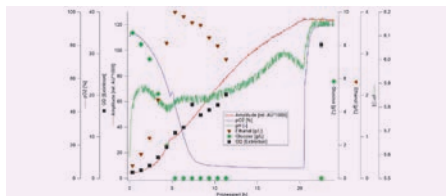


Abb. 1: Übersichtsgrafik der Kultivierung von *S. cerevisiae* ATCC® 32167™. Die Grafik zeigt die Parameter Rückstreulicht (rot), Sauerstoffpartialdruck (blau), pH (grün),  $OD_{600}$  (schwarze Quadrate), Glucose (grüne Rhomboide) und Ethanol (braune Dreiecke).

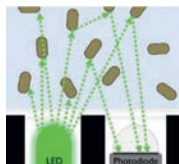


Abb. 2: Die LED sendet Lichtstrahlen in die Kultivierungslösung, dort wird das Licht durch die Zellen gestreut und ein Teil des gestreuten Lichts von der Photodiode gemessen.

# Auswirkung von Macromolecular Crowding auf die ECM Deposition von Leberzelllinien



Diplomand	Bram Hofland
Korrektoren ZHAW	Prof. Dr. Michael Raghunath, Prof. Dr. Jack Rohrer

Tierversuche haben heutzutage in der Gesellschaft immer weniger Akzeptanz und menschliche Testsysteme hätten auch Vorteile bzgl. der Aussagekraft. Somit gibt es eine grosse Nachfrage an nachhaltigen und tierschonenden Methoden, um Medikamente zu testen. Es wurden bereits signifikante Fortschritte in der Zellkulturtechnik mit humanen Zellen erreicht und einige funktionelle Techniken entwickelt. Es werden zum Beispiel primäre Leberzellen in 3D-Kulturen als Sphäroide kultiviert oder in Hydrogelen eingebettet. Diese 3D-Kulturen sind jedoch teuer und aufwendig. Eine 2D-Kultur wäre für diese Zwecke sehr viel einfacher und billiger, wobei jedoch die Fähigkeit zur Biotransformation (eigentlicher Zweck des Tests) in der Zellkultur sehr schnell verloren geht und immortalisierte Zellkulturen nur eine schwache Expression der wichtigsten Biotransformationsenzyme aufzeigen. In dieser Arbeit soll aufgezeigt werden, ob das Macromolecular Crowding (MMC) die extrazelluläre Matrixdeposition und Einbettung von Leberzellen fördert und ob dies zu einer

verbesserten Expression der wichtigsten Biotransformationsenzyme führt. Hierzu wurden HepG2- und HepaRG-Zellen unter drei verschiedenen Konditionen kultiviert. Sie wurden unbehandelt ohne jegliche Zusätze mit Ascorbinsäure oder mit Ascorbinsäure und MMC für fünf Tage kultiviert. Daraufhin wurden sie für immunzytochemische Färbungen von Kollagen IV und Fibronectin oder für eine qPCR der wichtigsten Biotransformationsenzyme verwendet. Im Verlauf dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass die Deposition von Kollagen IV und Fibronectin in die extrazelluläre Matrix von HepG2 und HepaRG durch MMC stark verbessert werden konnte. So bildete Kollagen IV mit MMC fadenartige, zellübergreifende Strukturen in der extrazellulären Matrix von HepG2 und HepaRG. Ein positiver Effekt von MMC auf die Deposition von Fibronectin konnte ebenfalls deutlich gezeigt werden. In den unbehandelten und den mit Ascorbinsäure kultivierten Kulturen war nur eine minimale Deposition von Fibronectin zu sehen, was durch MMC massgeblich erhöht werden konnte. Durch grosse Variationen der Resultate der qPCR konnte eine verbesserte Expression der Biotransformationsenzyme zwar erahnt, aber nicht belegt werden und somit werden weitere Versuche benötigt.

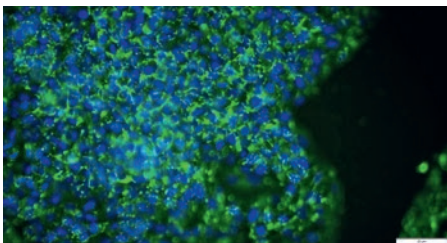


Abb. 1: Durch die Anwendung von Macromolecular Crowding erhöht sich die Deposition von Fibronectin in die ECM von HepG2.

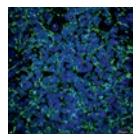


Abb. 2: HepG2-Zellen wurden mit Ascorbinsäure, FicolI 70 und FicolI 400 kultiviert und anschliessend mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.



# Verbesserung von Messmethoden zur Bestimmung von Methanpotenzialen bei faserreichen Fraktionen



<b>Diplomand</b>	Dario Hubmann
<b>Korrektoren ZHAW</b>	Dr. Hans-Joachim Nägele, BSc Yves Moser

Das Biomethanpotenzial (BMP) ist ein essenzieller Parameter für den wirtschaftlichen Betrieb einer Biogasanlage. Die verwendete Standardmethode zur Bestimmung des BMP sind Vergärungsversuche, welche mit einer Laufzeit von 30–90 Tagen sehr zeitintensiv sind. Deshalb besteht ein Bedürfnis für eine neue Technik, welche in der Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) gefunden scheint. Die BMP-Bestimmung mit NIRS ist eine indirekte Messmethode, wobei die mit Vergärungsversuchen erlangten BMP-Daten mit dem dazugehörigen NIR-Spektrum in einer Datenbank hinterlegt werden. Eine Kalibrationssoftware ermöglicht dabei den Vergleich der hinterlegten Daten mit einer Substratmessung, sodass ein BMP als Messergebnis wiedergegeben wird. An der ZHAW Wädenswil wurden dazu Versuche für die BMP-Bestimmung mit dem *NIRS DS2500 Analyzer* der Firma Metrohm (Herisau, Schweiz) durchgeführt. Vergleiche der Messergebnisse zeigen jedoch erhebliche Abweichungen zu Vergärungsversuchen auf. Es wird vermutet, dass die Abweichungen im Zusammenhang mit lignocellulosehaltigen Substraten entstehen. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen den Abweichungen des NIRS und der Standard-Referenzmethode bei der Messung von lignocellulosehaltigen Substraten untersucht. Dazu wurden Vergärungsversuche mit verschiedenen Substraten (Cellulose, Hemicellulose, Lignin, Weizenstroh, synthetisches Stroh, Dinkelspelzen) und Presswasser als Inokulum

durchgeführt und das erhaltene BMP mit den Resultaten der NIRS-Analyse verglichen. Zudem wurde das BMP der Ansatz- und Abbruchproben der Vergärungsversuche mit NIRS bestimmt und mit dem zu erwartenden theoretischen BMP verglichen. Die Ergebnisse der BMP-Bestimmung der Vergärungsversuche zeigen im Vergleich zum BMP bestimmt mit NIRS (Abbildung 1), dass die mit NIRS erzielten Werte alle zu hoch ausfallen (ausgeschlossen Lignin) und kein BMP annähernd bestimmt werden konnte. Ähnliche Resultate ergaben sich durch den Vergleich zwischen dem theoretischen BMP basierend auf den Vergärungsversuchen und NIRS der Ansatz- und Abbruchproben (Abbildung 2). Wiederum fielen alle mit NIRS bestimmten BMP-Werte zu hoch aus. Die Resultate bestätigen somit den Zusammenhang zwischen den Abweichungen der NIRS-Messung und lignocellulosehaltigen Substraten nicht. Vielmehr ergaben sich Probleme mit allen verwendeten Substraten, was auf einen Mangel an hinterlegten BMP-Daten in der Kalibrationssoftware hinweist.

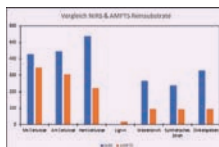


Abb. 1: Vergleich des BMP der reinen Substrate gemessen mit NIRS und AMPTS.

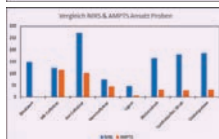


Abb. 2: Vergleich des BMP der Ansatzproben gemessen mit NIRS und AMPTS.

# Development of a biotechnological standard process to characterize sensors (confidential)



<b>Diplomandin</b>	Ravena Kanagarajah
<b>Korrektor ZHAW</b>	Prof. Dr. Caspar Demuth
<b>Korrektor extern</b>	Sebastian Schmidt, Mettler-Toledo GmbH

The described project is under secrecy obligation. It was carried out in cooperation with Mettler Toledo in Urdorf. For reasons of confidentiality, no details of the work will be published.

# Enzymkaskade zur Herstellung von Melonen-Aroma



Diplomandin

Filanza Kerhanaj

Korrektorinnen ZHAW

Dr. Christin Peters, Prof. Dr. Rebecca Buller

Biokatalytische Kaskaden sind effiziente Systeme, in welchen mindestens ein Reaktionsschritt durch ein Enzym katalysiert wird. Diese Systeme sind für das Leben und Wachstum notwendig. Mehrstufige Kaskadenreaktionen bringen vor allem im Zellmetabolismus ihre Vorteile zum Vorschein. Dabei werden selektive Produkte gebildet, ohne die verschiedenen Intermediate zu isolieren oder zu reinigen, was wiederum Zeit und Kosten spart und vor allem weniger oder keine toxischen Nebenprodukte bildet. In diesem Projekt wird eine Kaskadenreaktion mit zwei Enzymen, einer Ene-Reduktase YqjM und einer Baeyer-Villiger-Monooxygenase BVMO<sub>ALF838</sub>, zur Herstellung von Melonen-Aroma etabliert. Als Startmaterial dient das preiswerte Citral (**1**), wobei es von der Ene-Reduktase zum Intermediat (S)-Citronellal (**2**) umgesetzt wird. Anschliessend katalysiert die BVMO die Bildung eines Formiatesters (**3**). Durch die Hydrolyse im wässrig/sauren Milieu entsteht das Endprodukt, das Melonen-Aroma (**4**) (siehe Abbildung 1).

Die Enzyme YqjM und BVMO<sub>ALF838</sub> wurden erfolgreich in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert, wobei die Expression beider Enzyme optimiert wurden. Zusätzlich wurden die Bedingungen der Biokatalysen beider Enzyme mit Hilfe von MODDE untersucht und optimiert. Die Untersuchungen der Enzymkaskaden zeigten, dass ein Enzymverhältnis von 1:6 der YqjM und der BVMO<sub>ALF838</sub> die besten Produktumsätze erzielt. Bei der Umsetzung von 5 mM Citral als Substrat und 10 mM NADPH wurde die grösste Produkt-Peakfläche mit einem Wert von 35.87 nach einer Reaktionszeit von einer Stunde erreicht. Die Enzymkaskade im Ganzellsystem wurde erfolgreich etabliert.

Um höhere Enzymaktivitäten zu generieren und somit die Produktumsätze zu maximieren, werden weitere Untersuchungen und Optimierungen empfohlen.

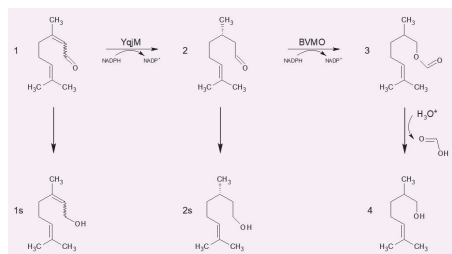


Abb. 1: Reaktionsgleichung der Kaskadenschritte.

# Expression von Strukturproteinen (vertraulich)



<b>Diplomand</b>	Livio König
<b>Korrektorin ZHAW</b>	Dr. Christin Peters
<b>Korrektor extern</b>	Dr. Joachim Klein, Lonza AG

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Lonza AG durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

In den letzten Jahrzehnten erfolgte in den Anwendungsmöglichkeiten von 3D-Bioprintern im Tissue Engineering eine stetige Entwicklung. Diese begann 1981 mit der Entwicklung der Stereolithografie. Diese Technik ermöglichte es, aus flüssigem Kunstharz mittels eines Lasers 3D-Strukturen auszuhärten. Dieser Fortschritt der 3D-Biodrucker nahm exponentiell zu und mündete 2019 in der erstmaligen Herstellung einer humanen, herzähnlichen Struktur, kultiviert in personalisiertem Hydrogel. Hydrogele umgeben die lebenden Zellen und versorgen die Zellen mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. Diese Hydrogele bestehen aus synthetischen oder modifizierten, natürlichen Polymeren, wie zum Beispiel Gelatine oder Hyaluronsäure. Zu den Hydrogelen werden die lebenden Zellen gemischt, wodurch die Bioinks entstehen. Der fortschreitende Erfolg des 3D-Bioprinting fördert die Entwicklung der Kultivierung von grösseren Gewebestrukturen, wodurch Bioinks höheren mechanischen Belastungen ausgesetzt werden. Um dem nachzukommen, können Strukturproteine als Bioinks eingesetzt werden. Strukturproteine, besitzen typischerweise keine enzymatische Aktivität und sollten für

biomedizinische Anwendungen idealerweise weder immunogen noch cytotoxisch sein. Die Zielsetzung dieser Bachelorarbeit ist die Herstellung von natürlichen  $\alpha$ -helikalen Strukturproteinen, welche als Bioinks im 3D-Bioprinting eingesetzt werden können. Hierzu wurden die Gensequenzen der Strukturproteine, welche natürlich vorkommen, in Expressionsvektoren kloniert und rekombinant in *E.coli* exprimiert. Die erreichten Proteinkonzentrationen lagen ein Vielfaches über den Literaturwerten.



Abb. 1: Ein typischer 3D-Drucker, welcher für 3D-Bioprinting eingesetzt wird. Quelle: cellink.com

# CD63-GFP – Ist dies ein verlässlicher Exosomenmarker?



Diplomandin	Bettina Kritzer
Korrektoren ZHAW	Prof. Dr. Jack Rohrer, MSc Leopold von Balthazar

Exosomen gelangten in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung, da sie ein hohes pharmazeutisches Potential aufweisen. Die kleinen membranumschlossenen Vesikel können Proteine, Lipide oder auch RNA transportieren und selbst Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Dies wäre für viele therapeutische Wirkstoffe ein idealer Applikationsmechanismus und würde Therapien ermöglichen, welche heutzutage noch nicht umgesetzt werden können.

In dieser Arbeit wird der Exosomenmarker (CD63-GFP) auf seine Eigenschaft als Marker überprüft. Exosomenmarker werden benötigt, um die verschiedenen Transport-Mechanismen und Wege der Exosomen zu verfolgen.

Die Experimente werden in mesenchymalen Stammzellen (MSC), genauer in UE7T-13 und MSC D2C1 durchgeführt, da MSC ein Potential in der Wundheilung zeigen. Es werden dabei unterschiedliche Aspekte untersucht, welche ein Marker mit sich bringen sollte. Eine Anforderung ist die Fähigkeit, in die Zellen eingebracht und exprimiert zu werden. Dies wurde mit verschiedenen Transfektionsversuchen untersucht. Die Fluoreszenz und die Lokalisation des Markers innerhalb der Zelle wurden mit konfokaler Mikroskopie beurteilt. Der Exosomenmarker sollte auch in die Exosomen verpackt und die CD63-GFP-haltigen Exosomen von Zielzellen aufgenommen werden. Diese Aspekte werden durch Co-Kultivierungen mit unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass der Exosomenmarker CD63-GFP gut geeignet ist für die Lokalisation und Verfolgung von Exosomen mit den MSC als Spenderzellen. Auch für die Beobachtung oder Quantifizierung von freigesetzten Exosomen kann der Marker verlässlich eingesetzt werden. Das CD63-GFP-Konstrukt ist nicht in die MSC transfizierbar und kann nur über lentivirale Transduktion in die Zellen gelangen. CD63-GFP wird in die Exosomen verpackt und freigegeben. Eine Internalisierung der Exosomen in Zielzellen konnte dagegen nicht erfolgreich nachgewiesen werden.

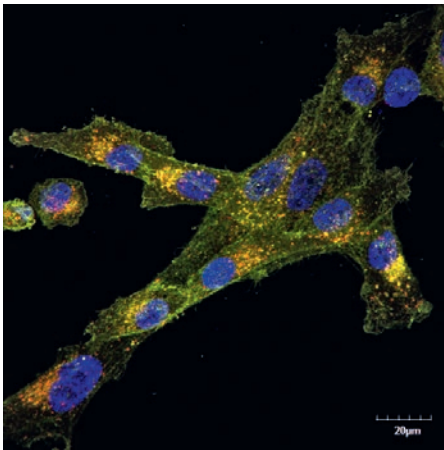


Abb. 1: UE7T-13-Zelle mit transduziertem Exosomenmarker (grün) co-lokalisiert mit zelleigenem CD63 (rot).

# Identifikation und Gehaltsbestimmung von Colchicin und seinen Derivaten in *Gloriosa superba* L. (vertraulich)



Diplomandin	Maria Kunjappu
Korrektor/-in ZHAW	Dr. Evelyn Wolfram, Dipl. Chemiker (FH) Samuel Peter
Korrektor extern	Dr. Alexander Schenk, Max Zeller Söhne AG

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Max Zeller Söhne AG durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

durch eine längere Extraktion nochmals erhöht werden kann. Aufgrund von zeitlichen Restriktionen konnte dieser Ansatz jedoch nicht weiterverfolgt werden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung einer UPLC-Methode für die Gehaltsbestimmung der Alkaloide in der *Gloriosa superba* L. Grob kann sie in die Schritte Probenaufbereitung, Methodenentwicklung und Gehaltsbestimmung eingeteilt werden. Bei der Probenaufbereitung wurden verschiedene Methoden getestet, damit für die Extraktion ein homogenes Gemisch entsteht. Letztendlich konnte durch das separate Mahlen der Samenschale und des Kerns eine reproduzierbare und homogene Mischung für die Extraktion hergestellt werden. Auch für die Extraktion wurden verschiedene Vorgehensweisen getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die Extraktion mit 80 % Methanol die höchste Ausbeute brachte. Bei der Methodenentwicklung wurden die Wirkungen verschiedenster Parameter auf das Chromatogramm beobachtet. Dabei stellte sich heraus, dass sich Ammoniumacetatpuffer (pH 8.5) und Acetonitril für die Trennung der Colchicin-Alkaloide eignen. Anhand der in dieser Arbeit entwickelten Methode konnte eine Colchicin-Alkaloid-Menge von 2.7 % (m/m) in der *Gloriosa superba* L. berechnet werden. Ein weiterer Versuch zeigte überdies, dass die Ausbeute



Abb. 1: Blüte der Ruhmskronen.

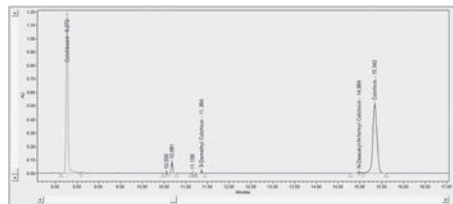


Abb. 2: Fertiges Chromatogramm. Die Gesamtheit ist nicht abgebildet, nur die Zeitspanne, in der die relevanten Alkaloide eluieren. Alle bekannten Colchicin-Alkaloide sind im Chromatogramm beschriftet.

# Diversität von Archaeen in Methanisierungsreaktoren



Diplomandin	Keerthanah Kuruparan
Korrektoren ZHAW	Dr. Rolf Warthmann, Dr. Theo Smits

Das Power-to-Methan-Konzept weist gegenüber den anderen Langzeitspeichersystemen einige Vorteile auf, da das erzeugte Methan in die heutigen Energieinfrastrukturen unkompliziert integrierbar ist. Die Grundidee in diesem Fall ist, die erneuerbaren Gase für verschiedene Anwendungsbereiche zugänglich zu machen. Die Umwandlung von Kohlendioxid und Wasserstoff zu Methan wird als Methanisierung bezeichnet. Die Methanisierung kann einerseits biologisch und andererseits chemisch betrieben werden. Die biologische Methanisierung hat in der gegenwärtigen Zeit an Bedeutung gewonnen, da diese Art der Methanisierung viele Vorteile gegenüber der chemischen Methanisierung aufweist. Für die biologische Methanisierung werden Organismen wie methanogene Archaeen benötigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde einerseits versucht, methanogene Archaeen zu kultivieren, und andererseits wurden Analysen von Mischkulturen wie *Presswasser* und *Faulschlamm* durchgeführt, um die Diversität der Archaeen in diesen Kulturen identifizieren zu können. Nachdem zwei Reinkulturen in anoxisches Medium kultiviert wurden, sind diese zu den Proben (*Presswasser/Faulschlamm*) beigefügt worden. Die Grundidee dabei ist, die Reinkulturen in den Proben wieder zu identifizieren. Für die Analysen der Mischkulturen wurde in einer ersten Phase eine *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)* durchgeführt. Die Daten der Analyse konnten mit den zwei Webtools *T-Rex* und *MICA3*

erweitert werden. Um die einzelnen Archaeen in den Mischkulturen bestimmen zu können, wurde in einem weiteren Schritt kloniert und im Folgenden eine 16S rRNA Gen-Sequenzierung der Proben durchgeführt. Dabei konnten einige Organismen wie *Methanothermobacter wolfeii*, *Methanosaeta harundinacea*, *Thermococcus sibiricus*, *Pyrodictium occultum*, *Nitrososphaera viennensis*, *Methanothermobacter thermotrophicus* usw. identifiziert werden. Die aufgestellten Methoden bei der Klonierung bis zur Sequenzierung und die Teilschritte bis zur *T-RFLP*-Analyse für diese Arbeit haben prinzipiell funktioniert. Optimierungspotenzial wäre bei der Probenvorbereitung, in der Aufreinigung der Proben für die Klonierung sowie das Testen der Effizienz bei der Ligation und Transformation und Verwenden von mehreren Restriktionsenzymen bei der *T-RFLP*-Analyse noch vorhanden.

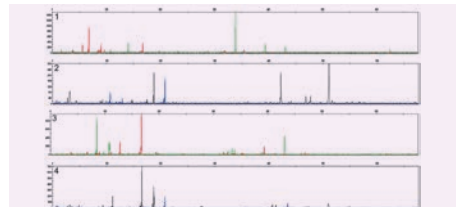


Abb. 1: **Diversität der Archaeen in den Mischkulturen: T-RFLP-Analyse von Presswasser [1,2] und Faulschlamm [3,4] mit Reinkultur-Proben.**

Die x-Achse stellt die Fragmentlänge (bp) und die y-Achse die relative Fluoreszenz Unit dar. Die Graphiken 1 und 3 stellen die Proben mit den Primerkombinationen ARCH109f\_Green/ARCH915r\_Red dar. Die Graphiken 2 und 4 stellen die Proben mit den Primerkombinationen ARCH21f\_Yellow/ ARCH958r\_Blue dar.

# Lachgasproduktion in Schweizer Kläranlagen



<b>Diplomand</b>	Kevin Lustenberger
<b>Korrektor ZHAW</b>	Martin Kühni
<b>Korrektor extern</b>	MSc Wenzel Gruber, Eawag

Lachgas, Distickstoffmonoxid ( $N_2O$ ), ist ein Spurengas, welches den Treibhauseffekt beeinflusst. In Kläranlagen macht  $N_2O$  bis zu 78 % ihres Gesamt-Fussabdruckes aus und ist somit nebst Kohlendioxid ( $CO_2$ ) und Methan ( $CH_4$ ) ein bedeutendes Treibhausgas. Die Lachgasemissionen auf europäischen Kläranlagen verursachen 3.1 % des gesamten europäischen-Lachgasausstosses.

$N_2O$  entsteht bei der Nitrifikation über ihre Zwischenprodukte Hydroxylamin ( $NH_2OH$ ) und Nitrit ( $NO_2^-$ ). Weiter entsteht  $N_2O$  bei der Denitrifikation über das dabei anfallende Zwischenprodukt  $NO$ .

Mittels Nitrifikation und Denitrifikation in definierten Batchversuchen wurde die Grösse des Lachgasausstosses verschiedener Belebtschlämme aus Schweizer Kläranlagen gemessen (Dreifachbestimmungen). Dabei diente eine innerhalb der Arbeit entwickelte Methode zur Messung des  $N_2O$ -Bildungspotenzials der Bestimmung des Lachgasausstosses während dem Abbau von  $NH_4^+$  (Ammonium),  $NO_3^-$  (Nitrat) und  $NO_2^-$  (Nitrit) im Zuge der Nitrifikation resp. Denitrifikation.

Weiter wurden für dieselben Belebtschlämme die  $NH_4^+$ -,  $NO_3^-$ - und  $NO_2^-$ -Abbauleistungen ermittelt und dargestellt. Die erhaltenen Resultate zeigten auf, dass Belebtschlämme mit kleineren Abbauleistungen (langsamerer Abbau) im Total über die gesamte Versuchszeit höhere  $N_2O$ -Emissionen ergeben (siehe Abb. 2). Allerdings muss dies noch mit weiteren Belebtschlämmen geprüft werden. Die eta-

bierten Batchversuche sowie die Entwicklung der Methode des Lachgasbildungspotenzials legen den Grundbaustein für weitere Belebtschlammuntersuchungen. In Zukunft sollte der Lachgasausstoss mit den auf Kläranlagen angewendeten Verfahren und Betriebsweisen sowie mit abiotischen Parametern wie saisonalen Temperaturunterschieden usw. verglichen werden. Interessant wäre weiter, mittels Metagenomanalyse die Zusammensetzung des bakteriellen Konsortiums zu bestimmen sowie mit Stickstoffisotopen markierte  $N$ -



Substrate zur Aufklärung der  $N_2O$ -bildenden Stoffwechselwege zu nutzen.

Abb. 1: Labor-Batchbioreaktor (12L) zur Bestimmung von N-Spezies-Abbauleistungen und Lachgasbildungspotenzialen.

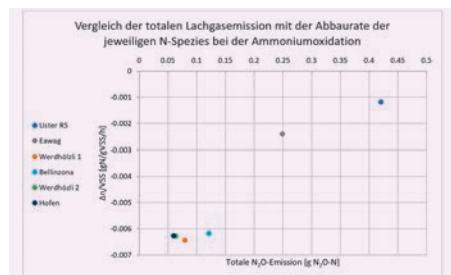


Abb. 2: Vergleich der totalen Lachgasemission mit der Abbaurrate der unterschiedlichen N-Spezies. «Delta n/VSS» steht für die Biomassen-bezogene Abbaurrate der N-Spezies.



# Evaluation erweiterter Testsysteme zur Bestimmung des MIC von alten und neuen antifungalen Wirkstoffen (vertraulich)



Diplomandin	Sivitha Manjaly
Korrektoren ZHAW	Prof. Dr. Walter Krebs, MSc Dennis Wipfli
Korrektor extern	Dr. Rolf Stettler

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Pilze sind überall vorzufinden, sei es in Lebensmitteln, im Erdboden, im Wasser, in der Luft, auf der Haut, in den Schleimhäuten oder im Darm des Menschen. Die körpereigene Abwehrfunktion hält gewöhnlich diese Pilze unter Kontrolle, sodass keine Gefahr besteht. Die am häufigsten für Infektionen verantwortlichen Pilze werden in ein sogenanntes D (Dermatophyten)-H (Hefen)-S (Schimmelpilze)-System unterteilt. Während die Zahl an infizierten Patienten jährlich zunimmt, fehlt es an neuen Antimykotika, die diese Pilze bekämpfen können.

In dieser Bachelorarbeit wurde mit einem neuen Antimykotikum, welches aus der Pflanze *Anarrhinum bellidfolium* gewonnen wird, gearbeitet. Da es aber keine genügende *in vivo*-

Aktivität aufweist, wurde im Rahmen eines KTI-Projekts das Antimykotikum modifiziert, um es auch *in vivo* wirksamer zu machen. Diese neu hergestellten Derivate wurden anhand einer Suszeptibilitätsprüfung getestet. Ein bestehendes Testverfahren wurde so erweitert, dass menschliches Serum in das Wachstumsmedium gegeben wurde. Damit konnten die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) der Derivate mit unterschiedlichen *Candida*-Gattungen in der Gegenwart von 1 % Serum getestet werden.

In der Gegenwart vom Serum verschlechtern sich generell die MHKs der Derivate. Das Serum schützt anscheinend die pilzlichen Zellen vor den Wirkstoffen, wobei der Mechanismus nicht eruiert werden konnte. Die Derivate 7939 und 8020 erwiesen sich bei *C. krusei*- sowie *C. albicans*-Kulturen in der Gegenwart von 1 % Serum am wirksamsten (Abb. 1).

Durch die Informationen der minimalen Hemmkonzentration und der chemischen Struktur der beiden Derivate können weitere ähnliche Derivate hergestellt werden, mit dem Ziel, dass diese nun *in vivo* wirksamer als das ursprüngliche Antimykotikum sind.

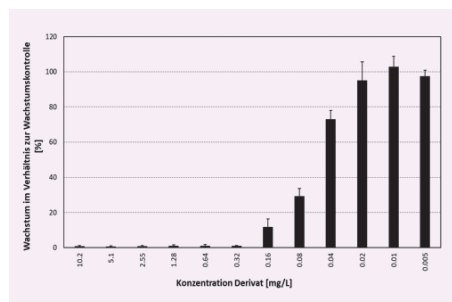


Abb. 1: Wachstum von *C. albicans* in Gegenwart von 1 % Serum und des Derivats 7939 (MHK = 0.32 mg/L).

# N-1 Perfusion: Neue Ansätze zur Inokulum-Herstellung einer CHO-Zell-basierten Antikörperproduktion (vertraulich)



<b>Diplomand</b>	Nikola Markovic
<b>Korrektor/-innen ZHAW</b>	Prof. Dr. Dieter Eibl, Prof. Dr. Regine Eibl-Schindler, BSc Nina Steffen

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Die traditionellen Betriebsarten Batch und Fed-Batch sind nach wie vor Standard, wenn es um die Herstellung von Biopharmazeutika geht. Batch- und Fed-Batch-Verfahren weisen jedoch bezüglich Produktqualität, Raum-Zeit-Ausbeute, Flexibilität etc. Nachteile auf. Ein alternativer Ansatz ist die kontinuierliche Verarbeitung, die in der Zellkulturtechnik oft mit einer Perfusionskultur realisiert wird (s. Abb. 1). In einer Perfusionskultur wird filtrierte Kulturlösung, welche die gewünschte Wirkstoffverbindung enthält, kontinuierlich aus dem Bioreaktor entfernt und gleichzeitig frisches Medium zugeführt. Im Vergleich zu einem Fed-Batch-Prozess kann ein Perfusionsprozess potenziell höhere Zelldichten, spezifische Produktivität und volumetrische Produktivität erreichen. In dieser Arbeit wurde ein bestehender N-1 Perfusionsprozess mit CHO DP-12 Zellen, welche rekombinant humanisiertes IgG gegen IL-8 produzieren, verifiziert und weiter optimiert. Dazu wurden insgesamt drei Perfusionen in einem Standard-Perfusionsbag der Firma Sartorius Stedim durchgeführt (s. Abb. 2).

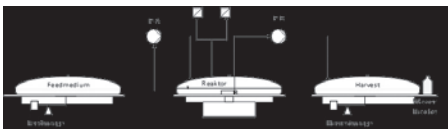


Abb. 1: Schematische Darstellung einer Perfusion.

Als Zellrückhaltevorrichtung diente dabei eine im Bag integrierte Filtrationsmembran mit einem Porendurchmesser von 1.2  $\mu\text{m}$ . Die Einstellung der Perfusionsrate basierte auf der Glukosekonzentration im Perfusionsbag. Das Ziel war, eine Glukosekonzentration von 3 g  $\text{L}^{-1}$  einzuhalten. Im ersten Versuch wurde eine Lebendzellendichte von  $147 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  bei einer Viabilität von 88.7 % erreicht. Im zweiten und dritten Versuch konnte die Lebendzellendichte auf  $200 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  gesteigert werden, indem die maximale Perfusionsrate von 1.3  $\text{d}^{-1}$  auf 2.3  $\text{d}^{-1}$  angehoben und die Perfusion einen Tag früher gestartet wurde. Dabei mussten keine Zeiteinbussen in Kauf genommen werden.



Abb. 2: Perfusionsbag.

# Isolation von Exosomen und Detektion von Markerproteinen



<b>Diplomand</b>	Simon Mathis
<b>Korrektoren ZHAW</b>	Prof. Dr. Jack Rohrer, MSc Leopold von Balthazar

Exosomen sind der neueste Trend in der Pharmaindustrie zur diagnostischen Früherkennung von Krankheiten sowie zum Transport von Medikamenten und Wirkstoffen zu bestimmten Zielzellen im Körper. Bei Exosomen handelt es sich um körpereigene Vesikel, welche von unterschiedlichsten Zellen gebildet, beladen und anschliessend sekretiert werden. Die Beladung der Exosomen mit unterschiedlichsten Biomolekülen sowie der anschliessende Transport zu bestimmten Zielzellen ermöglicht ihnen die Beteiligung an der interzellulären Kommunikation. Exosomen bieten somit ideale Voraussetzungen für den Einsatz als Drug Delivery System, um Wirkstoffe im Körper zielgerichtet zu transportieren. Daneben sind Exosomen an einer Vielzahl von pathologischen Prozessen und Zuständen beteiligt, was ihnen auch enormes diagnostisches Potential verleiht.

Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Produktion von Exosomen mit Hilfe von mesenchymalen Stammzellen sowie die anschliessende Isolierung und Charakterisierung dieser extrazellulären Vesikel. Die Exosomen sollen dafür mittels Nanopartikel Tracking Analyse (NTA) bezüglich ihrer Grössenverteilung sowie Konzentration und mittels Fluoreszenz Durchflusssyztometrie bezüglich bestimmter Markerproteine bzw. Oberflächenantigene analysiert und charakterisiert werden.

Der Vergleich der unterschiedlichen mesenchymalen Stammzelllinien zeigt, dass sie eine ähnliche Quantität an Exosomen sekretieren,

welche auch bezüglich ihrer Grösse bzw. ihrer Grössenverteilung (hauptsächlich zwischen 50 nm und 200 nm) vergleichbar sind. Unter den Isolierungsmethoden scheint die Ultrafiltration die höchste Ausbeute zu erzielen, gefolgt von der Ultrazentrifugation und der Präzipitation. Die Grösse bzw. Grössenverteilung der Exosomen im Isolat scheint dabei unabhängig von der verwendeten Isolierungsmethode zu sein. Neben den typischen exosomalen Markern CD9, CD63 und CD81 konnten zwei weitere Exosomenmarker (CD44 und CSPG) sowie zwei MSC-spezifische Exosomenmarker (CD49e und CD105) identifiziert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich eine höhere Einsaatdichte bei der Produktion positiv auf die Anzahl an sekretierten Exosomen im konditionierten Medium auswirkt und dass sich die Expression von CD63 GFP optimal für den Nachweis der Exosomen mittels Fluoreszenzmessung (NTA) eignet.



Abb. 1: Die Verteilung der Exosomengrösse der unterschiedlichen Zelllinien.

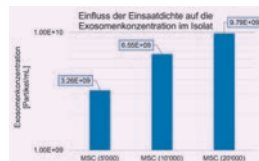


Abb. 2: Die Zunahme der Exosomenkonzentration auf Grund erhöhter Einsaatdichte.

# A reporter construct in primary cells using luciferase



Diplomand	Patrick Maurhofer
Korrektoren ZHAW	Prof. Dr. Jack Rohrer, Dr. Bruno Filippi

The objective was to establish reporter systems with luciferase and eGFP (enhanced green fluorescent protein) in primary keratinocytes (as their physiological relevance ought to be higher) and as a control in HaCaT (a cancer cell line from keratinocytes), which could then be used as an assay to determine skin sensitization. Therefore, from the existing plasmids RC59 and RC80 the SEAP (secretory embryonic alkaline phosphatase) sequence had to be cut out and be replaced with the eGFP respectively luciferase sequence. The new plasmids ought to be transfected in primary cells and HaCaT.

As there was a problem with the luciferase template, the sequence for luciferase could not be obtained. Thus, the work had been continued with the eGFP sequence only. Both desired plasmids with eGFP inserted were obtained, sequenced and renamed to RC84 and RC85 (originating from RC59 respectively

RC80). RC84 contains a mutation in the eGFP amino acid sequence at amino acid 9 (Valine instead of Phenylalanine), while RC85 contains a mutation at amino acid 5 of the eGFP sequence (Arginine instead of Glycine). Neither mutations are at the chromophore region of eGFP. To prove that the new plasmids work, their successful establishment as an assay in primary keratinocytes or HaCaT cells, would have to be achieved. But due to the limited time available, transfection of the new plasmids could not be tried, thus no new assay could be established.

However, an existing SEAP (combined with AlamarBlue) assay with HaCaT cells containing RC80 was performed and slightly adjusted. The assay indicated that HaCaT RC80 cells do not respond to oxidative stress very strongly (induction compared to basal activity of only 1.3 to 1.6-fold), which underlined the need for a reporter system in primary cells.

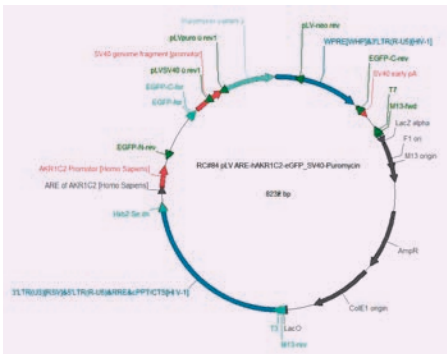


Fig. 1: RC84 pLV ARE-hARK1C2-eGFP\_SV40-Puromycin.

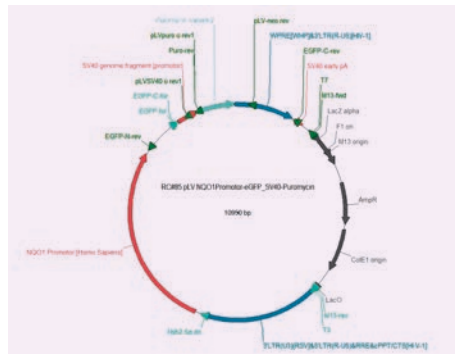


Fig. 2: RC85 pLV NQO1 Promotor-eGFP\_SV40-Puromycin.

# Quantifizierung von *Lactobacillus sp.* in einer Grüngutverwertungsanlage



Diplomandin	Nurdzane Memeti
Korrektoren ZHAW	Prof. Dr. Urs Baier, Dr. Rolf Warthmann
Korrektor extern	Dr. Horst Matzke, AVAG AG für Abfallverwertung

Die AG für Abfallverwertung (AVAG) in Spiez BE setzt sich für die Verwertung von Biomasse und für ein nachhaltiges Abfallrecycling ein. Der Betrieb stellt seit Jahren aus kommunalem Grüngut Kompost für den Gartenbau her. Seit 2018 wird dabei intensiv im Bereich der Kompostierung und des Vergärungsprozesses geforscht. Mittels Zugabe von «Effektiven Mikroorganismen» (EM), welche unter anderem Milchsäurebakterien enthalten, wird eine Absenkung des pH-Wertes entlang der Behandlungskette angestrebt. Diese Ansäuerung wird vorrangig zur Haltbarmachung von Biomasse während der Anlieferung und Lagerung durchgeführt. Zusätzlich sollen Emissionen aus den Kompostmieten verringert werden, um somit die Qualität des Düngerprodukts zu verbessern.

Das Ziel dieser Bachelorarbeit bestand darin, ein mikrobiologisches Profil der Behandlungskette der AVAG in Bezug auf Milchsäurebakterien zu erstellen. Im ersten Teil der Arbeit konzentrierte man sich auf sieben Probenahmestellen (Abb. 1), welche die relevanten Prozessschritte (O, A–F) der AVAG darstellen. Im zweiten Schritt der Arbeit wurde die Lebendzellzahl von Milchsäurebakterien mittels dezimaler Verdünnungsreihe (100–10<sup>6</sup>) in Peptonlösung (0.1 % Peptone Salt Solution) bestimmt. Hierbei wurde das selektive Medium, MRS-Nährmedium nach De Man, Rogosa und Sharpe für den Nachweis von Milchsäurebakterien verwendet.

Die Ergebnisse zeigten, dass Milchsäurebakterien in der Impfkultur der «Effektiven Mikroorganismen» (EM) im Bereich von  $1 \cdot 10^9$  KBE/g TS zu finden sind und diese im Verlauf der Anlage im Kompost auf  $1 \cdot 10^4$  KBE/g TS sinken. Mittels MALDI-TOF MS wurde gezeigt, dass nicht nur Milchsäurebakterien mit dem selektiven Medium nachgewiesen wurden, sondern weitere im Grüngut vorkommende Mikroorganismen. Eine weitere Beprobung der Verfahrenskette zu mehreren Zeitpunkten sowie grössere Probenmengen (1 kg anstatt 1 g) sind angezeigt, um die Methodik zu optimieren und belastbare Resultate zu liefern.



Abb. 1: Die Oberland Energie AG ist ein Unternehmen der AG für Abfallverwertung (AVAG). Es sind sieben Probenahmestellen (O, A–F) im Zeitfenster vom 13.05.2019 bis 03.06.2019 im Abstand von einer Woche beprobt worden.

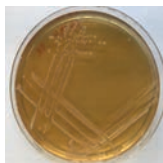


Abb. 2: Ausstrichverfahren für Reinkultur eines *Lactobacillus*.

# Digitalisierung und Automatisierung für integrierte biotechnologische Produktionsanlagen (vertraulich)



Diplomandin	Veronika Mitreska
Korrektoren ZHAW	Dr. Lukas, Neutsch, BSc Sebastian von Rotz
Korrektor extern	Dr. Paul Kroll, Securecell AG

Das beschriebene Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Securecell AG durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Die Automatisierung von Herstellungsprozessen ermöglicht, die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit eines Prozesses zu erhöhen und auch die gewünschte Produktausbeute und Qualität zu gewährleisten. Spätestens seit Einführung der PAT-Initiative im Jahr 2004 ist es das Ziel, die Überwachung einzelner Prozessschritte bis hin zu ganzen Prozessen weitestgehend zu automatisieren. Schon seit Jahren sind biotechnologische Produktionsprozesse, basierend auf Zellkulturen, von zentraler Bedeutung für die pharmazeutische Industrie. Anhand eines CHO-Modell-Prozesses zur Herstellung pharmazeutischer Prote-

ine, wurde eine dynamische,  $q_s$ -gesteuerte Feed-Kontrolle geplant und implementiert. Hierbei wurde, basierend auf der Online-Messung der Permittivität als Mass für die aktuelle Zellkonzentration, die Substratzugaberate laufend an die vorhandene Biomasse angepasst. Vorab wurde das Permittivitätssignal gegen die Lebendzellzahl (VCD) korreliert, damit im Prozess eine periodische Re-Kalibration möglich ist. Hierfür wurde eine automatisierte Probenahme und Probeverarbeitung über das PAT-System NUMERA (Securecell AG, Schlieren) realisiert, mit anschliessender automatischer Auszählung des Zell-Samples in einem Zellanalysegerät (Cedex HiRes, Roche AG, CH). Zur Validierung des Probenahmeprozesses wurde der Effekt des Dilutions- und Filtrationsmoduls auf die Zellintegrität untersucht. Die Validierungsversuche wurden anhand eines DoE (Design of Experiments) ausgearbeitet.



Abb. 1: Reaktor-Setup für die durchgeführten Versuchsreihen.



Abb. 2: Modulares Probenahmesystem NUMERA.

# Analyse des molekularen Mechanismus, welcher es hypoxischen Krebszellen erleichtert, in Lymphgefäße vorzudringen (vertraulich)



<b>Diplomandin</b>	Ramona Müller
<b>Korrektorin ZHAW</b>	Dr. Steffi Lehmann
<b>Korrektorin extern</b>	Dr. Eva Riegler, ETH Zürich, NEXUS Personalized Health Technologies

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Firma NEXUS durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Während der Metastasierung breiten sich Krebszellen systemisch im Körper aus und verursachen Schädigungen von Organen, woran viele Krebspatienten sterben. Sobald sich Krebszellen vom Primärtumor ablösen, metastasieren sie über das Lymph- oder Blutgefäßsystem. Dabei werden häufig Metastasen in den nahe gelegenen Lymphknoten gebildet. Interessanterweise wurde in klinischen Studien eine Korrelation zwischen dem Level an Hypoxie, d. h. einem Sauerstoffmangel, im Gewebe des Primärtumors und der Anzahl an gebildeten Lymphknotenmetastasen festgestellt. Passend dazu wurde in Zellversuchen beobachtet, dass hypoxische Krebszellen leichter in Lymphgefäße eindringen und Lymphgefäßwände effizienter durchqueren als normoxische Kontrollzellen. Jedoch bleiben die dafür verantwortlichen molekularen Mechanismen weitgehend ungeklärt. Das Ziel dieser Bachelorarbeit war die Optimierung und Etablierung eines High-Content-Screening-Experiments, um die molekularen Signalwege, die für das Eindringen von hypoxischen Krebszellen in Lymphgefäße verantwortlich sind, zu identifizieren. 400 Gene, welche eine Rolle für die Zellmigration spielen und unter Hypoxie induziert werden, sollen dazu in 4T1 Mausbrustkrebszellen mittels shRNA-induziertem

Gen-Knock-Down ausgeschaltet werden. Der Effekt dieser Manipulation auf die Durchquerung von Lymphendothelzellschichten wird in einem Transwell-basierten Transmigration Assay im High-Content-Format untersucht. Dadurch sollen Gene identifiziert werden, deren Knock-Down die Hypoxie-induzierte erhöhte Transmigration verringert. Als Positivkontrolle ist die Verwendung des Hypoxie-induzierten Faktors 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) geplant, dessen Knock-Down mit hoher Wahrscheinlichkeit die Migration der hypoxischen Krebszellen blockiert. In dieser Bachelorarbeit wurden zwecks Validierung dieser Hypothese HIF-1 $\alpha$  4T1 Knock-Down-Zellen generiert und der Knock-Down mittels Western Blot analysiert. Weiter wurde die Trypsin-basierte Ablösung der 4T1 Krebszellen als Einzelzellen für den Transfer auf die mit Lymphendothelzellen beschichteten Transwells optimiert, so dass die Bildung von Aggregaten verhindert werden kann, welche eine automatisierte Analyse der Transmigration erschweren würden.

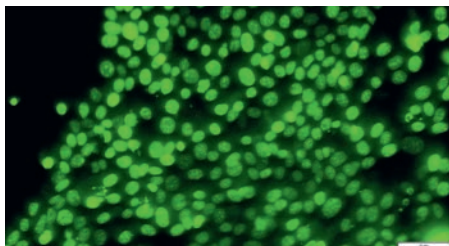


Abb. 1: 4T1 H2B Venus cl. 6 Krebszellen besitzen ein H2B Venus-Konstrukt, welches unter dem Fluoreszenzmikroskop grün leuchtet.

# Qualifizierung eines skalierbaren Einfrier- und Auftausystems für Bulk Drug Substanzen (vertraulich)



Diplomand	Daniel Nägeli
Korrektoren ZHAW	Prof. Dr. Dieter Eibl, MSc Jan Müller

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit den Firmen Lonza AG und Single Use Support GmbH durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Die Lagerung und der Transport von Proteinlösungen im grossvolumigen Massstab (Bulk Drug Substanzen) sind bedeutende Schritte auf dem Weg vom Wirkstoff bis zum fertigen Endprodukt. Die Durchführung dieser Schritte findet vorzugsweise im gefrorenen Zustand statt. Diese Methode birgt jedoch einige Herausforderungen, besonders die Kryokonzentration stellt ein grosses Problem dar. Die Kryokonzentration ist die lokale Aufkonzentrierung von gelösten Stoffen beim Einfrieren von Proteinlösungen. Dies kann zur Denaturierung und Aggregation der Proteine führen und muss bestmöglich verhindert werden. Im Gegensatz zum Labormassstab sind Einfriervorgänge im Produktionsmassstab aufgrund der längeren Wärmetransferwege und grösseren Volumina deutlich schwieriger zu kontrollieren. Das Ziel dieser Arbeit war, Informationen über das Einfrierverhalten einer Pufferlösung im Produktionsmassstab zu gewinnen. Dafür wurden Temperaturverläufe aufgenommen und die Kryokonzentration mithilfe von messbaren Parametern und einer optischen Auswertung untersucht. Als Gefriersystem wurde der von Single Use Support GmbH entwickelte Plate Freezer RoSS.pFTU blockbuster scale eingesetzt, mit welchem 300 L Flüssigkeit in einem

Durchgang eingefroren und anschliessend wieder aufgetaut werden können. Als Behälter dienten Single-use Bags mit Füllvolumen von 7.6 L bis 50 L. Es konnte gezeigt werden, dass Einfriervorgänge im Plate Freezer deutlich schneller ablaufen als in Gefriersystemen mit einem temperierten Luftstrom. Zusätzlich werden die Behälter im Plate Freezer gleichmässig von unten und oben gekühlt. Diese beiden Eigenschaften führen dazu, dass trotz den grossen Flüssigkeitsvolumina beim Vergleich mit anderen Gefriersystemen nur sehr geringe Konzentrationsgradienten entstehen.



Abb. 1: Der Plate Freezer RoSS.pFTU blockbuster scale von Single Use Support GmbH.



Abb. 2: Die Wärmeübertragungsplatten des Plate Freezer. Die Single-use Bags werden dazwischen platziert.



Abb. 3: Mithilfe eines Farbstoffes wurde die Kryokonzentration sichtbar gemacht. Die weisse Linie verdeutlicht, wie gleichmässig der Gefriervorgang von unten und oben verläuft.



# Bestimmung der Blasengrößenverteilung im 100L-Masstab mittels Shadowgraphy (vertraulich)



Diplomand	Joel Räth
Korrektoren ZHAW	Dipl. Ing. Sören Werner, BSc Stefan Seidel

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit werden keine Details zur Arbeit veröffentlicht.

Einer der wichtigsten Parameter für die verfahrenstechnische Charakterisierung eines Bioreaktors ist der spezifische Sauerstoffübergangskoeffizient  $k_{L,a}$ . Die Blasengrößenverteilung steht dabei in direktem Zusammenhang mit dem  $k_{L,a}$ , da die spezifische Phasengrenzfläche  $a$  aus der Summe aller Einzelblasen mit ihrer jeweiligen Blasengröße zusammengesetzt ist. Um die Blasengrößenverteilung zu untersuchen wurde das Verfahren der Shadowgraphy verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Leistungsprüfstand dahingehend erweitert, sodass die Messung von Blasengrößenverteilungen in einem 100L-Glasreaktor durchgeführt werden kann. Um den Reaktor auf der ganzen vertikalen Länge zu untersuchen, wurde der zu untersuchende Messbereich gemäss Abb. 1 in zwei Teilbereiche unterteilt. Durch zwei verschiedene Befestigungen der Kamera und des Diffusors kann ein lückenloses Messen der ganzen Höhe sichergestellt werden. Aufgrund der Verwendung eines Laserarms wird eine zusätzliche Justierung durchgeführt, um die Helligkeitswerte zu optimieren. Durch diese Optimierung kann eine hohe Qualität der gewonnenen Daten gewährleistet werden. Die SOP «Größenverteilungsmessungen mittels Shadowgraphy» wurde überarbeitet und ergänzt. Während der Testmessungen wurde festgestellt, dass die Laserintensität über

die Zeit abnimmt. Bei 95 % Laserintensität und einer Aufnahme Frequenz von 10 Hz betrug die Abnahme über 5 Stunden 22 % (Abb. 2), während bei 93 % Laserintensität und einer Frequenz von 5 Hz der Verlust lediglich 4 % betrug. Dies ist auf das Alter des Nd:YAG-Doppelpulslasers zurückzuführen. Die Erschöpfung kann durch eine niedrigere Aufnahme Frequenz stark reduziert werden. Der neue Bernoulli-Laser konnte aufgrund eines technischen Defektes nicht in Betrieb genommen werden.

Viele Arbeitsschritte wurden zusammengefügt und vereinfacht und in die SOP eingearbeitet. Damit sind zukünftige Messungen mit stark reduziertem Arbeitsaufwand durchführbar.

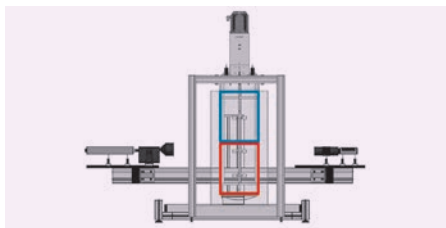


Abb. 1: Leistungsprüfstand Shadowgraphy.

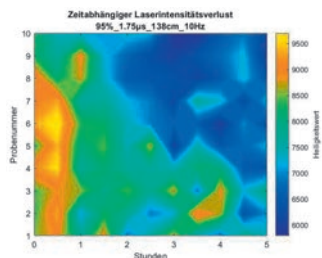


Abb. 2: Übersicht der Laserintensitätsabnahme.

# Anwendung von Single-Use pH-Sensoren in biotechnologischen Kultivierungen (vertraulich)



Diplomand	Robin Rosenberger
Korrektor ZHAW	Prof. Dr. Caspar Demuth
Korrektor extern	Ferdi Caglayan, C-Cit Sensors AG

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Firma C-Cit Sensors AG durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

In der Biotechnologie ist die Messung des pH-Wertes in Zellkulturen unerlässlich. Mit wachsender Verbreitung von Single-Use-Systemen verändern sich auch die Anforderungen an die Sensoren. Die Sensoren sollen möglichst klein, stabil, sterilisierbar und günstig sein. Ein Sensor, der diese Anforderung erfüllen soll, wurde von der Firma C-Cit Sensors AG entwickelt und in dieser Arbeit ausführlich getestet. Dabei wurden die Sensoren erst charakterisiert, um deren Ansprechverhalten zu einem Standard-pH-Sensor vergleichen zu können. Anschliessend wurden die Sensoren in Kultivierungen eingesetzt.

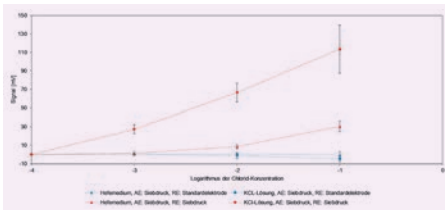


Abb. 1: In diesem Diagramm sind die Signale der Siebdrucksensoren in Abhängigkeit der KCl-Konzentrationen angegeben. Dabei wurden die Messungen einerseits in reinen KCl-Lösungen durchgeführt (Kreise) und in mit KCl aufgestocktem Hefeextraktmedium (Dreiecke). Ausserdem wurde mit unterschiedlichen Referenzelektroden gemessen. Die blauen Messungen sind mit Standardreferenz und die roten mit Siebdruckreferenz durchgeführt worden. In der Legende ist jeweils die Arbeitselektrode (AE) und die Referenzelektrode (RE) angegeben.

Bei der Charakterisierung wurde in reinen pH-Puffern nach einer Einpunktkalibration eine Genauigkeit von 0.13 pH-Einheiten nachgewiesen. Mit einer Zweipunktkalibration könnte dabei eine noch höhere Genauigkeit erreicht werden. Eine Herausforderung der Sensoren zeigte sich beim Einsatz in Salzlösungen (KCl) verschiedener Konzentrationen ( $10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  Mol). Da die Referenzelektrode in direktem Kontakt mit der Messlösung ist, verändert die Chlorid-Ionen-Konzentration das Potential. Da bei Kultivierungen der Ionen-Hintergrund jedoch immer ungefähr gleich bleibt, wurden die Sensoren in Hefe- und CHO-Kultivierungen getestet. Angefangen mit Hefekultivierungen in Spinnerflaschen, zeigte der Sensor der Firma C-Cit Sensors AG zu Beginn einen vergleichbaren Verlauf zum Standardsensor. Nach einiger Zeit bei hoher Zelldichte zeigte der Sensor jedoch Signalschwankungen. Diese Schwankungen traten bei der Kultivierung mit CHO-Zellen nicht auf.



Abb. 2: Versuchsaufbau bei der CHO-Kultivierung. Rechts eine Spinnerflasche mit kombiniertem Sample- und Feedport (kleiner orangefarbener Deckel) und Glucose-Lactat-Sensor und pH-Sensor (kleiner blauer Deckel). Links eine kleine Spinnerflasche mit eingebauter Standardreferenz und mit Glucose-Lactat-Sensor und pH-Sensor.

# Aufbau und Testung eines strikt anaeroben, wellendurchmischten Kultivierungssystems mit Redoxsensoren (vertraulich)



<b>Diplomandin</b>	Lia Rossi
<b>Korrektoren ZHAW</b>	Prof. Dr. Dieter Eibl, MSc Cedric Schirmer, MSc Misha Teale
<b>Korrektorin extern</b>	MSc Fabienne Kurt, PharmaBiome AG

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Firma PharmaBiome AG durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Die Firma PharmaBiome AG hat es sich zur Aufgabe gemacht, Darmbakterien aus gesunden Darmflora zu isolieren, charakterisieren und produzieren. Ziel ist die Etablierung von neuartigen Mikrobiomtherapien zur Behandlung von Darmkrankheiten. Im Rahmen der Bachelorarbeit wurde ein Scale-Up des Bakterienkonsortiums von einem gerührten Sixfors-Fermenter in ein Single-Use-Wave-System durchgeführt. Das üblicherweise für Zellkulturanwendungen konzipierte Wave-System wurde zudem modifiziert, sodass eine strikt anaerobe Kultivierung realisiert werden konnte. Die Modifikation beinhaltete den Einbau einer Redoxsonde sowie eine Möglichkeit, die Inokulation und Probeentnahme unter anaeroben Bedingungen durchzuführen.

# A Novel Strategy to Functionalize Extracellular Vesicles for Targeted Tumor Therapy Based on the Avidin-Biotin System (confidential)



Diplomandin

Besmira Sabani

Korrektor/-innen ZHAW

Dr. Steffi Lehmann, Dr. Ina Albert, Dr. Lukas Neutsch

Extracellular vesicles (EVs) are vesicles enclosed by a lipid bilayer which are released by almost all eukaryotic cells under physiological conditions. Interestingly, it has been shown that the amount of EVs produced by cells increases for cells exposed to stress conditions such as hypoxia. EVs biogenesis can occur by direct budding of vesicles from the plasma membrane or by fusion of multi-vesicular bodies with the plasma membrane. Since the discovery that EVs are involved in intercellular communication and are able to transport functional biological cargo the interest to exploit EVs as therapeutic agents or drug delivery vesicles has rapidly increased. However, EVs as drug shuttles are limited by their targeting specificity, resulting in their accumulation in liver and spleen. Functionalization of EVs for specific targeting hence constitutes an essential step in the development of EVs as drug delivery systems. In this thesis, a novel strategy for flexible EV functionalization based on the avidin-biotin system was assessed. Mouse C51 cells transfected with a hypoxia-inducible factor (HIF) dependent glycosylphosphatidylinositol-avidin (GPI-avidin) expression construct, which drives the expression of avidin on the cell surface, were used as donor cells for the production of EVs. These cells were characterized for their hypoxia and/or HIF dependent GPI-avidin expression by immunofluorescence and biotin stainings. High level of GPI-avidin on the surface of transfected cells were detected after 48 h of

incubation under hypoxic conditions. A protocol was established for EV isolation by means of size exclusion chromatography (SEC) and ultracentrifugation. Isolated EVs from transfected cells showed size range between 30–300 nm which is consistent with current reports from the literature. Isolated EVs were further characterized by nanoparticle tracking analysis (NTA) and scanning electron microscope (SEM). The presence of GPI-avidin on the surface of isolated EVs was demonstrated with biotinylated fluorescent dyes by means of fluorescence measurements using NTA. Overall this thesis shows the feasibility of using EVs from GPI-avidin expressing cells for EV functionalization with biotinylated ligands.

Further details of this work cannot be published for confidentiality reasons.

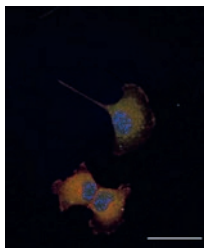


Fig. 1: Immunofluorescence staining with an anti-avidin antibody and alexa-488-anti-rabbit conjugate, combined with alexa-594-biotin and Hoechst 33342. Cells were incubated under hypoxia for 24 h before staining (scale bar 30  $\mu$ m).

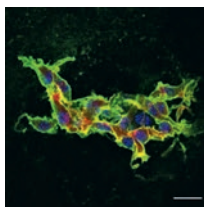


Fig. 2: Immunofluorescence staining with an anti-avidin antibody and alexa-488-anti-rabbit conjugate, combined with alexa-594-biotin and Hoechst 33342. Cells were incubated under hypoxia for 48 h before staining (scale bar 30  $\mu$ m).

# Alkoholdehydrogenase defizienter *E. coli* Stamm



Diplomandin	Anna Scherbel
Korrektorinnen ZHAW	Dr. Christin Peters, Dr. Zrinka Raguz Nakic

Heutzutage werden viele Bulkchemikalien und Feinchemikalien wie pharmazeutische und agrochemische Zwischenverbindungen, Arzneistoffe und Nahrungsmittelbestandteile mittels Biokatalyse aus Aldehyden oder Ketonen gewonnen. Da *E. coli* über eigene endogene Alkoholdehydrogenasen verfügt, entstehen dabei oft Alkohole als unerwünschte Nebenprodukte. In dieser Bachelorarbeit wurden zunächst Biokatalysen mit den beiden *E. coli* Stämmen BL21(DE3) und RARE (reduced aromatic aldehyde reduction) durchgeführt. Als Substrat wurden Citral, Citronellal, Hexenal oder Hexanal, jeweils 5 mM, eingesetzt. Nach 3 sowie 24 Stunden wurden die Substrat- und Produktkonzentrationen mittels Gaschromatographie gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass *E. coli* BL21(DE3) grössere Mengen der jeweiligen Aldehyde zu Alkohol umsetzt als der Alkoholdehydrogenasedefiziente Stamm *E. coli* RARE. Die Citronellalkonzentration nach 24 Stunden Biokatalyse war bei BL21(DE3)  $3.3 \pm 2.0$  mal höher als diejenigen

beim RARE Stamm (Abb. 1). Bei der Biokatalyse mit Hexenal produzierte der BL(21)DE3 Stamm sogar  $10.9 \pm 1.88$  mal mehr Hexanol als *E. coli* RARE (Abb. 2). Als Nächstes wurde versucht, die unerwünschte Reduzierung von Aldehyden im Produktionsstamm BL21(DE3) zu vermindern. Um dies zu erreichen, sollten die beiden Alkoholdehydrogenasen YjgB und YahK vom Genom von *E. coli* BL21(DE3) entfernt werden. Beide Alkoholdehydrogenasen gehören zu den MDR (mittelkettige Dehydrogenase/Reduktase) und scheinen eine entscheidende Rolle zu spielen in der endogenen Fähigkeit von *E. coli*, Aldehyde zu reduzieren. Die beiden Gene sollten mittels homologer Rekombination mit dem *lambda red* System vom Genom deletiert werden. Dazu wurde nach der von Datsenko und Wanner entwickelten Methode vorgegangen. Allerdings war keine der durchgeführten Deletionen erfolgreich. Mögliche Gründe für das Nichtgelingen sowie allfällige Verbesserungsvorschläge sind in der Bachelorarbeit erläutert.

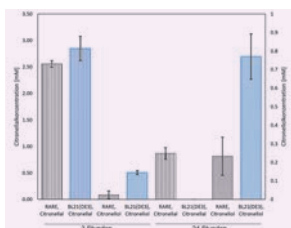


Abb. 1: Ergebnis der Biokatalyse mit Citronellal als Substrat. Längsgestreifte Balken zeigen das Substrat, schräggestreifte den gebildeten Alkohol. Die schwarzen Balken entsprechen

jeweils dem *E. coli* RARE Stamm, die blauen *E. coli* BL21 (DE3). Bei den Fehlerbalken handelt es sich jeweils um die Standardabweichung der Triplikate.

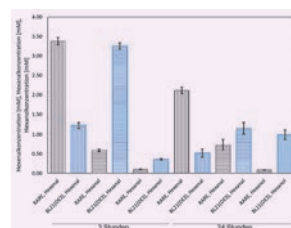


Abb. 2: Ergebnis der Biokatalyse mit Hexenal als Substrat. Längsgestreifte Balken zeigen das Substrat, quergestreifte das Produkt und schräggestreifte den gebildeten Alkohol. Die schwarzen

Balken entsprechen jeweils dem *E. coli* RARE Stamm, die blauen *E. coli* BL21(DE3). Bei den Fehlerbalken handelt es sich jeweils um die Standardabweichung der Triplikate.

# Optimierung einer Halogenase mittels gerichteter Evolution (vertraulich)



<b>Diplomand</b>	Samuel Schneider
<b>Korrektorin ZHAW</b>	Prof. Dr. Rebecca Buller
<b>Korrektorin extern</b>	Dr. Kirsten Schroer, Novartis

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde zusammen mit der Firma Novartis durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Viele der heutzutage verfügbaren Medikamente und Agrochemikalien enthalten Halogenatome in ihrer Struktur. Diese Heteroatome haben einen starken Einfluss auf die Bindungsfähigkeit und können die Verstoffwechslung der Substanzen beeinflussen. Chemische Halogenierungen sind jedoch sterisch schwierig zu kontrollieren, benötigen oft harsche Reaktionsbedingungen und können giftige Abfälle produzieren. Biokatalysatoren ermöglichen es, die Halogenierungen regio- und enantiospezifisch sowie nachhaltiger durchzuführen und bieten so eine attraktive Alternative zu den klassischen chemischen Methoden. Darüber hinaus können Enzymeigenschaften durch gerichtete Evolution verbessert werden, so können etwa die katalytische Aktivität und die Regio- oder Stereoselektivität von Enzymen für industrielle Bedürfnisse optimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängige Halogenase untersucht und optimiert. Dieses Enzym ist in der Lage, kleine Moleküle zu halogenieren und ist somit von grossem synthetischem Interesse. Ziel dieser Arbeit war es, bei der gerichteten Evolution zur Verbesserung der katalytischen Aktivität der Halogenase mitzuwirken, indem bereits identifizierte, vorteilhafte Mutationen durch die Technik des DNA-Shufflings kombiniert wer-

den sollten. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine kombinatorische Enzym-Bibliothek entwickelt, in der das Halogenase-Gen mittels PCR aus mehreren Fragmenten zusammengesetzt wurde, welche entweder Wildtyp oder mutierte Codons enthielten. Die resultierende Enzym-Bibliothek wurde dann auf ihre katalytische Aktivität hin überprüft und es konnte eine Enzymvariante identifiziert werden, die eine zweifach höhere Chlorierungsaktivität als die vorhergehend beste Variante besass.

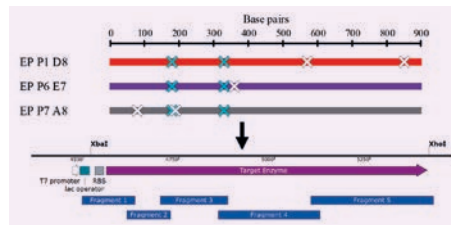


Abb. 1: Entwicklung einer kombinatorischen Enzym-Bibliothek durch die PCR-basierte Konstruktion des Halogenase-Gens aus mehreren designierten DNA-Fragmenten.

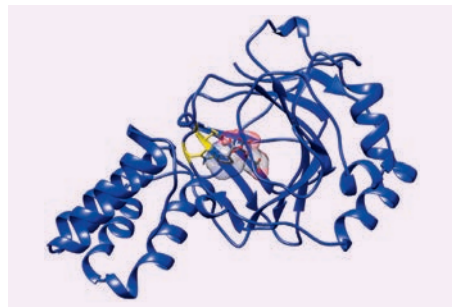


Abb. 2: Homologie-Modell des entwickelten Enzyms. Das Metallbindungsnetzwerk der aktiven Tasche ist gelb eingefärbt.

# Optimierung der Expression und Herstellung einer Glukose- und Formiatdehydrogenase



Diplomandin	Sandra Steiner
Korrektor/-in ZHAW	Dr. Christin Peters, Dr. Lukas Neutsch

In der Natur werden Cofaktoren als Teil des Zellstoffwechsels synthetisiert und später regeneriert. In grosstechnischen Biokatalysen können Cofaktoren aus Kostengründen nicht stöchiometrisch eingesetzt werden. Sie müssen mit Hilfe eines zweiten Enzymes recycelt werden. Die Glukose- und die Formiatdehydrogenase katalysieren die Oxidation von Glukose beziehungsweise Formiat unter Reduktion von  $\text{NAD(P)}^+$  und eignen sich daher für das enzymatische Recycling der Cofaktoren NADH und NADPH. Um solche Recycling-Enzyme für biokatalytische Prozesse zur Verfügung zu stellen, wurden in dieser Bachelorarbeit die Glukose- und die Formiatdehydrogenase rekombinant in *E. coli* exprimiert und auf ihre Aktivität geprüft. Nach einer Expressionsoptimierung beider Enzyme konnte die Formiatdehydrogenase aus dem Ursprungsorganismus *Candida boidinii* einzig bei der Expressionstemperatur von 20 °C mit einer geringen Aktivität von 0.06 U mL<sup>-1</sup> exprimiert werden. Im Gegensatz dazu wies die GDH hohe Aktivitäten im Schüttelkolben

auf. Die beste Ausbeute an aktiver Glukosedehydrogenase aus dem Ursprungsorganismus *Bacillus subtilis* resultierten bei der Kultivierung im Minimalmedium R/2<sub>Glycerin</sub> bei einer Expressionstemperatur von 25 °C und einem pH-Wert von 7. Im anschliessenden Upscale vom Schüttelkolben über den 5 L Reaktor zum 30 L-Masstab konnte die Aktivität um das Doppelte gesteigert werden. In der 5 L-Batch-Fermentation konnte bei der Umsetzung von NAD<sup>+</sup> ein Maximalwert von 117.7 U mL<sup>-1</sup> erreicht werden. Bei der Charakterisierung des Enzymrohextraktes wurde ein pH-Optimum von 7.0 und ein Temperaturoptimum von 20–40 °C ermittelt. Untersuchungen zeigten, dass nach einer Inkubationszeit von 40 h bei Temperaturen zwischen 20–40 °C noch eine Aktivität von >75 % festgestellt werden konnte. Die Gruppe der Biosystemtechnologie verfügt nun über eine einsatzbereite Glukosedehydrogenase für das Recycling der Cofaktoren NADH und NADPH in biokatalytischen Prozessen.

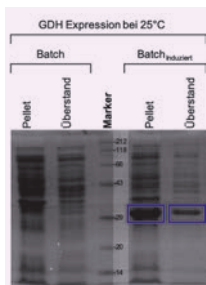


Abb. 1: SDS-Gel mit Proben der GDH (28.2 kDa), induziert mit IPTG (0.1 M) exprimiert in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen im 5 L Masstab.

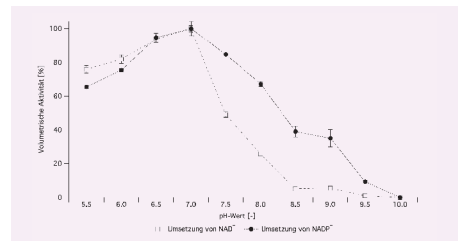


Abb. 2: pH-Profil der Glukosedehydrogenase mit Davis-Puffer im Bereich von pH 5.5–10. Die Messung erfolgte bei 25 °C und einer Inkubation von 15 min.

# Optimierung eines Prozesses zur Vermehrung des Pilzes *M. brunneum* (vertraulich)



Diplomand	Joel Stocker
Korrektoren/-in ZHAW	Prof. Dr. Dieter Eibl, Dr. Iris Poggendorf, BSc Yannick Senn

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Aufgrund der negativen Auswirkung der chemischen Pestizide auf die Umwelt gewinnt die biologische Schädlingsbekämpfung immer mehr an Bedeutung. Zum Beispiel die Resistenzentwicklung der Schädlinge, die unspezifische Wirkung gegenüber Nützlingen, Residuen im Trinkwasser und Lebensmittel sowie die Toxizität für Hersteller und Anwender gehören zu den Negativmerkmalen der chemischen Pestizide. Das Bedürfnis nach sicheren und biologisch hergestellten Schädlingsbekämpfungsmitteln ist gross. Eine Vielzahl von Organismen bietet sich für den Zweck als biologisches Pestizid an, wobei entomopathogene Pilze als besonders interessant gelten. Einer der am meisten kommerziell eingesetzten Pilzgattungen ist *Metarhizium brunneum*, welcher in dieser Arbeit verwendet wird. Der Pilz wird ausgehend von einer Sporenlösung in zwei Schritten, in einem sogenannten Zwei-Phasensystem, kultiviert. In einem ersten Schritt

findet eine Flüssigkultur statt, welche in einem zweiten Schritt als Inokulum für eine Feststofffermentation dient. Ziel dieser Bachelorarbeit war die Optimierung der Sporenzahl nach der Feststofffermentation. Deshalb wurden verschiedene Parameter und Mediumsbestandteile in der Vorkultur verändert und kultiviert. Nach der Feststofffermentation war die Lagerung der Pilzgerste ohne Sporenanzahlverlust das Ziel. Aus diesem Grund wurde eine Trocknung ausgearbeitet, in der verschiedene Methoden mit Unterdruck und Begasen durchgeführt wurden. Zusätzlich wurde für eine erfolgreiche Skalierbarkeit ein Scale-up im Pilotmassstab durchgeführt.



Abb. 1: Toter Insektenkadaver mit Konidien von *M. brunneum* überzogen.



# Observation of Optimal Maturation of hiPSC Derived Cardiomyocytes



<b>Diplomand</b>	Jaan Strang
<b>Korrektorin ZHAW</b>	Prof. Dr. Regine Eibl-Schindler
<b>Korrektor extern</b>	Dr. Bramasta Nugraha, Institute for Regenerative Medicine (IREM)

Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) have the ability to differentiate into any human cell. The applications for differentiated hiPSCs such as cardiac tissue cardiomyocytes (CMs) range from patient-specific disease modelling to drug screening and personalized transplantation therapies. Efficient differentiation and maturity of CMs are major factors affecting test results and it is therefore of great importance to obtain reproducible mature cardiac tissue. In 2014, Burrigge and colleagues provided a protocol for the differentiation of hiPSCs into cardiomyocytes showing that is crucial to achieve this on a larger scale and to induce the development of fetal-like cardiomyocytes to meet the market demands.

A therefore developed method allows the formation of hiPSC microtissues at large quantity in an automated system. The latter are then differentiated into CMs over 16 days. Since freshly differentiated CMs lack important properties of adult cardiomyocytes (such as high calcium activity and ensuing strong contractility) the focus of this thesis was to enhance CMs development to form an adult-like phenotype. For this purpose, a biochemical and an electromechanical approach set the basis for further optimization of the maturation process (Figure 1). The results obtained in the study confirm partial CMs maturation, such as sarcomere formation, T-tubule generation (Figure 2), improved calcium activity and an enhanced beating regularity, for the biochemical co-culture maturation strategy. Electro-

mechanical maturation also leads to T-tubule generation, improved calcium activity and a regular beats per minute pattern. Despite the improved CMs maturation at large scale, there remains vast unexploited potential in the studied field.

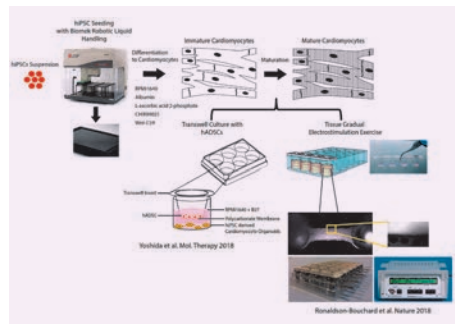


Fig. 1: Illustration of the automated hiPSCs organoid formation with subsequent differentiation into fetal-like hiPSCs-CMs organoids. Further, the two maturation methods used to obtain enhanced maturation of fetal-like CMs to adult CMs are shown. In the first method, CMs organoids are matured in co-culture with hMSCs via soluble factor (growth factors, growth hormones & exosomes) release of the latter. The second maturation method uses electro-mechanical stimulation to exercise the CMs organoids which imitates the cardiac load and mechanical stimulation of the heart.

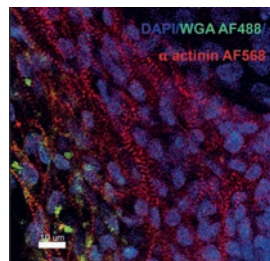


Fig. 2: Immunofluorescence image of hiPSC-CM matured for 14 days in co-culture showing characteristic hallmarks of adult cardiomyocytes: formation of sarcomere structures (red) and generation of a T-tubule system (green).

# Kultivierungen zur Evaluierung eines neuartigen Bioreaktors (vertraulich)



Diplomand	Arburon Sulja
Korrektoren ZHAW	Prof. Dr. Dieter Eibl, MSc Cedric Schirmer

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Heutzutage wird in biotechnologischen Produktionsstätten für die Kultivierung von Mikroorganismen oder Zellen mit gerührten Bioreaktoren verfahren. Dabei stellen magnetgerührte Bioreaktoren ein neuartiges und vielversprechendes Reaktorsystem für die Kultivierung von Mikroorganismen und für die Zellkultivierung dar. Durch den kontaktlosen Antrieb und das freischwebende Rührorgan können Kontaminationen reduziert und Reinigungen erleichtert werden. Bevor aber ein Bioreaktor für die Produktion in Betrieb genommen wird, muss der Reaktor verfahrenstechnisch charakterisiert werden. Für die Charakterisierung werden die Kenngrößen wie der spezifische Leistungseintrag, die Mischzeit und der volumenbezogene Sauerstoffübergangskoeffizient bestimmt. Die biologische Charakterisierung, welche ein Kultivierungsverfahren mit dem Modellorganismus *E. coli* miteinbezieht, ergänzt die herkömmlichen Messmethoden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuartiger, magnetgerührter Bioreaktor (Abbildung 1) mit und ohne einen Strombrecher für die mikrobielle Kultivierung mittels der beiden beschrie-

benen Methoden charakterisiert. Anhand der erhaltenen Ergebnisse aus der verfahrenstechnischen Charakterisierung wurden Kultivierungsparameter für mikrobielle Batch-Kultivierungen abgeleitet. Die Resultate zeigen, dass sich das System in beiden Konfigurationen für die mikrobielle Kultivierung eignet.

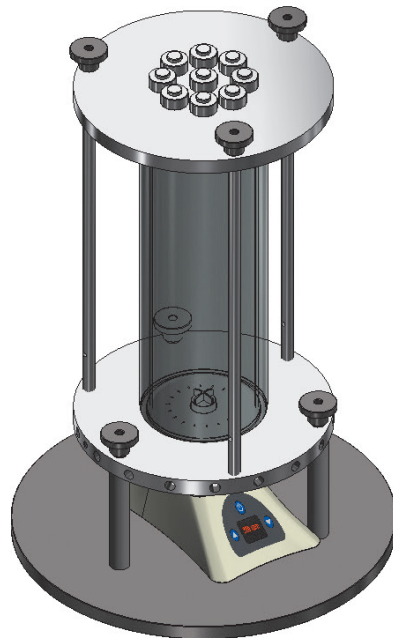


Abb. 1: 0.6 L magnetgerührter Bioreaktor.

# Rekombinante Herstellung des *Prune Dwarf Virus* Hüllproteins (vertraulich)



<b>Diplomand</b>	Livio Tasselli
<b>Korrektor ZHAW</b>	Prof. Dr. Martin Sievers
<b>Korrektorin extern</b>	Dr. Denise Altenbach, BIOREBA AG

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Firma BIOREBA AG durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Das Prune Dwarf Virus (PDV) ist ein weltweit vorkommender, pflanzenpathogener Virus, welcher Pflanzen der Prunus-Arten (Pflaumen-, Sauerkirsch- und Süskirschbäume, Aprikosen, Pfirsiche etc.) befällt. Die Firma Bioreba AG in Reinach BL ist darauf spezialisiert, Kits für die Diagnostik von pflanzenpathogenen Mikroorganismen (Double Antibody Sandwich ELISA und Streifentests) zu entwickeln. In Zusammenarbeit mit der Firma Bioreba AG soll ein bereits bestehendes «DAS-ELISA Kit» optimiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Prune Dwarf Virus Coat Protein (PDVC) rekombinant in *Spodoptera frugiperda* und *Escherichia coli* an der ZHAW in Wädenswil hergestellt werden. Dazu wurde die PDVC-Sequenz einerseits in den pFastBac1 Vektor für die Sf9-Insektenzellen, und andererseits in den pRSETA Vektor für *E. coli* BL21 DE3 kloniert. Damit das PDVC mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnte, wurde bei den Sf9-Insektenzellen ein GST-Tag und bei *E. coli* BL21 DE3 ein His-Tag am N-Terminus des PDVC angehängt. Nach der Aufreinigung wurde der GST-Tag durch die EKMax Enterokinase und der His-Tag durch den Faktor Xa abgeschnitten.

Über eine «Size Exclusion Chromatographie» (Gelfiltration) wurde das PDVC vom geschnittenen Tag und der Protease getrennt. Die erhaltenen Proben (mit und ohne Tag) wurden am Schluss der Bachelorarbeit erfolgreich bei der Firma Bioreba AG in Reinach BL im «DAS-ELISA» getestet. Die rekombinante Herstellung des PDVC-Antigens wurde erreicht und die gewonnenen Proben aus dieser Arbeit dienen als Grundlage für die Weiterentwicklung des diagnostischen Nachweises des Prune Dwarf Virus bei der Firma Bioreba AG.

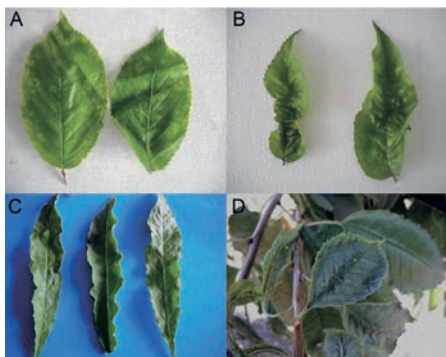


Abb. 1: (A) Zeigt die chlorotischen Ringe auf den Blättern. (B) Deformierte und runzlige Blätter. (C) Langgewachsene Blätter. (D) Ausbildung von Zacken an den Blatträndern (Öztürk & Çevik, 2015). (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356604/>)

# Herstellung von «Mock Communities» als Standards für Mikrobiomanalysen (vertraulich)



Diplomandin	Tharsika Tharmakulasingam
Korrektoren ZHAW	Prof. Dr. Martin Sievers, Dr. Gottfried Dasen

Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst. Mittels Mikrobiomanalysen können Erkenntnisse über die Biodiversität der mikrobiellen Flora verschiedener Habitats gewonnen werden. Die Durchführung dieser Analysen erfolgt aktuell mittels Next-Generation Sequenzierung (NGS). Ein wesentlicher und oft vernachlässigter Teil dieser Analysen ist die Verwendung geeigneter Qualitätskontrollen, wie z. B. das Mitführen von Positiv- und Negativ-Kontrollen. Als Positiv-Kontrolle können sogenannte «Mock Communities» eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um definierte Mischungen aus Mikroorganismen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Mock Communities als Standards für die Untersuchung des Hautmikrobioms zu entwickeln. Basierend auf 5 Bakterienarten (*Staphylococcus aureus* CCOS1251, *Staphylococcus epidermidis* CCOS1266, *Micrococcus luteus* CCOS1254, *Acinetobacter ursingii* CCOS1256 und *Bacillus cereus* CCOS1257) sollten 2 unterschiedliche Mock Community Standards hergestellt werden: 1 Standard basierend auf Mischungen dieser Kulturen mit definierten Zellzahlen und ein weiterer Standard basierend auf ihrer DNA. Die Herstellung des zellbasierten Standards erfolgte mit Hilfe eines Coulter Counters. Für den DNA-basierten Standard wurde mittels realtime PCR die DNA-Konzentration der 16S rRNA für jede Kultur bestimmt. Für den DNA-Mock Community Standard wurde die DNAs der einzelnen Kulturen so gemischt,

dass alle die gleiche Kopienzahl aufwiesen. Sowohl der zellbasierte Mock Community Standard als auch der DNA-basierte Standard konnten erfolgreich hergestellt werden. Für den DNA-basierten Standard konnte eine reproduzierbare Methode etabliert werden, die Ergebnisse sind in den Abb. 1 bis 2 dargestellt. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erlauben es, DNA- und zellbasierte Standards für Mikrobiomanalysen schnell und reproduzierbar herzustellen.

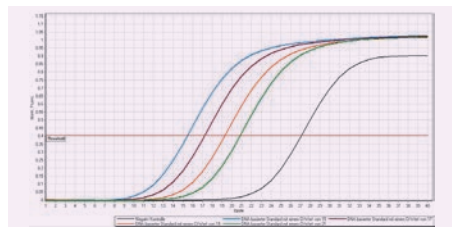


Abb. 1: Amplifikationskurve der 16S rRNA V4 qPCR zur Herstellung des DNA Mock Community Standards. Die Fluoreszenzsignale sind in Abhängigkeit der Zyklus-Zahl einer qPCR-Analyse aufgetragen. Zu sehen sind die amplifizierten Proben der hergestellten DNA-Standards mit unterschiedlich eingestellten Zyklus-Zahlen. Dazu wurden Zyklus-Zahlen von 15, 17, 19 und 21 gewählt. Die Negativ-Kontrolle ist die schwarze Kurve.

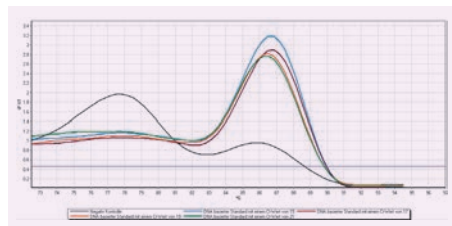


Abb. 2: Schmelzkurvenanalyse der qPCR aus Abb. 1.

# Prozessoptimierung und GMP-Zertifizierung bei der Herstellung von Filtermedien (vertraulich)



Diplomandin	Laavanneya Tharmalingam
Korrektor ZHAW	Dr. Jürgen Ebert
Korrektor extern	Dr. Christoph Jansen, Mettler-Toledo (Schweiz) GmbH

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit einem Industriepartner in der Ostschweiz durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

In der Chemie, aber auch im Pharmabereich, in der Biotechnologie und in der Getränke- und Nahrungsmittelindustrie ist die Fest-Flüssig-Trennung ein wichtiger Prozessschritt. Für die Durchführung der Filtration werden u. a. keimreduzierende bzw. sterilfiltrierende Membranfilter oder Tiefenfilterschichten verwendet. Die Prozesskontrolle bei der Herstellung und die Charakterisierung der Filtermedien bei der Wareneindkontrolle erfolgt in Abhängigkeit von der Porengrösse mit verschiedenen Bakterien. In diesem Projekt wurde zur Überprüfung der Qualität die Retention von *Serratia marcescens* gemessen und der sogenannte LRV Wert (logarithmic reduction value) berechnet. Dieser Wert gibt an, um welchen logarithmischen Faktor die Bakterien durch die Filtration reduziert werden. Die bislang vom Industriepartner angewendete Auswertemethode mittels Bebrütung nach der Testfiltration und optischer Kontrolle wurde mit zwei neuen Methoden (1 und 2) auf der Basis von Einzelzellnachweisen bzw.

Mikrokolonien mittels Gensonden und Fluoreszenzmikroskopie verglichen. Die bisherige Methode ist zwar sehr zuverlässig, aber auch zeitaufwändig. Nach der Bebrütung sind die Kolonien durch ihre intensive Rotfärbung sehr gut von Auge erkennbar. Die Dauer bis zum Vorliegen der Ergebnisse beträgt zwischen 24 und 48 Stunden. Dieser Zeitaufwand verursacht zusätzliche Kosten für das Quarantänelager. Mit den beiden neuen Methoden ist die Qualitätskontrolle der Filtermedien innerhalb von 3 h (Einzelzelle) bis 5 h (Mikrokolonie) nach dem Musterzug und der Testfiltration abgeschlossen. Für die Auswertung sind einmalig die Anschaffung eines Fluoreszenzmikroskops bzw. konfokalen Mikroskops sowie die Umstellung auf das Gensonden-Kit notwendig. Im Rahmen des Projektes wurde eine Kostenabschätzung zwischen den drei Methoden unter Berücksichtigung der Investitionen, Lagerkosten sowie laufenden Personal- und Materialkosten durchgeführt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für den Industriepartner eine Umstellung auf die Auswertung von Einzelzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie eine schnellere Qualitätskontrolle und Einsparung von Ressourcen ermöglichen würde.

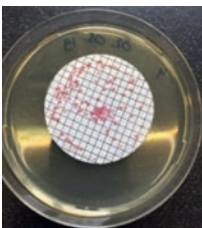


Abb. 1: Optische Auswertung der *Serratia marcescens* Kolonien.

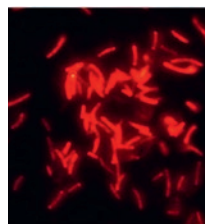


Abb. 2: Mikroskopische Auswertung der Einzelzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

# Development of metabolic activation with bioassays on thin-layer chromatography plates for the detection of pro-estrogenic chemicals



<b>Diplomandin</b>	Alissa Helena Tophinke
<b>Korrektorinnen ZHAW</b>	MSc Lona Mosberger, Dipl. Biologielaborantin Katharina Schmid Lüdi
<b>Korrektor extern</b>	Dr. Alan Bergmann, Aquatic Science and Technology (EAWAG)

Das Vorhandensein hormonaktiver Stoffe in Gewässern ist weltweit zu einem Problem geworden. Xenooestrogene und ihre Metaboliten können negative Auswirkungen auf die Fortpflanzung und erhöhte Häufigkeit bestimmter Krebsarten verursachen. Zur Beurteilung der Östrogen Aktivität ist z. B. der lyticase Yeast-estrogen-screen (L-YES) bekannt. Dieser kann mit Dünnschichtchromatographie (HPTLC) kombiniert werden, um einzelne Chemikalien aufzutrennen (planar-YES). Dabei wird jedoch der Metabolismus im Körper nicht berücksichtigt. Denn die Biotransformation produziert Metaboliten, die möglicherweise aktiver sind als ihre Ausgangsverbindung. Deswegen wurde eine Methode entwickelt, die neben dem planar-YES oder L-YES eine Leber simuliert, um Pro-Östrogene zu erkennen.

Für die Entwicklung der Methode wurden zuerst Chemikalien (Standards), die erwartungsgemäss Pro-Östrogene sind, untersucht. Danach konnten unterschiedliche Wasserproben und Lebensmittelverpackungen analysiert werden. Für den Metabolisierungsschritt wurde eine S9-Fraktion verwendet, die verschiedenste Leberenzyme enthält und für *in vitro* assays geeignet ist. Die Proben wurden ohne und mit Metabolisierungsschritt, mit Methoxychlor-Spiking und mit denaturierter S9 verglichen.

Die HPTLC-Platten zeigten deutlich unterschiedliche Fluoreszenz-Muster mit und ohne Metabolismus (S9). Methoxychlor (Standard)

wurde klar in sein Stoffwechselprodukt HPTE umgewandelt und deshalb als Positivkontrolle verwendet. Aktivität wurde bei Oberflächenwasser, bei einer Lebensmittelverpackung und bei Abwasserproben bereits ohne S9 entdeckt. Der Vergleich der De- oder Aktivierung von Chemikalien in Proben mit S9-Vorinkubation werden in dieser Arbeit vorgestellt. In den meisten Fällen wurde mit S9 eine Deaktivierung der nativen Östrogenität beobachtet. Trotzdem wurden Stoffe beobachtet, die allenfalls als Pro-Östrogene wirken könnten. Eine chemische Analyse dieser Stoffe könnte diese Aussage bestätigen und auf die Wichtigkeit des Metabolismus zur Einstufung des Risikos hinweisen. Für zukünftige Untersuchungen könnte diese entwickelte Methode auch auf andere toxische Endpunkte angewendet werden.

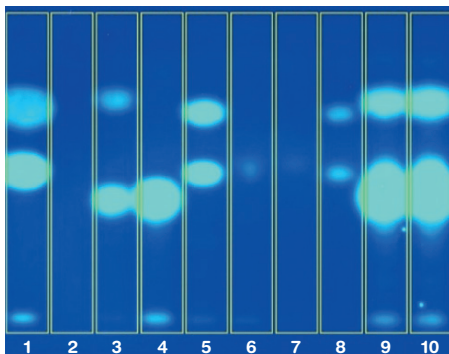


Abb. 1: **HPTLC-Platte der Abwasserprobe:** Durch den Bioassay werden Östrogene auf der Platte erkennbar. 1) E1, E2 und EE2; 2) Ethanol; 3) Methoxychlor mit S9; 4) HPTE; 5) Probe ohne S9; 6+7) Probe mit S9; 8) Probe mit denaturierter S9; 9+10) Probe gespiked mit Methoxychlor.

# Fermentation und Reinigung der Taq-Polymerase



<b>Diplomandin</b>	Deniz Türkcan
<b>Korrektorinnen ZHAW</b>	Dr. Christin Peters, Dr. Zrinka Raguz Nakic

DNA-Polymerasen sind an der Replikation, Reparatur und Rekombination von DNA beteiligt. Zentral ist die Anwendung von DNA-Polymerasen in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Seit der Entdeckung der PCR stellt die thermostabile Taq-Polymerase eines der wichtigsten Werkzeuge dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Taq-Polymerase rekombinant hergestellt und anschliessend durch verschiedene Protokolle aus der Literatur gereinigt (Chen et al., 2015; Engelke et. al. 1990; Turan und Eken, 2018; Zheng, 2011; Fang et. al. 2016).

Das Enzym konnte erfolgreich in *Escherichia coli* exprimiert werden. Für die Etablierung der verschiedenen Reinigungsprotokolle wurden das Ausbeutevolumen, die Aktivität in der PCR, der Zeitfaktor, die Proteinkonzentration, die Kosten und das Reaktionsvolumen miteinander verglichen.

Das Protokoll nach Chen et. al. zeigte eine der besten Ausbeutevolumen, war insgesamt das am schnellsten durchzuführende Protokoll, eines der günstigsten Protokolle und hatte ein moderates Reaktionsvolumen. Die Reinigung nach Turan und Eken zeigte das geringste Ausbeutevolumen der Taq-Polymerase und verursacht hohe Kosten. Wenn man jedoch den zeitlichen Faktor bedenkt, ist das Protokoll innerhalb eines Tages durchführbar, was wiederum positiv ist. Die Reinigung nach

Protokoll Engelke et. al. musste abgebrochen werden, da die Taq-Polymerase nicht mehr nachweisbar war. Die Reinigung der Taq-Polymerase nach Fang et. al. zeigte eine hohe Ausbeute, gutes Reaktionsvolumen, jedoch hohe Kosten. Aufgrund der Dauer der Dialyse ist der Zeitfaktor bei diesem Protokoll und bei der Reinigung nach Zheng am grössten. Bei der Reinigung nach Zheng konnten ein angemessenes Ausbeutevolumen und Kosten gefunden werden. Das Reaktionsvolumen aus dieser Reinigung war sehr gut.

Schlussendlich wurde ein Upscale auf 5 L durchgeführt und das gewählte Reinigungsverfahren nach Zheng darauf angewendet. Daraus resultierte ein Volumen von 60 mL Taq-Polymerase mit einem sehr grossen Reaktionsvolumen.

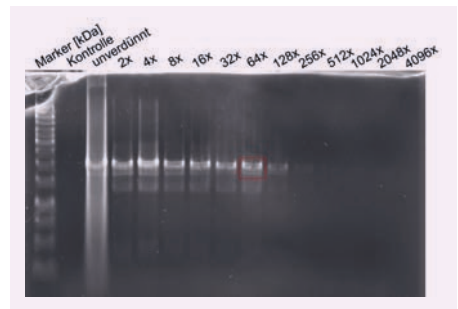


Abb. 1: Agarosegel. Amplifizierte PCR-Produkte der nach Zheng hergestellten Taq-Polymerase nach verschiedenen Verdünnungen sind aufgetragen.

# Untersuchungen zur Expansion von mesenchymalen Stammzellen im PBS mini (vertraulich)



Diplomandin	Selina Urech
Korrektor/-in ZHAW	MSc Valentin Jossen, Prof. Dr. Regine Eibl-Schindler

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Stammzellen werden heutzutage zur Behandlung von zahlreichen menschlichen Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes und Arthritis, als Bestandteil der regenerativen Medizin eingesetzt. Dabei besteht allerdings die Problematik, dass für eine effektive Stammzell-Therapie Dosen von mehreren Millionen Zellen notwendig sind. Demzufolge sind schnelle und effiziente Zellexpansionsverfahren von essentieller Bedeutung.

In dieser Arbeit erfolgten Expansionsversuche mit humanen, mesenchymalen Fettstammzellen in den PBS mini Bioreaktoren (im 0.1 MAG sowie im 0.5 MAG Modell). Dabei wurde zunächst eine verfahrenstechnische Charakterisierung der PBS mini Reaktoren durchgeführt. Die PBS mini Reaktoren, welche für maximale Arbeitsvolumina von 100 und 500 mL geeignet sind, können für die Kultivierung von schersensitiven sowie adherent-wachsende Zellen verwendet werden. Bei den verfahrenstechnischen Untersuchungen dieser Reaktoren erfolgten Suspensionsuntersuchungen (Bestimmung von Ns1u und Ns1) mit polystyren-basierten Microcarrier wie auch Mischzeitmessungen. Die Resultate dieser Untersuchungen wurden zur Berechnung von verfahrenstechnischen Parametern wie Leistungseinträge und Reynoldszahlen ver-

wendet. Basierend auf dieser verfahrenstechnischen Charakterisierung erfolgten Expansionsversuche in den PBS mini Reaktoren. Die durchgeführten Versuche zeigten auf, dass die Probenahme in den PBS mini Reaktoren Optimierungsbedarf hat, da diese zu Streuungen bei den gemessenen Zelldichten führte und somit grosse Standardabweichungen bei den Resultaten berechnet wurden. Des Weiteren wurden Erkenntnisse gewonnen bezüglich der Zelladhärenz auf den Microcarrier. Es wurden lediglich 2 Millionen Zellen in den PBS mini Reaktoren generiert, was auf die niedrigen Zelladhärenzen zurückzuführen war. Als nächster Schritt des Expansionsverfahrens sollte die Probenahme sowie die Adhärenzphase der Zellen auf den Microcarrier optimiert werden.



Abb. 1: Die beiden Modelle der PBS mini Bioreaktorsysteme. Quelle: PBS mini Bioreactor System, (2014). PBS Biotech Inc. Verfügbar unter: <https://www.pbsbiotech.com/pbs-mini.html>.

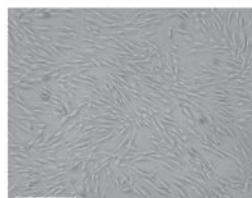


Abb. 2: Mikroskopische Aufnahme der ASC52telo Zellen.



# Photodynamische Therapie bei Hautkrebskrankungen (vertraulich)



<b>Diplomandin</b>	Letizia Waltenspül
<b>Korrektorinnen ZHAW</b>	Dr. Ina Albert, Dr. Steffi Lehmann
<b>Korrektor extern</b>	vertraulich

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Die Photodynamische Therapie (PDT) ist eine Therapieform zur Behandlung von Krebs und beruht auf einer photochemischen Reaktion zwischen einem Photosensibilisator (PS), Licht mit einer spezifischen Wellenlänge und Gewebesauerstoff. Durch die Anreicherung des PS im Gewebe und einer Aktivierung des PS durch Licht, entsteht eine Interaktion mit Gewebesauerstoff, so dass reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden. Diese Verbindungen können die Zellen schädigen und Apoptose oder Nekrose induzieren. Die PDT wird mittlerweile in der Therapie von Hautkrebskrankungen eingesetzt. Dabei wird ein PS auf die entsprechende Hautläsion appliziert, wobei anschliessend eine definierte Lichtbestrahlung der Haut erfolgt. Dieses Verfahren ist allerdings mit einigen Nachteilen verbunden. Während der Lichtbestrahlungen können Nebenwirkungen wie Hautrötungen und Schmerzen auftreten. Weiterhin müssen die Patienten in der Arztpraxis bleiben, um die Therapie durchführen zu können.

Ziel dieses Projektes ist es, eine neue dermatologische Formulierung zu entwickeln. Dabei soll ein PS gefunden werden, bei dem deutlich weniger Nebenwirkungen auftreten und bei dem eine Bestrahlung mit dem natürlichen Sonnenlicht möglich ist. In dieser Bachelorarbeit wurden daher *in vitro* Testmethoden etabliert, mit denen die PDT simuliert werden kann.

# Transfer und Scale-up einer CHO-Zelllinie zur IgG-Produktion (vertraulich)



<b>Diplomandin</b>	Martina Wechsler
<b>Korrektoren/-in ZHAW</b>	Prof. Dr. Dieter Eibl, Prof. Dr. Regine Eibl-Schindler, MSc Misha Teale

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Es wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Monoklonale Antikörper nehmen auf dem heutigen Markt für biopharmazeutische Produkte einen wichtigen Stellenwert ein. CHO-Zellen repräsentieren hierbei aufgrund der posttranslationalen Modifikation bevorzugte Produktionsorganismen. Das Ziel der Bachelorarbeit bestand darin, eine CHO-Zelllinie zur Produktion von IgG zu etablieren und Wachstums- und Produktionsversuche (Batch-Modus) im Schüttelkolben und wellendurchmischten Bioreaktor durchzuführen. Ausgehend von der Kryokultur wurde zunächst eine SOP zur Erhaltungskultivierung im Schüttelkolben erarbeitet. In weiteren Experimenten erfolgte die Aufzeichnung der Wachstums- und Produktionscharakteristik im 500 mL Schüttelkolben. Als Glutaminquelle diente hierbei GlutaMAX<sup>TM</sup> Supplement. Die CHO-Zelllinie wuchs im Schüttelkolben auf eine maximale Lebendzelldichte von  $18.6 \times 10^6$  Zellen mL<sup>-1</sup>. In der Versuchsreihe wurde eine maximale IgG-Konzentration von 371 mg L<sup>-1</sup> erzielt. Im wellendurchmischten Bioreaktor BIOSTAT<sup>®</sup>

CultiBag RM mit einem Flexsafe<sup>®</sup> RM 2L optical Bag waren die maximale Lebendzelldichte und IgG-Konzentration um 49.5 % respektive 34 % tiefer als im Schüttelkolben. Nachfolgende Untersuchungen beschäftigen sich mit der Prozessoptimierung im Batch- und Feeding-Modus.

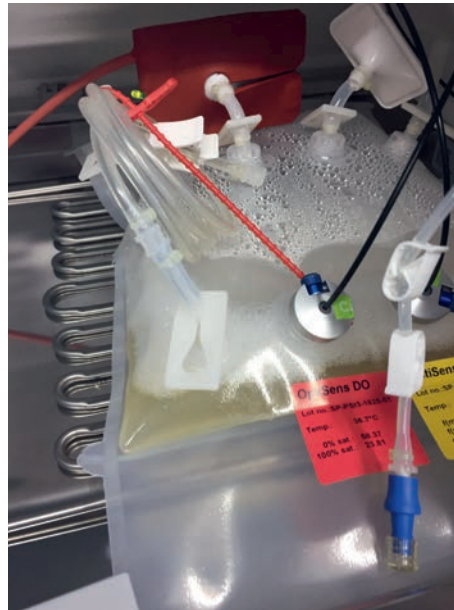


Abb. 1: Batch-Kultivierung der CHO-Zelllinie im Flexsafe<sup>®</sup> RM 2L optical Bag mit einem Arbeitsvolumen von 1 L.

# Optimierte Identitätsprüfung von Medicinalpflanzen der Ph. Eur. mittels HPTLC und HPTLC-MALDI TOF MS Kopplung



Diplomandin	Romina Willi
Korrektor/-in ZHAW	Dr. Evelyn Wolfram, Dipl. Chemiker (FH) Samuel Peter

Flavonoide und Phenolcarbonsäuren sind weit verbreitete Sekundärmetaboliten in Pflanzen. Aufgrund der für die Pflanzenarten charakteristischen Zusammensetzung wird die Flavonoidanalyse zur botanischen Unterscheidung von Pflanzenarten und zur Identitätsprüfung bei Medicinalpflanzen eingesetzt. Die Methoden basieren auf TLC oder HPTLC und sind im europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) vorgeschrieben.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit der chromatographischen Auftrennung werden die Untersuchungsmethoden in den Pflanzenmonographien der Europäischen Pharmakopöe überarbeitet und standardisiert.

In dieser Arbeit wurden die Monographien von *Althaeae folium* und *Malvae folium* hinsichtlich deren HPTLC-Vorgaben untersucht und Beispielchromatogramme für die *Knowledge Database* angefertigt.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Kopplung von HPTLC mit MALDI-TOF zur massenspektrometrischen Untersuchung erforscht. Dabei zeigte sich, dass vor allem die Dauer zwischen der Plattenanfertigung und der MALDI-TOF MS Messung sowie die Vorwaschung der Aluminiumplatten und die optimale Funktionstüchtigkeit des DE-SAGA-Gerätes eine grosse Rolle spielen.

Anhand der Messungen mit MALDI-TOF MS konnten einige Aussagen zu den Inhaltsstoffen der beiden untersuchten Medicinalpflanzen gemacht werden. Durch die Kopplung

der beiden Messverfahren konnten zum einen durch die HPTLC Aussagen aufgrund der fluoreszierenden Farbe sowie der  $R_F$  Werte gemacht werden und dank des MALDI-TOF MS zu den Massenspektren mit den dazugehörigen Fragmenten und Aglykas der vermuteten Substanzen. Anhand dieser Informationen konnten sogar einige Vermutungen zu noch unbekanntem Inhaltsstoffen gemacht werden.

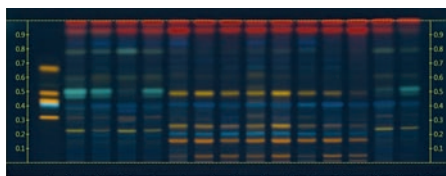


Abb. 1: HPTLC-Platte bei UV 366 nm nach NP/PEG, wobei in der Bahn 1 die Referenzsubstanzen, in den Bahnen 2–5, 14, 15 die Eibischblätter und in den Bahnen 6–13 die Malvenblätter zu sehen sind.

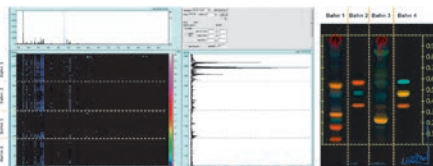


Abb. 2: Links ist die Ansicht der MALDI-TOF MS Messung zu erkennen, wobei oben das MS-Spektrum bei einem definierten  $R_F$ -Wert, rechts das Chromatogramm bei definiertem  $m/z$ , links-unten der Counter-Plot, wobei  $R_F$ -Werte gegen  $m/z$  aufgetragen sind und die z-Achse der Intensität (Farbe) entspricht, zu erkennen. Rechts ist die Vergleichsplatte mit NP/PEG derivatisiert ersichtlich.

# Physiologie-basierte Prozesskontrolle in Mikroalgenkulturen über automatisierte Analyse-systeme (vertraulich)



Diplomand	Thierry Wüthrich
Korrektor/-in ZHAW	Dr. Lukas Neutsch, Dr. Roberta Carpine

Das beschriebene Projekt steht unter Geheimhaltungspflicht. Aus Gründen der Vertraulichkeit wird die Arbeit hier nur summarisch zusammengefasst.

Für die Optimierung und Weiterentwicklung von Kultivierungssystemen ist eine enge-mächtige Überwachung des Bioprozesses, wenn möglich ohne zeitliche Verzögerungen, unerlässlich. Während bereits viele andere Parameter in Echtzeit erfasst werden können, sind Daten zur Substratkonzentration, welche Informationen über bestimmte Substrataufnahmeraten oder Limitationszustände liefern, nur selten «online» verfügbar. Für die Kulturphysiologie und die Produktakkumulation in Mikroalgen ist die Verfügbarkeit von Nitrat ein entscheidender Faktor. Ziel dieser Studie war es deshalb, eine robuste online-Methode zur genauen und hochfrequenten Quantifizierung der Nitratkonzentration in solchen Kulturen zu etablieren, um den Prozessverlauf zukünftig gezielter steuern zu können.

Dies wurde durch den Einsatz eines HPLC-Systems und mit Hilfe eines automatisierten Probeentnahmesystems mit integrierter Probenverarbeitung realisiert. Für die Rohdatenerfassung, die Interpretation (Peak-Integration) und die Rückmeldung an das Prozessleitsystem wurde eine durchgängige Datenverarbeitungskette etabliert. Das neue Monitoring-Konzept wurde erfolgreich an Mikroalgenkulturen getestet und kann in Zukunft für Prozesse mit adaptiver Steuerung von Substrat-Zugaberaten eingesetzt werden.

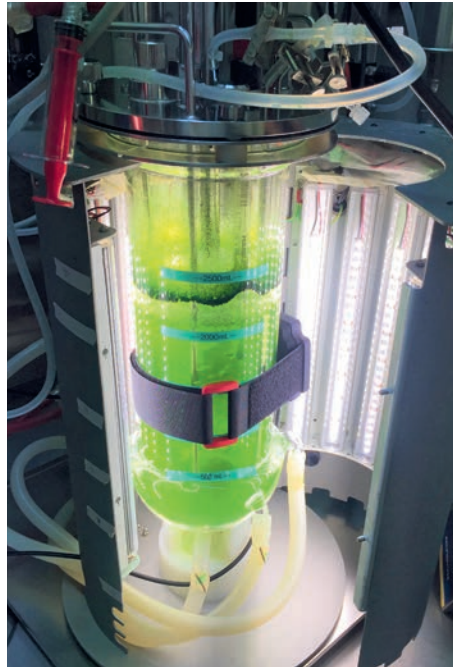


Abb. 1: Phototrophe Kultivierung von *Synechocystis* im Bio-reaktor Labfors 5 LUX.



Abb. 2: Automatisiertes Probeentnahmesystem verbunden mit einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Gerät.

# Isolierung von Schlauchpilzen mit enzymatischen und inhibitorischen Eigenschaften



Diplomandin	Alina Zanga
Korrektoren ZHAW	Prof. Dr. Martin Sievers, Dipl. Ing. (FH) David Frasson

Pilze werden seit Jahrhunderten als Speisepilze genutzt und spätestens seit der Entdeckung von Antibiotika, das aus einem Schimmelpilz der Gattung Penicillin isoliert wurde, sind sie auch in der Pharmaindustrie nicht mehr wegzudenken. Ihre Metaboliten werden als Lebensmittelveredler, Medikamente und Heilmittel eingesetzt und ihre vielfältigen enzymatischen Eigenschaften tragen zu neuen Entwicklungen in der Wirkstoffforschung bei. Während dieser Arbeit wurden Erdproben von verschiedenen Böden entnommen und im Labor auf unterschiedlichen Medien sowie Mehlwürmern kultiviert und isoliert. Dabei wurde eine reproduzierbare Isolationsmethode für Schlauchpilze und insektenpathogene Schimmelpilze entwickelt. Ausserdem wurden die Reinkulturen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) identifiziert und auf mögliche Hemmung gegenüber *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* untersucht.

Es wurde festgestellt, dass die Zusammensetzung des Mediums einen grossen Einfluss auf die isolierten Pilzarten hat. Bei Zugabe von selektiven Substanzen wie Chitin wurde ein verstärktes Wachstum von Insektenpathogenen festgestellt, während bei nicht selektiven Medien wie dem Malzextrakt Agar eine grosse Vielfalt von verschiedenen Schimmelpilzen isoliert werden konnte. Der pH-Wert des Mediums scheint ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Wachstumsrate der Pilze zu spielen. Saure Medien besitzen eine natürliche Abwehr gegen Bakterien und fördern gleichzeitig das

Wachstum von Schimmelpilzen. Von den infizierten Mehlwürmern wurden potenziell entomopathogene Arten isoliert, was jedoch anhand einer Rückinfizierung bestätigt werden müsste (Abbildung 1).

Insgesamt konnten 346 Phänotypen isoliert werden, wovon 276 mittels PCR und anschliessender Sequenzierung identifiziert werden konnten. Es wurden 59 unterschiedliche Schimmelpilzarten gefunden und auf Hemmstoffe geprüft. Vor allem die Gattungen *Penicillium spp.*, *Metarhizium spp.*, *Beauveria spp.* und *Purpureocillium spp.* zeigten Bakterienhemmungen zwischen 75 % und 100 %.



Abb. 1: **Bodenproben mit infizierten Mehlwürmern.** Oben links ist Probe 1 mit einem infizierten Wurm zu sehen. Daneben ist Probe 2 mit zwei befallenen Würmern abgebildet. In der unteren Reihe ist links Probe 3 mit sieben und rechts Probe 4 mit fünf infizierten Mehlwürmern ersichtlich. Probe 5 wird nicht dargestellt, weil keine Würmer infiziert wurden.

# Manufacturing and characterization of collagen-based meniscus implants (confidential)



<b>Diplomandin</b>	Carla Zihlmann
<b>Korrektor ZHAW</b>	Prof. Dr. Michael Raghunath
<b>Korrektor extern</b>	Dipl. Ing. Niklaus Stiefel, Geistlich Pharma AG

The described project is under secrecy obligation. It was carried out in cooperation with Geistlich Pharma AG. For reasons of confidentiality, no details of the work will be published.




**ZHAW LSFM**  
Jetzt als APP!



**ZHAW LSFM**  
Jetzt als APP!





Nach dem Studium  
können Sie  
komplexe  
biotechnologische  
Aufgaben lösen  
und Führungs-  
verantwortung  
übernehmen.



# Institut für Chemie und Biotechnologie (ICBT)

Das Institut für Chemie und Biotechnologie (ICBT) bringt gezielt die Kompetenzen zusammen, die im konvergierenden Fachgebiet von Chemie und Life Sciences immer stärker zusammenwirken. Es fokussiert auf die Anliegen von KMU, Gewerbe und Industrie in der Pharma-, Chemie- und Umweltbranche. Entstanden ist es aus den beiden etablierten ZHAW-Instituten, dem Institut für Biotechnologie und dem Institut für Chemie und Biologische Chemie.

Im ICBT finden Sie folgende strategische Schwerpunkte in Forschung und Dienstleistungen:

- **Analytische Chemie**
- **Biochemie, Proteintechnologie und Bioanalytik**
- **Chemische und biotechnologische Prozesse und Anlagen**
- **Mikro-, Molekular- und Zellbiologie, Tissue Engineering**
- **Pharmazeutische Technologie, Medizinalchemie und Phytopharmazie**
- **Synthese und neue Materialien**

## Lehre

Das Institut präsentiert sich in der Lehre durch zwei Bachelorstudiengänge: in Biotechnologie «Bachelor of Science ZFH in Biotechnologie» mit den Vertiefungen «Biotechnologie» und «Pharmazeutische Technologie» und in der Chemie «Bachelor of Science ZFH in Chemie» mit den Vertiefungen «Chemie» und «Biologische Chemie».

Im forschungsbasierten Masterstudiengang «Master of Science of Life Sciences» werden ebenfalls zwei Vertiefungen angeboten: «Pharmaceutical Biotechnology» und «Chemistry for the Life Science».

## Weiterbildung

Das Institut bietet neben der Lehre massgeschneiderte Weiterbildungsprogramme an: Individuelle Weiterbildungen für Firmen werden an den speziellen Kundenbedürfnissen ausgerichtet. Internationale Fachtagungen und das «CAS in the Science and Art of Coffee» runden das Portfolio ab.

## Forschung, Entwicklung und Dienstleistungen

In seiner Lehr- und Forschungstätigkeit fokussiert das ICBT auf die Anliegen von KMU, Gewerbe und Industrie aus den Gebieten der Chemie-, Pharma- und Umweltbranche. Forschungs- und Entwicklungsprojekte: Ergebnisse der Grundlagenforschung setzen wir um in marktgerechte Produkte und Dienstleistungen.

---

## Projekte:

Beispiele von unseren

Forschungsprojekten finden Sie unter:

[www.zhaw.ch/de/Isfm/forschung/chemie-und-biotechnologie](http://www.zhaw.ch/de/Isfm/forschung/chemie-und-biotechnologie)

# Perspektiven: Master und Weiterbildung

## Masterstudium

Nach erfolgreichem Abschluss Ihres Bachelors können Sie an der ZHAW in Wädenswil einen forschungsbasierten und praxisorientierten Master of Science in Life Sciences absolvieren. Als Vertiefungsrichtung wird «Pharmaceutical Biotechnology» angeboten.

Der Masterabschluss qualifiziert Sie insbesondere bei internationalen Unternehmen für die höhere Karrierelaufbahn. Machen Sie den nächsten Schritt in Ihrer akademischen Karriere und melden Sie sich für das Masterstudium an.

[www.zhaw.ch/icbt/master-biotechnology](http://www.zhaw.ch/icbt/master-biotechnology)

## Weiterbildung

Das Institut bietet auf Anfrage kundenspezifisch ausgerichtete Weiterbildungskurse in den Laboren der einzelnen Forschungsgruppen an.

Selbstverständlich können Sie auch praxisbezogene Weiterbildungskurse oder Weiterbildungsstudiengänge (MAS, DAS, CAS) an einer Fachhochschule oder Universität besuchen. Auch die Teilnahme an Fachtagungen, z. B. am Institut für Chemie und Biotechnologie, bietet Ihnen neues Wissen und fachliche Vernetzung.

[www.zhaw.ch/icbt/weiterbildung](http://www.zhaw.ch/icbt/weiterbildung)

## Tagungen

Die Gelegenheit, sich auf den neuesten Stand von Wissen und Technik zu bringen und die eigene fachliche Kontaktpflege voranzutreiben.

[www.zhaw.ch/icbt](http://www.zhaw.ch/icbt)



A portrait of a young woman with long, wavy brown hair, wearing black-rimmed glasses and a light blue button-down shirt. She is smiling and looking directly at the camera. The background is a plain, light grey color.

# Britta

Scientist Continuous  
Bioprocessing, Pall Interna-  
tional

«Das Masterstudium hat mir die Tür  
zu interessanten und anspruchsvollen  
Stellen in der pharmazeutischen Bio-  
technologie geöffnet.»

# Porträt Masterabsolventin: Britta Manser

**Vorbildung:** Bachelor of Science in Biotechnology ZHAW, Drogistin mit BMS

**Studium:** Master of Science ZFH in Life Sciences

## Welches sind Ihre Tätigkeitsgebiete und Verantwortlichkeiten?

Im Scientific Laboratory Support Team bei Pall Life Sciences bin ich für die wissenschaftliche Beratung unserer internationalen Kunden zuständig. Mein Fachgebiet liegt bei Technologien und Fragestellungen zum Continuous Bioprocessing.

## Was schätzen Sie in Ihrer Tätigkeit besonders?

Mein Beruf ist sehr abwechslungsreich, da ich sowohl in der Industrie als auch in der Entwicklung arbeite. Ich schule Kunden oder plane und führe mit ihnen zusammen Projekte im Labor durch. Ausserdem habe ich die Möglichkeit, interne Entwicklungsarbeit zu unterstützen, Veröffentlichungen zu schreiben und Fachvorträge an Konferenzen zu halten.

## Worin liegen die Herausforderungen?

Eine Herausforderung meiner Stelle liegt darin, dass sich das Feld des Continuous Bioprocessing sehr schnell weiterentwickelt und stets neue Publikationen veröffentlicht und neue Technologien vorgestellt werden.

## Warum haben Sie sich für dieses Masterstudium entschieden?

Nach dem Bachelorstudium in Biotechnologie wollte ich mein Wissen im Bereich der biotechnologischen Herstellung von Arzneimitteln vertiefen und mit der Masterarbeit weitere Arbeitserfahrung sammeln. Das Masterstudium vermittelt zudem Themen des Downstream-processing und ergänzt damit den Bachelorstudiengang ideal.

## Hat das Studium Ihre Erwartungen erfüllt?

### Was war für Sie besonders wertvoll?

Das Masterstudium hat mich mit der Kombination von fachspezifischen Modulen mit interdisziplinären Kursen sehr gut auf meine jetzige Stelle vorbereitet. Ich konnte sowohl mein Wissen in der Biotechnologie festigen als auch meinen Horizont mit Kursen wie

Datenmanagement oder Marketing erweitern. Zudem konnte ich während des Studiums wertvolle Kontakte knüpfen.

## Zu welchem Thema haben Sie Ihre Master Thesis verfasst?

Meine Masterarbeit habe ich im Fachgebiet der Zellkulturtechnik verfasst und dabei ein neues Verfahren der Baculovirusinfektion von Insektenzellen untersucht, mit welchem Proteine schneller und kostengünstiger produziert werden können.

## Wem würden Sie ein solches Studium weiterempfehlen?

Ich empfehle das Studium vor allem Personen, welche sich praxisorientiert und interdisziplinär weiterbilden möchten. Auch wer sich mit der Masterarbeit auf ein Fachgebiet konzentrieren möchte und mehr Erfahrung sammeln will, ist beim Masterstudium richtig.

---

Alle Absolventenporträts finden Sie auch online  
[www.zhaw.ch/icbt/  
master-biotechnology](http://www.zhaw.ch/icbt/master-biotechnology)

# Internationaler Austausch

Sie möchten einen Teil Ihres Studiums im Ausland absolvieren? Die ZHAW bietet Ihnen diese Möglichkeit. Ein Austauschsemester, ein Auslandspraktikum, der Besuch einer Summer School, eine Studienreise oder ein Sprachaufenthalt bringen Ihnen viele Vorteile: Sie lernen eine andere Kultur und Sprache kennen, ein anderes Bildungs- und Forschungssystem und Sie sammeln Erfahrungen für Ihre berufliche Zukunft. Das Departement Life Sciences und Facility Management der ZHAW ist im Rahmen des Swiss-European Mobility Programme SEMP (der Übergangslösung, welche vom Bundesrat für das EU-Bildungsprogramm Erasmus+ eingerichtet wurde) derzeit mit über 70 Partnerhochschulen in 15 europäischen Ländern vernetzt.

Der Studiengang Biotechnologie motiviert die Studierenden darin, ihre Bachelorarbeit an einem ihrer ausländischen Partnerinstitute zu schreiben. Zudem werden jährlich internationale Summer Schools organisiert. Neben den Informationen im Internet gibt die Studienberatung des Studiengangs Biotechnologie oder das International Relations Office (IRO) gerne dazu nähere Auskünfte und unterstützt Sie bei Ihren Fragen.

Mehr über die internationale Mobilität und Erfahrungsberichte von Studierenden finden Sie unter: [www.zhaw.ch/lsfm/international](http://www.zhaw.ch/lsfm/international)



**Internationale  
Arbeitserfahrung**

**Bezahlte Praktika  
in über  
80 Ländern**

Arbeitsalltag im Labor: Diane mit einem selbst gefangenen Rochen, welchen sie auf Parasiten und krankheitserregende Viren untersuchte

## «Sowohl professionell als auch persönlich: Ich hätte nicht besser in meinen Sommer investieren können.»

Mit meinem IAESTE Praktikum konnte ich mich auf mehreren Ebenen weiterentwickeln. Das Praktikum war die ideale Kombination aus Biologie, Abenteuer und Nervenkitzel. Ich konnte sowohl in der Arbeit als auch im Alltag Erfahrungen gewinnen und es entstanden Erinnerungen, an welche ich das ganze Leben lang gerne zurückdenken werde. Ich empfehle jedem unbedingt eine gewisse Zeit im Ausland zu leben!»

Diane Seda, Biotechnologiestudentin an der ZHAW Wädenswil. Sie absolvierte mit IAESTE ein zweimonatiges Praktikum an der Universidade Estadual Paulista Julio de Mesqu in Ilha Solteira, Brasilien.

### IAESTE Praktika...

- ... richten sich v.a. an Studierende **technischer und naturwissenschaftlicher** Fächer
- ... sind **beahlt**: der Lohn deckt die Lebenshaltungskosten vor Ort
- ... bieten Dir **viele Vorteile**: Betreuung während der Bewerbungsphase, soziales Netzwerk vor Ort, etc.
- ... haben eine Dauer zwischen **6 Wochen und 12 Monaten**



Alle unsere Praktikumsstellen findest Du hier:  
[www.iaeste.ch/Students/TraineeshipOffers/](http://www.iaeste.ch/Students/TraineeshipOffers/)



**IAESTE**  
SWITZERLAND

Premium Partner von IAESTE Switzerland



Zürich University  
of Applied Sciences



Unterstützt durch

**HASLER  
STIFTUNG**

# Exosomen – die Cargo-Transporter des Körpers

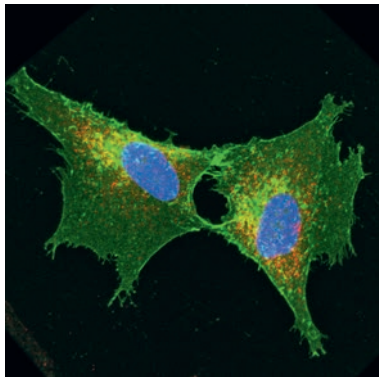
## Fachgruppe Zellphysiologie und Zell-Engineering, ICBT

Damit ein multizellulärer Organismus wie der menschliche Körper lebensfähig ist, benötigt er ständig den Austausch von Informationen zwischen den Organen und selbst zwischen einzelnen Zellen. Bis vor Kurzem dachte man, dass es dazu nur vier Varianten gibt. Eine Variante als Beispiel ist die Produktion eines Hormons, welches über das Blut weit entfernte Zellen erreicht (z. B. Produktion von Erythropoietin in der Nierenrinde, welches Stammzellen im Knochenmark zur Bildung von roten Blutkörperchen anregt). Nun hat man vor einigen Jahren entdeckt, dass unser Körper über ein weiteres, weitaus komplexeres System verfügt, um

nicht nur Informationen, sondern auch Cargo zu transportieren – die Exosomen. Dabei handelt es sich um kleine (100 nm) membranumschlossene Vehikel, die von Zellen sekretiert und ins Blut abgegeben werden. Somit enthalten diese Exosomen nicht nur Proteine und Lipide auf der Oberfläche für den Informationaustausch, sondern auch Cargo im Innern wie z. B. RNA und Proteine. Dieser Cargo hat entsprechend eine enorme Auswirkung auf die Zielzellen, welche die Exosomen aufnehmen.

Somit stellen also diese Exosomen ein körpereigenes Drug Delivery System dar, was einen riesigen Hype in der Pharmaindustrie ausgelöst hat. Ein grosses Problem der Pharmaindustrie ist, dass viele interessante Ziele für Medikamente gar nicht oder nur ungenügend zugänglich sind, weil sie z. B. hinter Barrieren wie der Blut-Hirn-Schranke oder im Inneren von ganz spezifischen Zellen liegen. Die Hoffnung ist nun, dass man Exosomen

biotechnologisch herstellen kann und sie dabei so zu verändern, dass sie nicht nur Zugang zu den gewünschten Zellen im Körper haben, sondern, dass man sie auch beliebig mit Medikamenten beladen kann. Dies würde vollkommen neue Therapien für viele Krankheiten ermöglichen oder bei vielen bestehenden



Medikamenten die Nebenwirkungen drastisch reduzieren.

Dazu laufen bei uns mehrere interdisziplinäre Projekte mit Kolleginnen und Kollegen anderer Fachgruppen (FG Zellkulturtechnik und FG Pharmazeutische Technologie und Pharmakologie) und der Industrie (Anjarium Biosciences). Zwei Bachelorarbeiten in diesem Booklet (Bettina Kritzer und Simon Mathis) befassen sich mit den Exosomen. Die mittig stehende Aufnahme stammt von Bettina Kritzer.

**Kontakt:** Prof. Dr. Jack Rohrer







## Wovon kann ich als Mitglied sonst noch profitieren?

Durch die Anmeldung bei der ALUMNI ZHAW Fachbereich Life Sciences profitierst du von Vergünstigungen auf Weiterbildungsangebote der ZHAW bzw. dem gesamten Dienstleistungsangebot der ALUMNI ZHAW. Ebenfalls kommst du in den Genuss der Angebote von FH Schweiz, des nationalen Dachverbandes der FH-AbsolventInnen.

## Wie werde ich Mitglied?

Die ALUMNI ZHAW Fachbereich Life Sciences lädt alle Studierenden, Ehemaligen und den Mittelbau/Dozierenden der Life Sciences Studiengänge zur Mitgliedschaft ein. Der Mitgliederbeitrag beträgt jährlich CHF 110.–. Während dem Studium und im ersten Folgejahr ist die Mitgliedschaft kostenlos.

Alumni bedeutet so viel wie «Ehemalige einer Hochschule». Alumni Organisationen sind die lebenslangen Netzwerke für AbsolventInnen einer Hochschule. Sie sichern den Kontakt zu anderen AbsolventInnen wie auch zur ZHAW. An der ZHAW ist die ALUMNI ZHAW die offizielle Alumni Organisation. Sie arbeitet eng mit der ZHAW zusammen. Der Fachbereich ALUMNI ZHAW Life Sciences umfasst die Studienrichtungen:

- Biotechnologie
- Chemie / Biologische Chemie
- Lebensmitteltechnologie
- Umweltingenieurwesen

Ziele der ALUMNI ZHAW Fachbereich Life Sciences sind die Förderung der beruflichen und standespolitischen Interessen seiner Mitglieder sowie die Kontaktpflege zwischen Ehemaligen und Angehörigen der Hochschule – ganz nach dem Motto: «Keep in touch». Um diese Ziele zu erreichen, werden im Rahmen von Mitgliederevents aktuelle Themen aus der Wissenschaft und der Arbeitswelt durchgeführt. Zusätzlich organisiert die ALUMNI ZHAW jährlich mehrere fachübergreifende Events.

Melde dich gleich an



[www.alumni-zhaw.ch/Is/mitglied-werden](http://www.alumni-zhaw.ch/Is/mitglied-werden)

### Weitere Informationen:

ALUMNI ZHAW  
Fachbereich Life Sciences  
Gertrudstrasse 15, 8400 Winterthur  
Is@alumni-zhaw.ch  
[www.alumni-zhaw.ch/Is](http://www.alumni-zhaw.ch/Is)

# ZHAW LSFM

## Die ZHAW

Die ZHAW ist eine der führenden Schweizer Hochschulen für angewandte Wissenschaften. Sie ist in Lehre, Forschung, Weiterbildung und Dienstleistung tätig – praxisnah und wissenschaftlich fundiert. Sie ist mit ihren Standorten in Winterthur, Zürich und Wädenswil regional verankert und kooperiert mit internationalen Partnern. Die Hochschule umfasst acht Departemente. Derzeit sind über 12000 Studierende an der ZHAW eingeschrieben.

## Das Departement

Studieren und Forschen in Wädenswil: praxisnah, kreativ, leidenschaftlich und reflektiert. Dafür steht das Departement Life Sciences und Facility Management ein. Derzeit sind rund 1500 Studierende immatrikuliert und über 600 Personen in Wädenswil beschäftigt. Mit den Kompetenzen in Life Sciences und Facility Management leistet das Departement in den Gebieten Environment, Food und Health einen wichtigen Beitrag zur Lösung gesellschaftlicher Herausforderungen und zur Erhöhung der Lebensqualität.

## Bachelor, Master und Weiterbildung

Das Aus- und Weiterbildungsprogramm umfasst fünf Bachelor- und drei Masterstudiengänge sowie ein breites Weiterbildungsangebot. Das Bachelorstudium führt zur Berufs-

befähigung und vermittelt praxisorientiertes Fachwissen, Allgemeinbildung sowie Arbeitsmethodik. Das konsekutive Masterstudium führt zur Spezialisierung in der angestammten Studienrichtung und zum Erwerb von Zusatzqualifikationen. Permanente Weiterbildung ist heute wichtige Voraussetzung für den beruflichen Erfolg. An der ZHAW gibt es massgeschneiderte Kurse, Tagungen und Weiterbildungsstudiengänge.

## Forschung und Entwicklung

Fünf forschungsstarke Institute in den Bereichen Chemie und Biotechnologie, Lebensmittel- und Getränkeinnovation, Umwelt und natürliche Ressourcen, Angewandte Simulation sowie Facility Management leisten einen wichtigen Beitrag in Form von Forschung, Entwicklung und Dienstleistung. Sie arbeiten mit Wirtschaft, Behörden, Verbänden und anderen Forschungsinstituten eng zusammen. Die Kooperation mit externen Auftraggebern sichert den Wissens- und Technologietransfer zwischen Hochschule und Praxis.

ZHAW Campus Reidbach / Einsiedlerstrasse

ZHAW Campus Reidbach / Seestrasse

ZHAW Campus Grüental

## Kontakt

ZHAW Zürcher Hochschule für  
Angewandte Wissenschaften  
Life Sciences und Facility Management  
Institut für Chemie und Biotechnologie  
Grüentalstrasse 14  
Postfach  
8820 Wädenswil/Schweiz  
+41 58 934 50 00

[info.icbt@zhaw.ch](mailto:info.icbt@zhaw.ch)  
[www.zhaw.ch/icbt](http://www.zhaw.ch/icbt)

