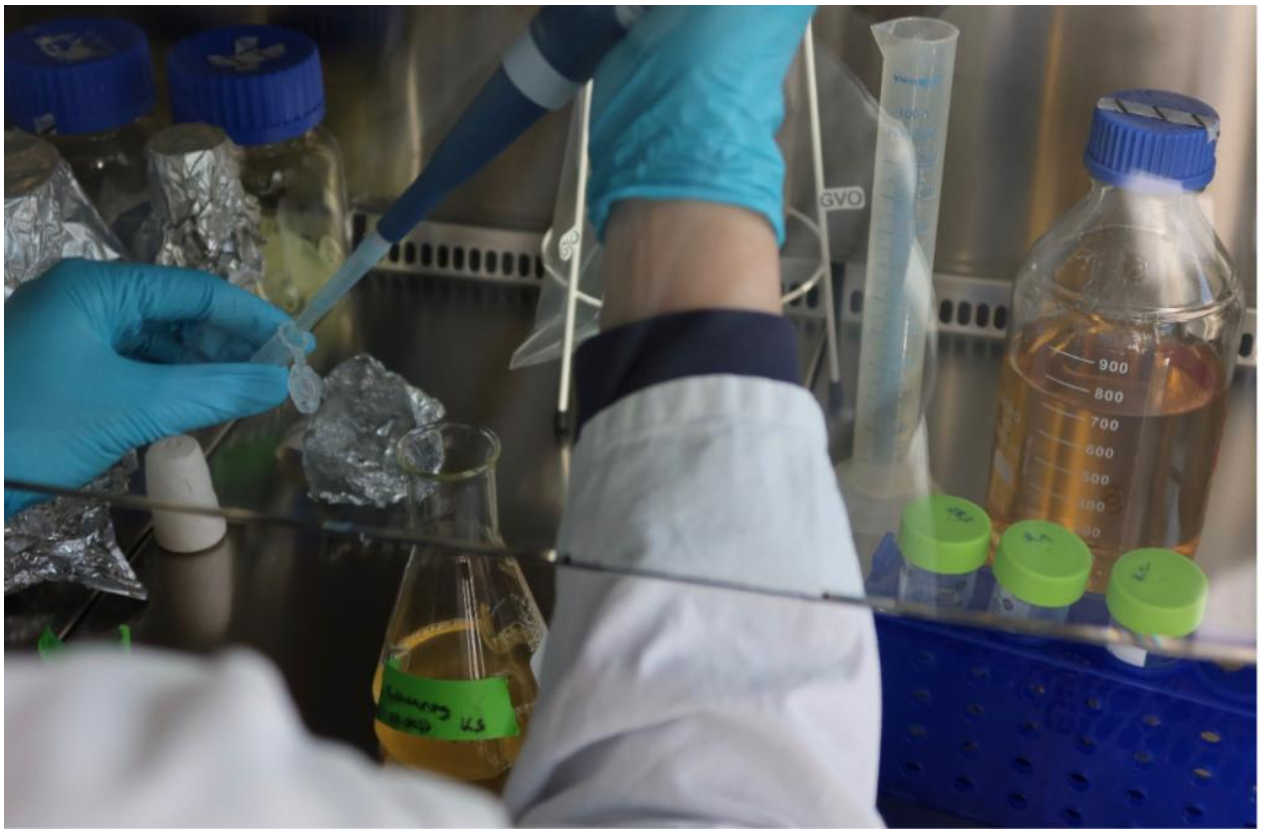
Hector Seminar

Karlsruher Institut für Technologie

MAB

PROCESS ENGINEERING IN LIFE SCIENCE

Produktion und Aufreinigung eines neuartigen Proteins im Bakterium *E. Coli*



Abschlussdokumentation der Kooperationsphase 2022/23

Katharina Gring, Clara Wottge

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung . . . **3**

2 Methoden . . . **4**
2.1 Kodieren des Expressionskonstrukts *R1-R2* . . . 4
2.2 Kultivierung . . . 5
2.2.1 Vorbereitung der Bakterienkultur . . . 5
2.2.2 Impfen mit Antibiotika . . . 5
2.2.3 Messung der optischen Dichte mithilfe des Photometers . . . 6
2.2.4 Start der Produktion des Zielproteins durch IPTG . . . 6
2.2.5 Abzentrifugieren . . . 7
2.3 Aufreinigung . . . 7
2.3.1 Resuspension . . . 7
2.3.2 Zellaufschluss durch Ultraschallbestrahlung (Sonifikation) . . . 7
2.3.3 Sterilfiltration . . . 8
2.3.4 Affinitätschromatographie . . . 8
2.3.5 Spektralphotometer . . . 9
2.3.6 SDS-Page (Polyacrylamid-Gelelektrophorese, PAGE) . . . 10
2.4 Charakterisierung - Kleben . . . 11

3 Ergebnisse und Auswertung . . . **14**
3.1 Kultivierung . . . 14
3.2 Aufreinigung . . . 21
3.2.1 Chromatographie . . . 21
3.2.2 Spektralphotometer . . . 23
3.2.3 SDS-Page . . . 23
3.3 Charakterisierung - Kleben . . . 25
3.3.1 Verwendete Klebeflächenmaterialien und Proteinkonzentrationen . . . 25
3.3.2 Zugscherversuche . . . 25
3.3.3 Weitere Versuche . . . 27

4 Diskussion und Ausblick . . . **28**

5 Danksagung . . . **29**

6 Literaturverzeichnis . . . **30**

7 Anhang . . . **31**
7.1 Tabellen der Kultivierung . . . 31
7.2 Tabellen der SDS-Page . . . 32
7.3 Tabellen Zugscherversuche . . . 34

Abstract

The goal of this project is to use the amino acid sequences of a flatworm called *M. Lignano*, which uses its self-made glue to attach itself to surfaces in order to create a biological glue. For this purpose, the relevant DNA-sequence was inserted into the bacteria *E. Coli*, which then produced the desired protein. This mixture of protein and remnants of bacteria, among others, was purified with the hope of isolating only the protein. The last part of our project mainly involved testing the produced glue in different concentrations and with various materials to which the protein would adhere, and comparing this to other proteins as a way of assessing its quality. The results were as expected, meaning the glue adhered well to glass, although this was not the case with other materials such as wood. This led us to attempts to make the glue more viscous. Our research has applications in many fields, primarly in medicine. With further research, the glue could potentially be used for arteries or even bones.

1 Einleitung

Das Projekt basiert auf der Beobachtung, dass der Wurm *Macrostomum Lignano* in der Lage ist, einen stabilen Unterwasserkleber zu produzieren. Ein solcher soll nun nach dem Vorbild der Natur biobasiert und nachhaltig hergestellt werden.
Für den Plattwurm *Macrostomum Lignano* sind zwei für das Kleben verantwortliche Proteine näher beschrieben. Im Verlauf des Pojekts soll die Klebfähigkeit dieser zwei oder zweier Variationen dieser Klebeproteine getestet und charakterisiert werden.
Dafür wird die DNA der sich wiederholenden Proteinabschnitte in die DNA eines Plasmids eingeschleust und dieses in *E. Coli* Bakterien transformiert. Damit die Bakterien die gewünschte Substanz überhaupt produzieren, wird mithilfe eines Expressionsvektors die Produktion des Proteins gestartet. Zusätzlich wird eine Gensequenz zur Antibiotika-Resistenz hinzugefügt, um die Bakterien, bei denen die Plasmid-Einschleusung nicht erfolgreich verläuft, sofort abzutöten. Anschließend werden die Zellen geerntet, wobei die Kulturen abzentrifugiert werden müssen. Um das produzierte Protein aus den Zellen zu erhalten, müssen die Zellen zunächst lysiert und in Form einer klebeproteinhaltigen Lösung extrahiert werden. Im Anschluss muss diese noch mittels Chromatographie aufgereinigt werden und das Zielprotein von den anderen zellulären Proteinen getrennt werden. Die Reinheit und Menge der aufgereinigten Lösung des Zielproteins wird mithilfe der SDS-Page festgestellt.
Letztlich werden reine Proteinlösungen zur Verklebung von zwei Platten verwendet. Die Festigkeit des Proteinklebers wird mit verschiedenen Konzentrationen und Materialien in Bezug auf Scherkraftbelastung getestet.

2 Methoden

Die *E. Coli* Bakterien, mit denen im Projekt gearbeitet wird, sind gentechnisch verändert. Das bedeutet, dass sich auf einem Plasmidring die zwei, für das Kleben verantwortlichen Proteine Mlig-ap2_Repeat1 (*R1*) und Mlig-ap2_Repeat2 (*R2*) - siehe Abbildung 1 [1] - befinden. Das Einschleusen des Plasmidrings erfolgte dabei extern, weshalb die Vorkulturen bereits vorbereitet waren.

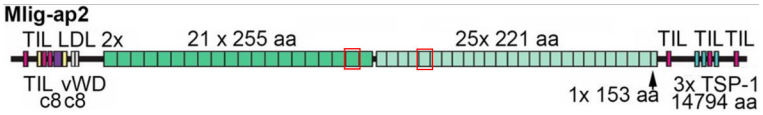


Abbildung 1: hervorgehobene Aminosäuresequenzen *R1* und *R2* des Klebeproteins Mlig-ap2

2.1 Kodieren des Expressionskonstrukts *R1-R2*

Zunächst wird ein sogenanntes Expressionskonstrukt entwickelt, damit eine Gensequenz, bespielsweise *R1* oder *R2* in ein Plasmid eingeschleust werden kann [2]. Dieses enthält alle Informationen, die die Zelle benötigt um das Protein zu produzieren, zusammen mit der Gensequenz für die Antibiotikaresistenz.
Dafür wird das Programm ApE (A plasmid Editor) von M. Wayne Davis verwendet.

In diesem Projekt wird lediglich mit den vorbereiteten Konstrukten *R1*, *R2* und *2x R1* gearbeitet, allerdings wird gleichzeitig dieser Expressionsvektor *R1-R2* geschrieben.

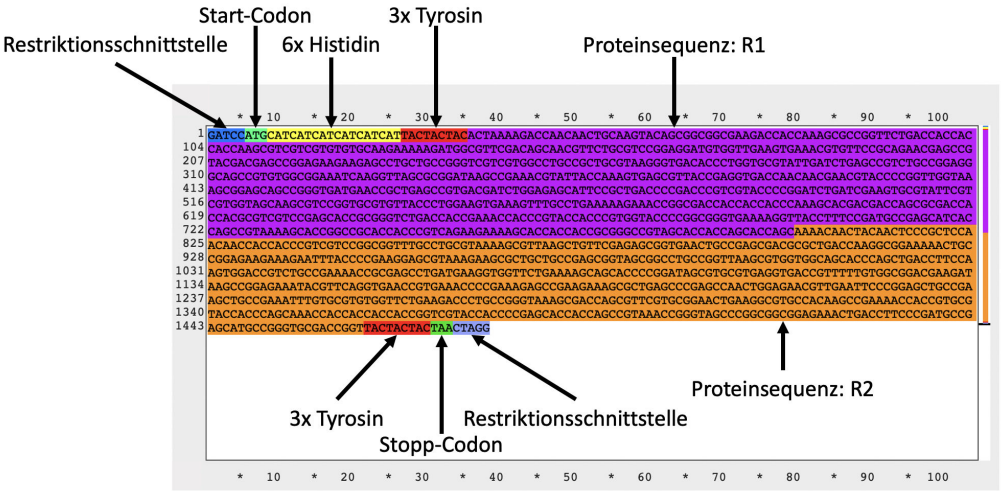


Abbildung 2: Expressionskonstrukt R1-R2

In Abbildung 2 erkennt man die Restriktionsschnittstelle. Das ist diejenige Code-Sequenz, mit der die Gensequenz später in das Plasmid eingeschleust wird. Anschließend kommt das Start-Codon, ab der die DNA für das Protein abgelesen wird, was durch das Stopp-Codon begrenzt ist. Das Start-Codon ist außerdem sehr wichtig, da hiermit der Start der Proteinproduktion gesteuert werden kann.
Mithilfe des Histidin, auch genannt His-tag, kann das produzierte Protein später durch Affinitätschromatographie aufgereinigt werden, da es dann an die Liganden binden kann.
Das Tyrosin dagegen wird oftmals verwendet, da es sowohl hydrophobe als auch hydrophile Eigenschaften hat, wodurch es gut an Proteinoberflächen oder Bindungsschnittstellen positioniert werden kann.
Zuletzt werden noch die tatsächlichen Aminosäuresequenzen von *R1* und *R2* benötigt.

2.2 Kultivierung

2.2.1 Vorbereitung der Bakterienkultur

Zunächst wird ein sogenanntes LB-Medium (engl. lysogeny broth) angesetzt, wie in Abbildung 3 zu sehen ist. Dabei handelt es sich um ein flüssiges Nährmedium, in dem alle Nährstoffe enthalten sind, die die Bakterien für ein optimales Wachstum benötigen.

Die gentechnisch veränderten *E. Coli* Bakterien werden kultiviert. Dafür wird eine Vorkultur der Bakterien in das LB-Medium gegeben (Abbildung 4). Unter passenden Umgebungsbedingungen, wie beispielsweise einer Temperatur von 37 °C, können die Bakterienkulturen optimal wachsen. Schließlich werden die Kulturen in einen Inkubator gegeben, der sich mit 200 U/min dreht, sodass die Kulturen ständig durchgemischt werden und eine ständige Sauerstoffzufuhr gegeben ist.

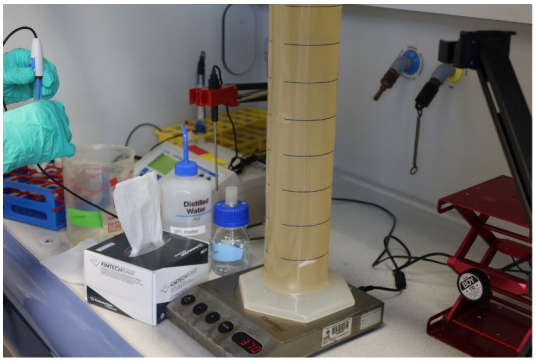


Abbildung 3: Herstellung des LB-Mediums

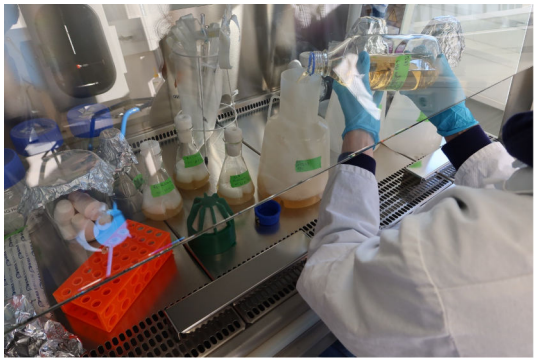


Abbildung 4: Herstellung der Hauptkultur

2.2.2 Impfen mit Antibiotika

Auf der DNA des Plasmids befindet sich zusätzlich zu den zu produzierenden Aminosäuresequenzen *R1* oder *R2* auch jeweils noch eine Antibiotikaresistenz für Kanamycin. Dieses Antibiotikum wird dann zu der Hauptkultur hinzugegeben (Abbildung 5), um die *E. Coli* Bakterien, die das Plasmid nicht aufgenommen haben, abzutöten. Die *E. Coli* Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, sind gegen das Antibiotikum immun und nur diese überleben und stellen in den nächsten Schritten das Zielprotein her.
In der Praxis werden hierfür zu 5 ml der jeweiligen Vorkultur 100 ml des LB-Mediums und 100 µl der Kanamycin-Stammlösung gegeben und bei 37 °C und 200 U/min inkubiert (Abbildung 6).

Abbildung 5: Entnahme der Kanamycin-Lösung

Abbildung 6: Inkubation der Hauptkulturen

2.2.3 Messung der optischen Dichte mithilfe des Photometers

Ein schnelles Verfahren zur Bestimmung der Größe der Zellkultur ist die Messung der optischen Dichte mittels Photometrie (Abbildung 7). Bakterienzellen streuen das Licht und schwächen dadurch die optische Durchlässigkeit ab. Diese Trübung oder Lichtstreuung kann im Photometer gemessen werden und wird als optische Dichte (OD) bezeichnet. Die OD wird bei 600 nm ($OD600$) durchgeführt, da die meisten Bakterien bei dieser Wellenlänge ein Maximum der Lichtabsorption aufweisen. Bis zu einer bestimmten Zelldichte, bei der die Bakterienzellen beginnen, sich gegenseitig zu beschatten, ist die Trübung proportional zur Zellzahl. Dies gilt bis zu einem Wert von maximal $OD600 = 0,3$. Dichtere Suspensionen müssen entsprechend mit dem Nährmedium verdünnt werden, um genaue Messungen zu ermöglichen. Der Nullabgleich des Photometers erfolgt mit frischem, unbeimpftem Medium; für verdünnte Proben erfolgt der Nullabgleich mit entsprechend verdünntem Medium.
Bespielsweise entspricht ein $OD600$ von 1,0 einer Konzentration von $8 \cdot 10^8 \frac{Zellen}{ml}$.

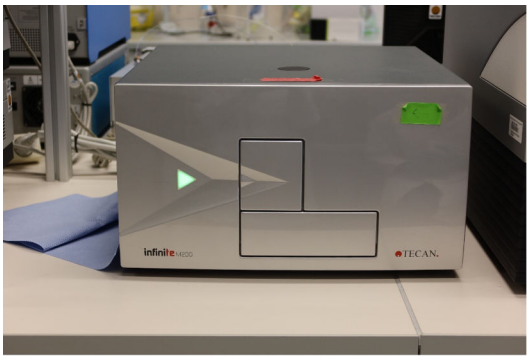


Abbildung 7: Photometer

2.2.4 Start der Produktion des Zielproteins durch IPTG

Ab einem $OD600$ von 0,4 bis 0,6 wird Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zur Kultur hinzugegeben, wodurch *E. Coli* dazu veranlasst wird, die für das Zielprotein kodierende DNA-Sequenz zu exprimieren.

IPTG bindet dabei an den aktiven Repressor, der eigentlich die Transkription der DNA-Sequenz der Proteine blockiert. Durch die Bindung von IPTG an den aktiven Repressor, verändert sich seine Konformation und er löst sich von dem Promotor, wodurch die RNA-Polymerase die DNA-Sequenz des Zielproteins ablesen kann und das Protein exprimiert werden kann. Der Vorteil von IPTG gegenüber Lactose ist hierbei, dass die IPTG-Konzentration konstant bleibt, da IPTG im Gegensatz zu Lactose von der Zelle nicht abgebaut werden kann.

2.2.5 Abzentrifugieren

Um die festen Bestandteile (abgestorbene Zellen, Zielprotein und zelleigene Proteine) von dem flüssigen LB-Medium zu trennen, wird die Zellkultur mithilfe einer Zentrifuge abzentrifugiert und die entstandenen Zellpellets anschließend bei -80 °C eingefroren. Mit diesen kann dadurch später weitergearbeitet werden, und das Zielprotein von den anderen Bestandteilen getrennt werden.

Abbildung 8: Zentrifuge

2.3 Aufreinigung

2.3.1 Resuspension

Die Zellpellets werden zunächst gewogen, um das Volumen des Lysepuffers zu berechnen, welcher hinzugegeben werden muss, um die Pellets zu resuspendieren und sie mit dem Lysepuffer zu vereinigen.

2.3.2 Zellaufschluss durch Ultraschallbestrahlung (Sonifikation)

Der Zellaufschluss erfolgt durch die Bestrahlung der Zellen mit Ultraschall (Abbildung 9), wobei die Bestrahlung jeweils in kurzen zeitlichen Abschnitten erfolgt, damit die Lösung nicht überhitzt, wodurch wiederum die Proteine denaturieren könnten. Wichtig ist hierbei, dass für das Ultraschallgerät mindestens 30 ml Flüssigkeit benötigt werden, damit die Zellen richtig aufgebrochen werden.

Abbildung 9: Aufspalten der Zellen

2.3.3 Sterilfiltration

Die Lösung wird zunächst abzentrifugiert und der Überstand durch einen Filter mit 0,8 µm Porendurchmesser filtriert (Abbildung 10). Das Filtrat wird im nächsten Schritt mit einem 0,45 µm und schließlich einem 0,2 µm Filter filtriert, um eine möglichst reine Lösung zu erhalten. Das Filtrat wird kühlgestellt.

Abbildung 10: Filtrieren der Mischung aus Zellresten und Protein

2.3.4 Affinitätschromatographie

Um Lösungen wie diese aufzureinigen, wird die Affinitätschromatographie eingesetzt, was eine Art der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist.

Die Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen Erkennung eines Proteins durch Antikörper. Die stationäre Phase, die oftmals aus einem Gel besteht, wird mit dem Liganden (in diesem Fall die Antikörper) gekoppelt, welcher die Proteine bindet und sie so von den anderen Bestandteilen der Lösung trennt.
In der Praxis wird deshalb das Chromatographie-Gerät (Abbildung 11) vorbereitet und mit Ethanol und danach mit Wasser gespült, um eventuelle alte Bakterien oder Protein-Reste abzutöten bzw. zu entfernen.
In der Chromatographie-Säule befindet sich die feste, stationäre Phase, durch welche die aufzureinigende Lösung unter hohem Druck gepumpt wird.
Das Gemisch wird auf die Säule aufgegeben, wobei die Zielproteine durch Liganden gebunden werden. Sämtliche anderen Komponenten verlassen die Säule schnell wieder, weil ihre Wechselwirkungen mit den Liganden vergleichsweise vernachlässigbar klein sind und sie deshalb nicht in der Säule zurückgehalten werden. Anschließend wird die Säule gewaschen, um unspezifisch gebundene Verunreinigungen zu eliminieren. Daraufhin wird der an die Liganden gebundene Stoff (das aufzureinigende Zielprotein) durch gezielte Anpassung der Pufferzusammensetzung, woraus die Lösung zum Großteil besteht, dazu angeregt, die Säule wieder zu verlassen.
In dem Gerät ist ein UV-Photometer, welches die Absorption im UV-Bereich misst und das Signal zur Auswertung direkt an einen Computer sendet.
Die einzelnen Bestandteile werden von dem Gerät in getrennte Messzylinder gefüllt. Diese enthalten dann das Wash, was alle anderen Bestandteile der Lösung außer dem Zielprotein beinhaltet und zwei Fraktionen der Elution, in der möglichst nur noch das Protein zu finden sein sollte.

Abbildung 11: Chromatographie-Gerät

2.3.5 Spektralphotometer

Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile, welche durch die Chromatographie getrennt wurden, werden nun mittels eines Spektralphotometers wie in Abbildung 12 bestimmt. Es handelt sich hierbei um ein

Photometer für kleinste Mengen, was wichtig ist, da so nur sehr wenig der zu untersuchenden Lösung für die Messung benötigt wird. Das Licht hat dabei eine Wellenlänge von 280 nm, da dort Proteine am stärksten absorbieren.

Abbildung 12: Bestimmung der Proteinkonzentration mittels eines Spektralphotometer

2.3.6 SDS-Page (Polyacrylamid-Gelelektrophorese, PAGE)

Die ungefähre Konzentration und vor allem Reinheit unserer Lösung wird mittels der SDS-Page bestimmt. Durch Gelelektrophorese werden Moleküle - in unserem Fall Proteine (und Nukleinsäuren) - aufgetrennt. Bei der Gelelektrophorese werden Stoffe mithilfe eines angelegten elektrischen Feldes auf einer stationären Phase getrennt. Dazu müssen die zu trennenden molekularen Partikel geladen sein. Allerdings sind Proteine i.A. ungeladene Teilchen. Die Zugabe des Detergens Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate - SDS) bewirkt, dass sich die Proteine proportional zu ihrer Größe an das Detergens binden. Die Ladung des zu trennenden Proteins nimmt dabei näherungsweise mit der Größe des Moleküls zu. So lassen sich die Bestandteile der verschiedenen Fraktionen mit Hilfe der Gelelektrophorese grob nach ihrer molekularen Masse trennen.
Mit 10 µl der jeweiligen Proben, die in die Taschen des Gels gefüllt werden (Abbildung 13), wird die Gelelektrophorese bei 200 V für die Zeit von 35 min durchgeführt.
Letztlich müssen die Proteinbahnen noch durch Färbung sichtbar gemacht werden, wobei zumeist die Coomassie-Färbung verwendet wird. Zunächst wird das Gel in einer sauren Lösung fixiert, da der Farbstoff die Proteine

nur in einem sauren Milieu binden kann. Die Proteine werden für das Fixieren außerdem in Formaldehyd denaturiert. Das Gel wird dann für kurze Zeit in einer Färbelösung inkubiert, welche den verdünnten Farbstoff enthält.

Abbildung 13: Befüllen der Taschen der SDS-Page

2.4 Charakterisierung - Kleben

Bei Klebevorgängen unterscheidet man zwei verschiedene Kräfte, welche dazu beitragen, dass ein Stoff klebt: Adhäsions- und Kohäsionskräfte [3]. Dabei beschreibt die Kohäsion die Kräfte, die innerhalb eines Klebstoffs wirken [4], während die Adhäsionskräfte sich auf die Wechselwirkungen des Klebers mit einem gewünschten Stoff beziehen. Mlig-ap1 ist dabei für die Kohäsion zuständig, also für die innere Festigkeit des Klebstoffs [5]. Mlig-ap2 dagegen ist für die Adhäsion zuständig [6].

Die Zugscherfestigkeit beschreibt dabei diejenige Kraft, die nötig ist, um eine Verklebung durch Zugkräfte senkrecht zur Flächennormalen zu trennen. Diese wird durch den Quotienten der maximal benötigten Kraft und der Fläche gebildet und mit σ bezeichnet [7]. Da die Klebefläche der einzelnen Objektträger bei unseren Versuchen stets gleich groß ist, kann auch das Kraftmaximum stellvertretend für die Zugscherfestigleit verwendet werden.

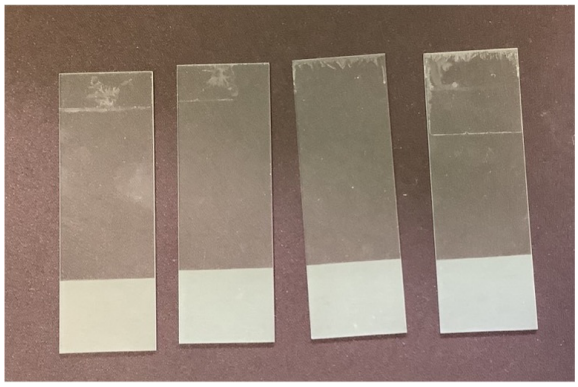


Abbildung 14: Glasträger mit Kleberresten

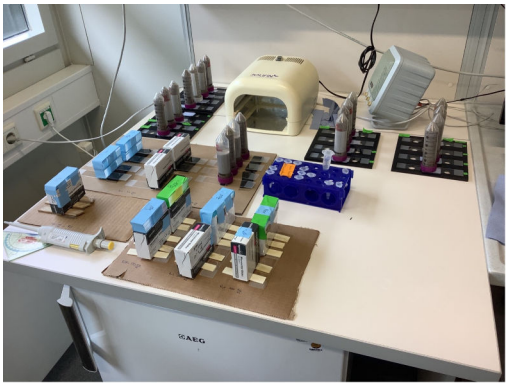


Abbildung 15: Träger verschiedener Materialien

Die sauberen Objektträger werden in die Objektträgermaske gelegt und jeweils 20 µl der Klebelösung auf die Fügefläche des unteren Objektträgers aufgetragen. Anschließend wird der zweite Objektträger vorsichtig und möglichst ohne Luftblasen auf dem unteren abgelegt, das Gebilde mit 100 g beschwert und für 20-24 h getrocknet.
Die zwei verklebten Objektträger werden schließlich in die Tischprüfmaschine (Abbildung 16) eingespannt, die Platten werden auseinandergezogen und somit die Festigkeit einer Klebung ermittelt.

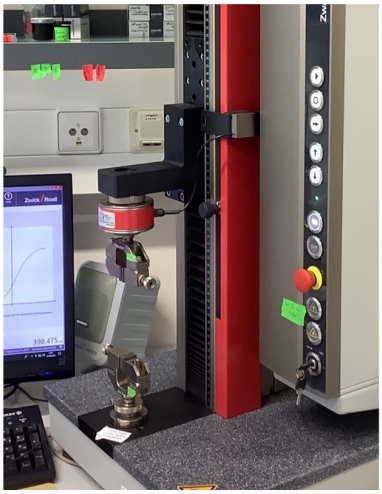


Abbildung 16: Tischprüfmaschine

Weitere Versuche standen ebenfalls auf dem Plan, beispielsweise der Schälversuch (Abbildung 17), bei dem hauptsächlich verformbare Materialien verklebt werden. Die beim Ablösen der beiden Materialien voneinander benötigte Kraft wird mithilfe von Kraftmessern bestimmt.
Die Zugbelastung stellt eine weitere Möglichkeit dar, Aussagen über die Klebstoffeigenschaften zu machen. Dabei werden die Materialien, die miteinander verklebt werden sollen, mit Hilfe von Acrylkleber auf beispielsweise Holzblöcke geklebt. Danach werden die so präparierten Blöcke mit dem biologischen Kleber

verklebt und diese danach auseinandergezogen (Abbildung 18).

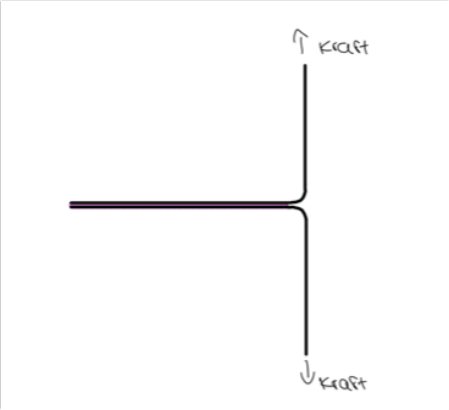


Abbildung 17: Schälversuch

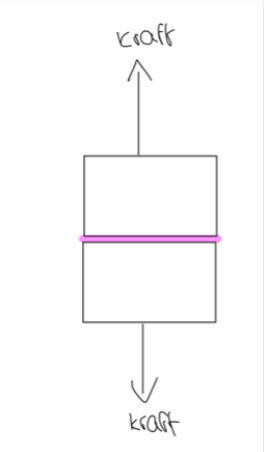


Abbildung 18: Blöcke

3 Ergebnisse und Auswertung

3.1 Kultivierung

Die Vorkulturen, aus denen die Hauptkulturen hervorgegangen sind, werden durch eine Messung der optischen Dichte verglichen. Es wird überprüft, ob die Bakterienkonzentration ungefähr gleich sind, damit für die sich daraus ergebenden Hauptkulturen gleiche Ausgangsbedingungen vorliegen. Die Proben der Bakterienkulturen werden dabei verdünnt (1:10 Verdünnung).

Tabelle 1: Vorkultur - OD Messung

SK7_VK	*R1*	*R2*	*2x R1*
Verdünnung	1:10	1:10	1:10
OD Messung	0,329	0,336	0,323
auf 1:1 hochgerechnet	3,29	3,36	3,23

Aus den Ergebnissen der Absorptionsmessungen (Tabelle 1) erkennt man, dass die drei Vorkulturen ungefähr gleich viele Bakterien besitzen, was eine gute Grundlage ist, um diese zu kultivieren und generell mit ihnen weiterzuarbeiten.

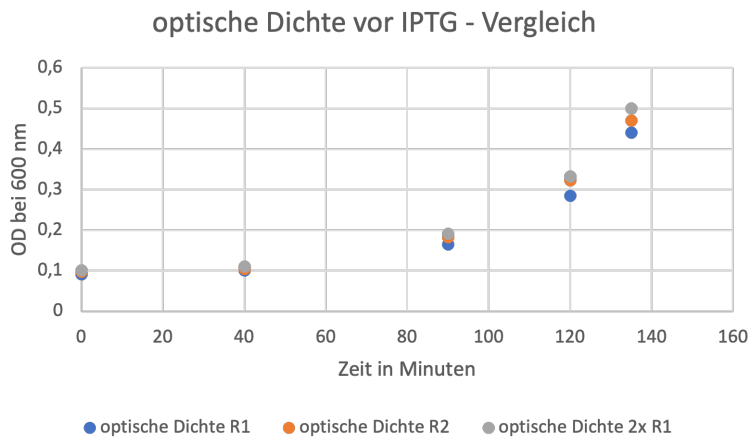


Diagramm 1: Optische Dichte vor Zugabe von IPTG - Vergleich

In Diagramm 1 ist die gemessene optische Dichte der drei Bakterienkulturen (*R1*, *R2* und *2x R1*) **vor der Zugabe von IPTG**, also vor dem Beginn der Proteinproduktion, dargestellt. Wie zu sehen ist, verlaufen alle drei Graphen sehr ähnlich, was zu erwarten ist, da es in diesem Abschnitt noch keinen Unterschied in der

Zellteilung bzw. normalen Zellproteinproduktion gibt und es offensichtlich keine Beeinträchtigung durch die Einschleusung gab.

Trotzdem wird das Wachstum dieses Stadiums in den folgenden drei Diagrammen nochmals genauer betrachtet.

In Diagramm 2 ist zu sehen, dass die Wachstumsrate der Bakterienkultur von *R1* bevor IPTG hinzugegeben wurde, bei 0,015 pro Minute (Exponent der Formel), also 0,9 pro Stunde, liegt. Das Diagramm zeigt die logarithmierten Werte, wobei zu erkennen ist, dass der Graph nicht ganz einer Gerade entspricht, weshalb das Wachstum nicht ganz als exponentiell bezeichnet werden kann. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Kultur nicht unter idealen Bedingungen gewachsen ist, da ein durchgängiger Zugang zu Sauerstoff nicht gewährleistet werden konnte.

Diagramm 3 zeigt, dass die Wachstumsrate bei der Bakterienkultur von *R2* bei 0,0155 pro Minute (0,93 pro Stunde) liegt, weshalb angenommen werden kann, dass bei 135 Minuten ungefähr gleich viele Bakterien wie in der Kultur von *R1* vorliegen. Dies kann geschlossen werden, weil zu Beginn gleich viele Bakterien vorliegen, wie in Tabelle 1 gezeigt.

Auch bei der Bakterienkultur von *2x R1* (Diagramm 4), beträgt die Wachstumsrate 0,0155 pro Minute und damit 0,93 pro Stunde, weshalb die Anzahl der Bakterien, welche später das Zielprotein produzieren, zu diesem Zeitpunkt gleich oder zumindest ähnlich ist. Dies ist sehr gut, da deshalb die produzierte Menge des Klebeproteins wahrscheinlich auch in dem gleichen Größenordnungsbereich liegt.

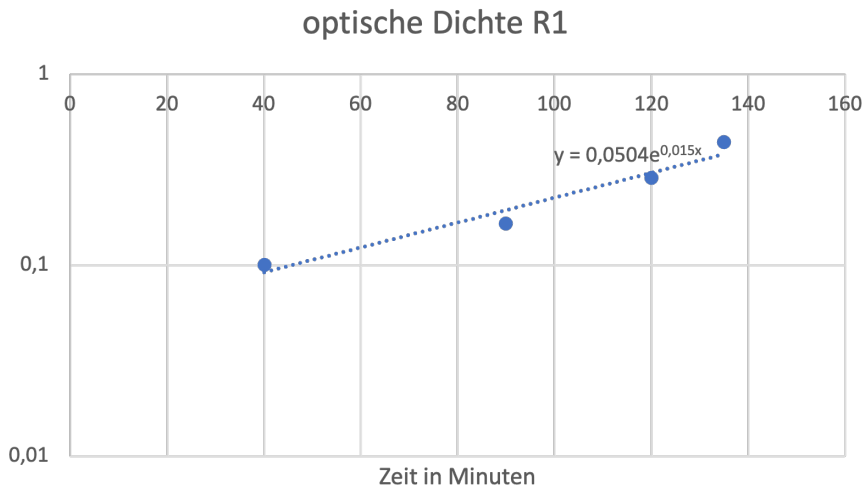


Diagramm 2: Optische Dichte vor Zugabe von IPTG - *R1*

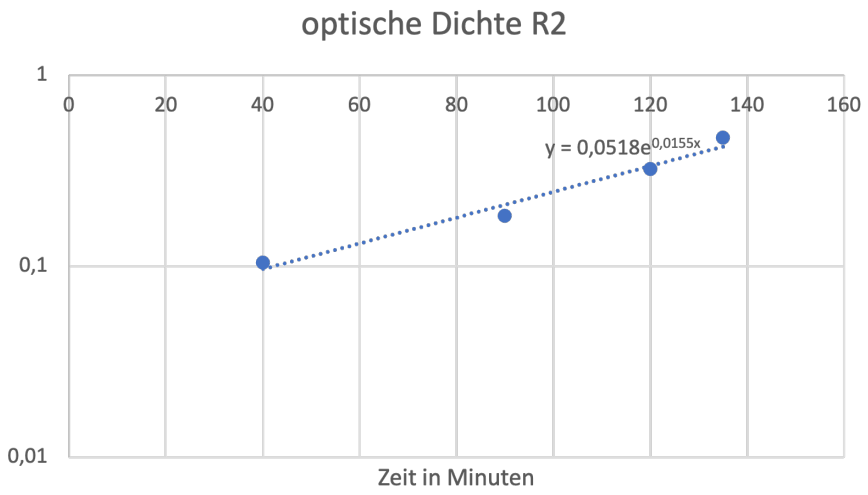


Diagramm 3: Optische Dichte vor Zugabe von IPTG - *R2*

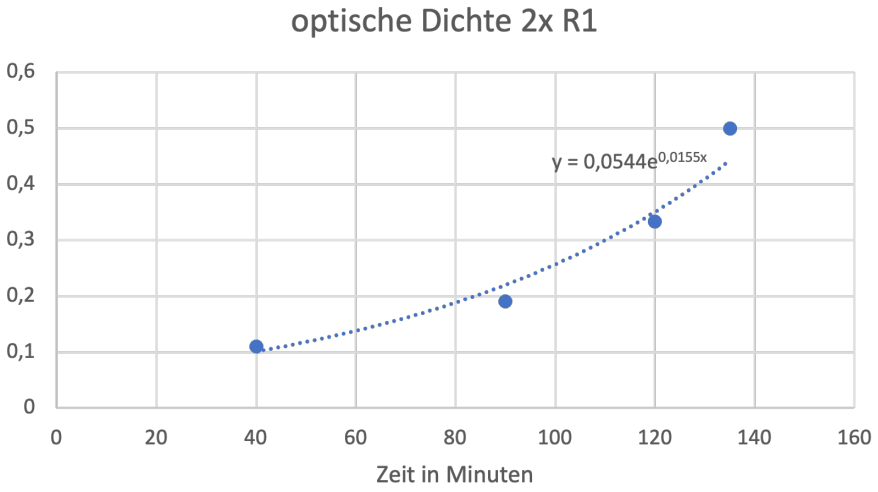


Diagramm 4: Optische Dichte vor Zugabe von IPTG - *2x R1*

Diagramm 5 zeigt die gemessene optische Dichte der drei Bakterienkulturen **nach der Zugabe von IPTG**, also nach gestarteter Proteinproduktion. Im Gegensatz zu den Graphen zuvor, fallen hier deutliche Unterschiede im Verlauf der Graphen auf. Wie zu sehen ist, wächst die Bakterienkultur von 2x *R1* am stärksten, während *R2* im Vergleich dazu eher ein schwächeres Wachstum vorweist. Die genauen Unterschiede lassen

sich in der logarithmischen Auftragung am besten zeigen.
Der rasante Anstieg am Ende des Graphens darf nicht missverstanden werden, da zwischen den letzten beiden Messungen 16 Stunden liegen.

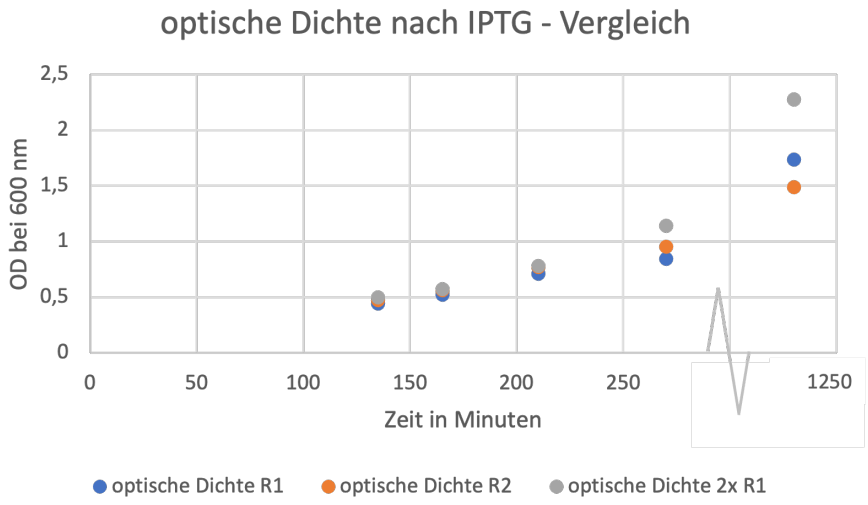


Diagramm 5: Optische Dichte nach Zugabe von IPTG - Vergleich

In Diagramm 6 ist zu sehen, dass die Wachstumsrate der Kultur von *R1* nach dem Start der Proteinproduktion bei 0,0066 pro Minute (0,369 pro Stunde) liegt. Alle Messwerte liegen dabei, wenn sie logarithmiert werden, im Rahmen der Messgenauigkeit gut auf einer Geraden. Darum kann dieses Wachstum als exponentiell bezeichnet werden.

In Diagramm 7 ist das Wachstum der Kultur von *R2* zu sehen. Die Wachstumsrate beträgt 0,0057 pro Minute, also 0,342 pro Stunde. Diese Kultur ist also weniger schnell gewachsen als die Kultur von *R1*.

Die Wachstumsrate der Bakterienkultur von *2x R1* (Diagramm 8) liegt bei 0,0076 pro Minute (0,456 pro Stunde). Diese Kultur ist also am schnellsten gewachsen, verglichen mit der von *R1* oder *R2*. Trotzdem sind die Unterschiede auch hier vernachlässigbar, weil die Proteinkonzentration später gemessen wird und die Proben somit vergleichbar gemacht werden.

Dies bedeutet, dass es für die Bakterien keinen wirklichen Unterschied macht, welches Protein sie genau produzieren. Dies ist eher überraschend, da angenommen werden könnte, dass die Kultur von *2x R1* am wenigsten wächst, da diese doppelt so große Proteine produziert wie die Bakterien der zwei anderen Kulturen. Allerdings sind die vorliegenden Unterschiede unerheblich, da die Konzentration der Lösungen später gemessen wird und sie anschließend genormt werden. Zusätzlich lässt sich nur begrenzt eine Aussage über die Menge an Zielprotein machen, da die Absorption bei 600 nm gemessen wurde, weshalb nur die Bakterien Licht absorbieren und nicht das produzierte Protein.

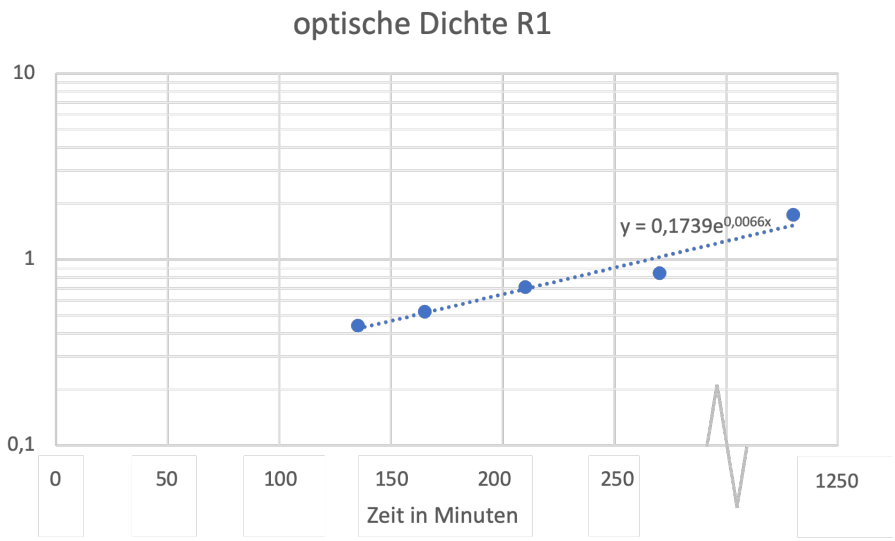


Diagramm 6: Optische Dichte nach Zugabe von IPTG - *R1*

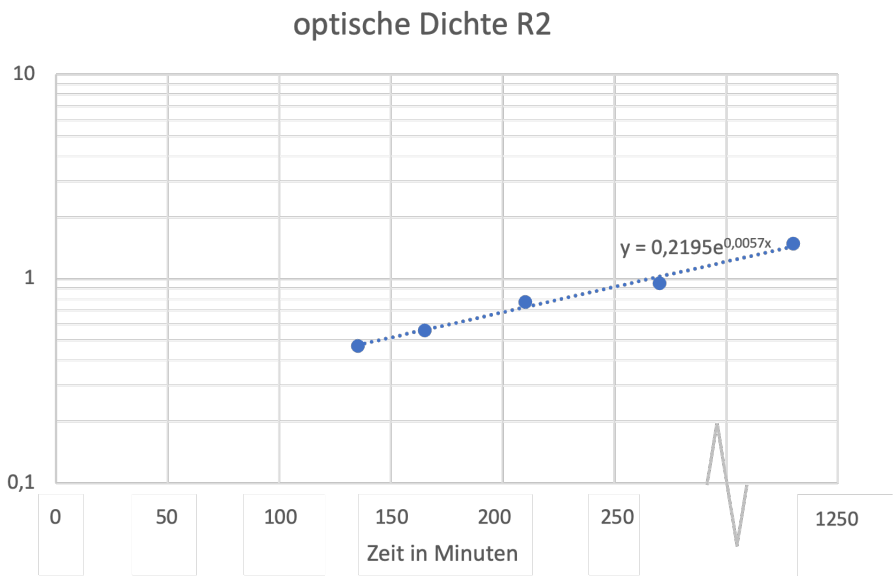


Diagramm 7: Optische Dichte nach Zugabe von IPTG - *R2*

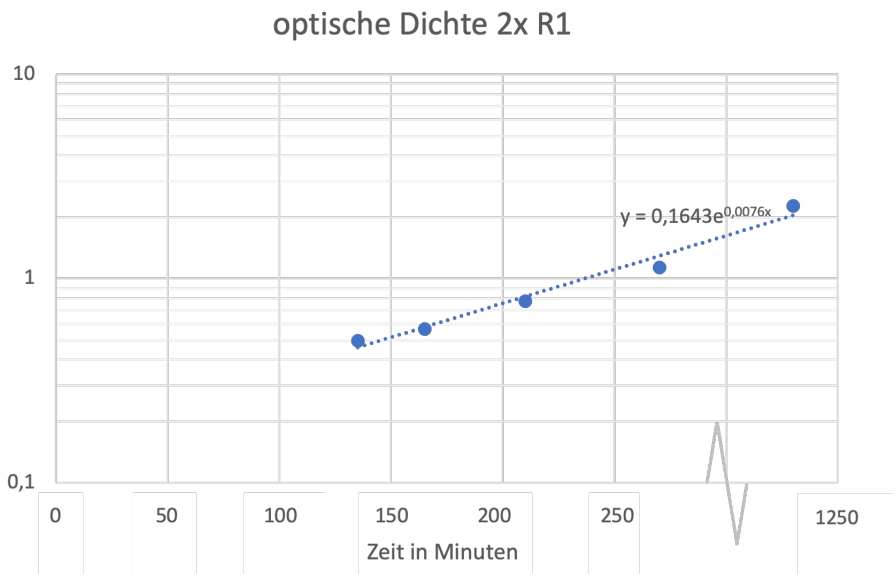


Diagramm 8: Optische Dichte nach Zugabe von IPTG - *2x R1*

In Diagramm 9 ist die in einem **Zeitraum von 20,5 Stunden** gemessene optische Dichte der Bakterienkultur von *R1* zu sehen.

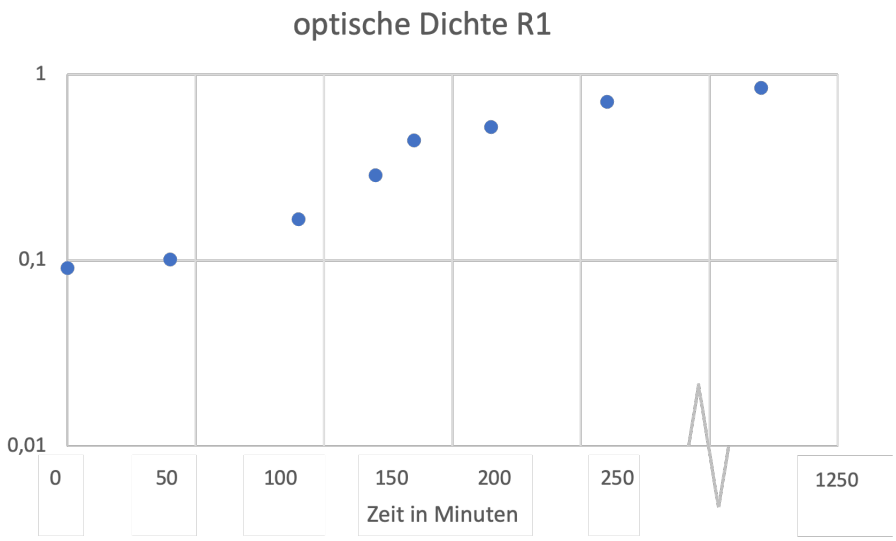


Diagramm 9: Optische Dichte - *R1*

Es ist in Diagramm 9 klar zu erkennen, die Wachstumsgeschwindigkeit ab 135 Minuten deutlich verringert ist. Dies lässt sich dadurch erklären, dass zu diesem Zeitpunkt IPTG hinzugegeben wird, was die Produktion des Zielproteins gestartet hat. Dadurch kann weniger Energie zur Zellteilung zur Verfügung gestellt werden, weshalb diese verlangsamt wird. Außerdem wird die Kultur ab diesem Zeitpunkt gekühlt, um die Zellteilungsgeschwindigkeit weiter zu reduzieren, damit die Bakterien sich möglichst nur auf die Produktion des Klebeproteins fokussieren.

Tabelle 2: Hauptkultur mit induziertem IPTG - *R1*

Probe	Uhrzeit	Laufzeit $[min]$	Verdünnung	OD
1	10:00	0	1	0,09055
2	10:40	40	1	0,1002
3	11:30	90	1	0,1651
4	12:00	120	1	0,285
5	12:15	135	2	0,44
6 (Induktion)	12:45	165	2	0,52
7 (Induktion)	13:30	210	2	0,71
8 (Induktion)	14:30	270	3	0,84
9 (Induktion)	09:14	ca. 20,5 h	10	1,74

Tabelle 2 zeigt beispielhaft den Verlauf der optischen Dichte für eine angesetzte Kultur anhand von den Messungen von *R1*. Genauso sind die Messungen auch bei *R2* und *2x R1* abgelaufen, wobei die Tabellen im Anhang zu finden sind.

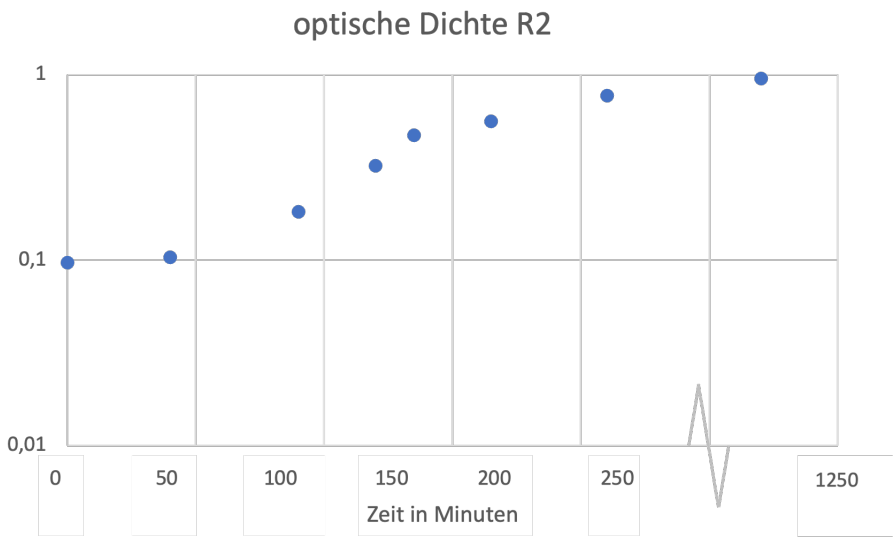


Diagramm 10: Optische Dichte - *R2*

Diagramm 10 zeigt die optische Dichte, welche bei der Bakterienkultur von *R2* gemessen wurde. Auch hier ist die höhrere Wachstumsrate zu Beginn zu sehen, gefolgt von dem Knick bei 135 Minuten und der danach geringeren Wachstumsrate.

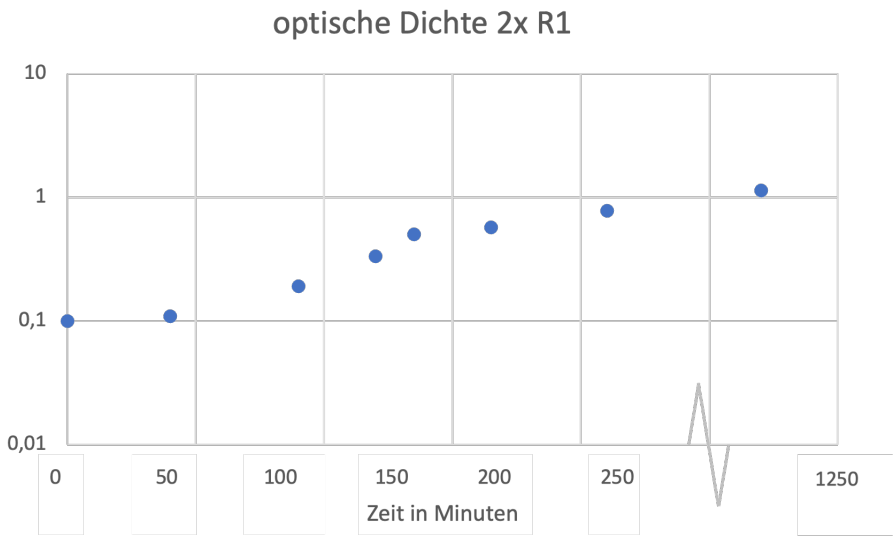


Diagramm 11: Optische Dichte - *2x R1*

Auch in Diagramm 11, welches das Wachstum der Bakterienkultur von *2x R1* zeigt, sind diese charakteristischen Stellen zu sehen.

3.2 Aufreinigung

3.2.1 Chromatographie

Das Chromatogramm kann in vier Phasen aufgeteilt werden, beginnend mit der Produktaufgabe, bei der die Lösung durch Schläuche in die Anlage geleitet werden, wobei nur das Zielprotein an die Liganden gebunden wird. Anschließend folgt der Wash, bei dem alles außer dem Klebeprotein aus der Anlage gespült wird. Danach zu sehen ist Elution 70% und 100%, was sich auf die Konzentration der Flüssigkeit bezieht, mit der die Pufferzusammensetzung verändert wird und somit die Proteine von den Liganden gelöst und herausgespült werden.

Bei dem Chromatogramm von *R1* (Abbildung 19) fällt auf, dass bei Elution 100% nochmals ein deutlicher Peak zu sehen ist, was bedeutet, dass nach Elution 70% noch relativ viele Proteine gebunden waren, die dann gelöst wurden. Dies sollte später auch in der SDS-Page zu sehen sein.
Das UV-Signal steigt gegen Ende der Beladung an, was ein dafür Zeichen ist, dass die Säule wahrscheinlich überladen ist, was auch auch daran zu erkennen ist, dass im Wash ebenfalls Protein zu finden ist.

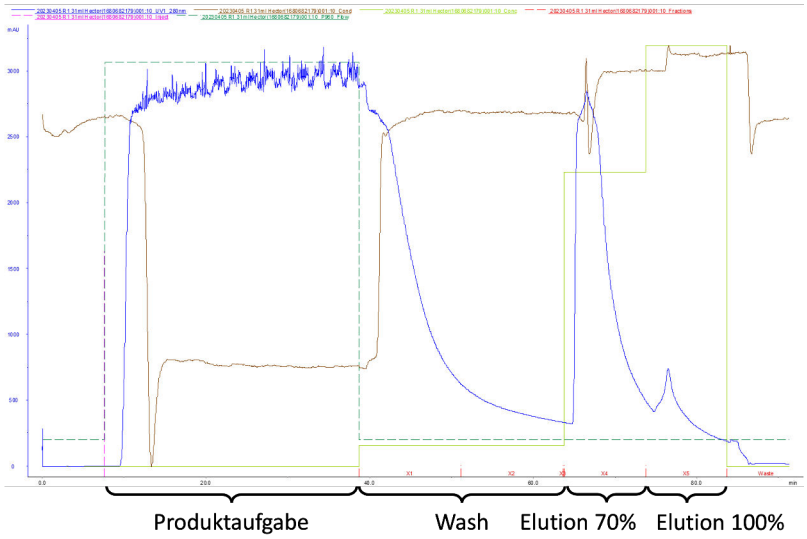


Abbildung 19: Chromatogramm von *R1*

Das Chromatogramm von *2x R1* (Abbildung 20) weist dagegen innerhalb der Elution 100% keinen auffälligen Peak auf, was bedeutet, dass eigentlich alle Proteine bei Elution 70% abgelöst werden und dies auch wieder in der SDS-Page so sichtbar sein sollte.

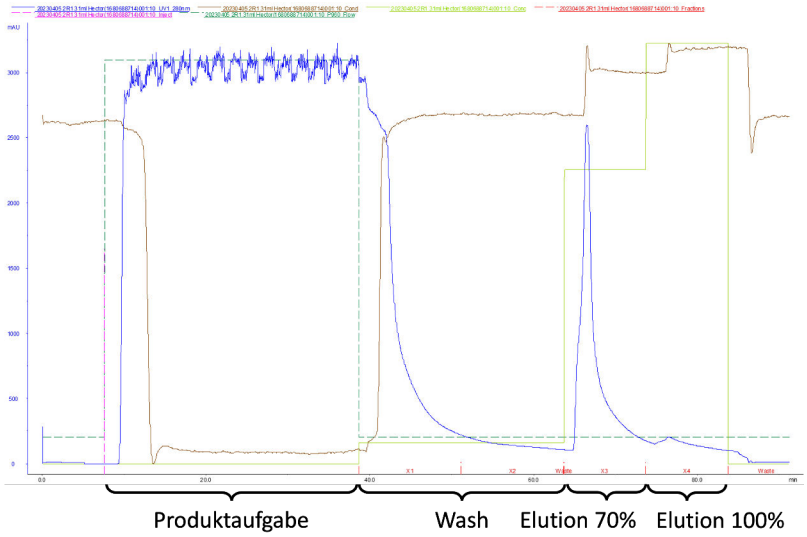


Abbildung 20: Chromatogramm von *2x R1*

Die Reinheit der einzelnen Bestandteile, die hier aufgetrennt werden, wird mittels SDS-Page überprüft und danach entschieden, ob eine weitere Chromatographie nötig ist.

3.2.2 Spektralphotometer

Die Proteinkonzentration der aufgetrennten Bestandteile wird jeweils mittels Spektralphotometrie bestimmt, damit bei den späteren Versuchen stets die gleiche Konzentration vorliegt, sodass die Versuchsergebnisse miteinander verglichen werden können.

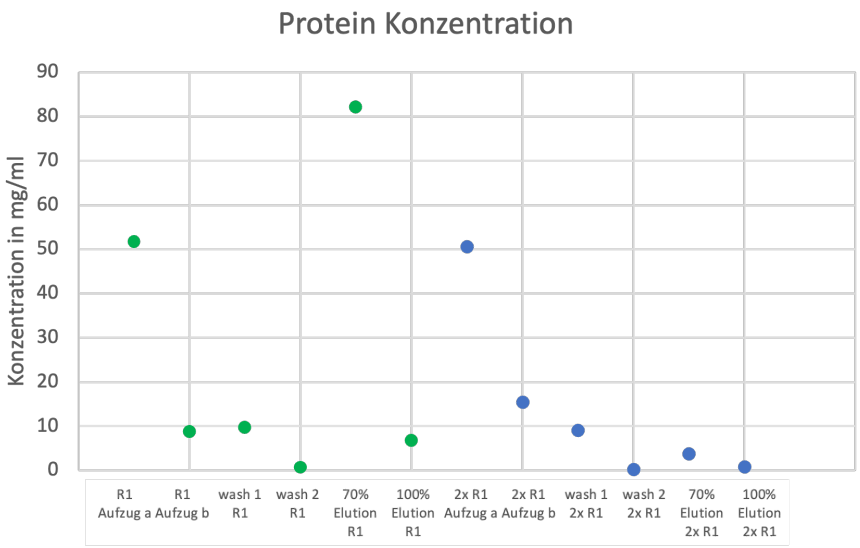


Diagramm 12: Konzentration des Proteins in den durch Chromatographie aufgetrennten Bestandteilen

In Diagramm 12 ist ersichtlich, dass bei *R1* in der Elution 70% die Konzentration des Proteins am höchsten ist. Die Bestandteile vor der Chromatographie zeigen ein überraschendes Ergebnis. Während die Konzentrationen für *2x R1* im Aufzug a vergleichbar zu *R1* im Aufzug a ist, zeigt sich in der Elution 70% eine nur geringe Konzentration des gewünschten Proteins.

3.2.3 SDS-Page

Die verschiedenen Lösungen werden gemaß der zuvor gemessenen Konzentrationen verdünnt (meist 1:10). Zu der jeweiligen Probe wird Milli Q hinzugegeben, was extrem reines Wasser ist, damit auch wirklich keine Verunreinigung stattfindet. Zuletzt wird immer das gleiche Volumen SB-Mastermix, durch das die Trenngeschwindigkeit bzw. die Trennstrecke sichtbar gemacht wird, hinzugegeben. Die Banden werden später mithilfe der Coomassie-Lösung sichtbar gemacht.
Durch verschiedene Markerproteine kann das Molekulargewicht der Proteine abgeschätzt, also das Zielprotein identifiziert und gleichzeitig der Fortschritt der elektrophoretischen Trennung überwacht werden.

Alle anderen Banden, die in Abbildung 21 und 22 zu sehen sind, stammen von anderen zelleigenen Proteinen oder Zellresten.

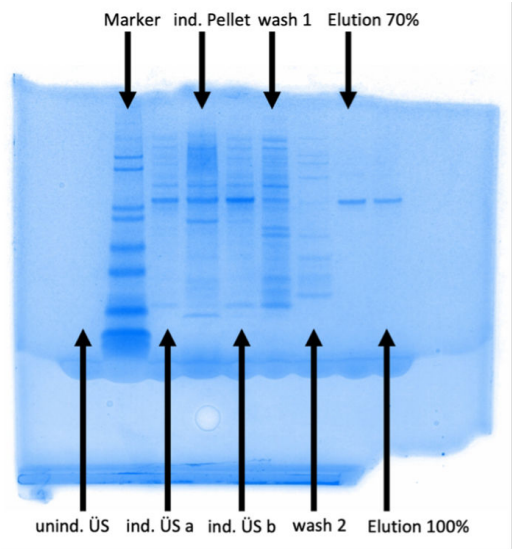


Abbildung 21: SDS-Page von *R1*

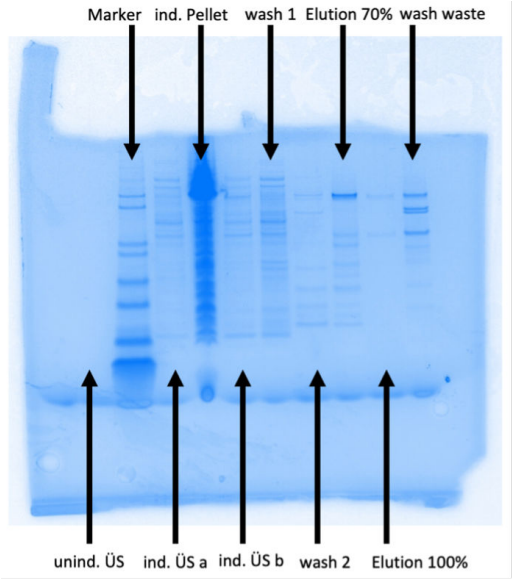


Abbildung 22: SDS-Page von *2x R1*

In Abbildung 21 ist bei Elution 70% und 100% nur noch eine Bande des Proteins zu sehen, weshalb geschlossen werden kann, dass die Aufreinigung hier sehr gut geklappt hat. Wie bereits vorhin in dem Chromatogramm durch den zweiten auffälligen Peak angedeutet, ist hier bei Elution 100% nochmals deutlich

sichtbar Protein vorhanden.

In der SDS-Page von *2x R1* (Abbildung 22) sind noch ein paar andere Proteine außer dem Klebeprotein in Elution 70%, was an den schwächeren Banden unterhalb der prominenten Proteinbande erkennbar ist. Allerdings ist die des Zielproteins immer noch am prominentesten, weshalb damit weitergearbeitet werden kann. In Elution 100% ist kaum noch Protein vorhanden, was bereits im Chromatogramm durch einen sehr schwach ausgeprägten Peak sichtbar war.

Die Aufreinigung durch die Chromatographie ist also erfolgreich.

3.3 Charakterisierung - Kleben

3.3.1 Verwendete Klebeflächenmaterialien und Proteinkonzentrationen

Die in Tabelle 3 zu sehenden Materialien wurden mithilfe der Proteinkleber in angegebenen Konzentrationen verklebt.

Tabelle 3: Verwendete Klebeflächenmaterialien und Proteinkonzentrationen

Stoff	Konzentration [$\frac{mg}{ml}$]	Glas	Moosgummi	Holz	Knochen
BSA	25	X	-	-	-
	50	X	X*	-	X*
R1	50	X	X*	-	X*
	320	X	X*	X*	X*
R1 & Glycerin	50	X	-	-	-
BSA & Glycerin	50	X	-	-	-
Glycerin		X	-	-	-

*benetzt schlecht und zieht relativ schnell ein

BSA (Bovines Serumalbumin) ist ein Protein aus dem Blutserum von Rindern und wird gerne in der Biochemie verwendet, falls ein Protein zum Vergleich benötigt wird [8].

Hierbei werden mehrere Versuchsreihen mit Glycerin durchgeführt, da der Kleber bei porösen Materialien wie Knochen oder Holz, aber auch Moosgummi - wenn auch nicht so stark - in das Material eingedrungen ist, bevor der Kleber auf den Oberflächen trocknen konnte. Durch Glycerin wird deshalb versucht, den Kleber viskoser zu machen, damit genau dies nicht passiert. Allerdings ist der Kleber dann selbst nach einer Woche nicht mehr getrocknet. Eine Alternative wäre die Verwendung von Alginat, welches allerdings erhitzt werden müsste, damit es fest wird, was das Protein denaturieren und somit zerstören würde. Deshalb wird immer noch nach einer Lösung gesucht.

3.3.2 Zugscherversuche

In den folgenden Diagrammen ist der Durchschnitt von drei bis fünf Messungen und ihre jeweilige Standardabweichung für die Zugscherfestigkeit dargestellt.
Nicht in den Mittelwerten enthalten sind Messungen, die aufgrund von Funktionsfehlern der Tischapparatur,

Bruch der Trägermaterialien , o.ä. augenscheinlich keinen sinnvollen Beitrag leisten.
Die grünen Punkte beschreiben dabei die Messungen von *BSA*, während die blauen sich auf *R1* beziehen. Die Konzentrationen der jeweiligen Proteine variieren von 25 $\frac{mg}{ml}$ über 50 $\frac{mg}{ml}$ bis zu 320 $\frac{mg}{ml}$, wobei das Material sich hier auf Glas und Moosgummi beschränkt, weil die Holz- und Knochen-Platten bereits bei leichtem Berühren auseinandergefallen sind.

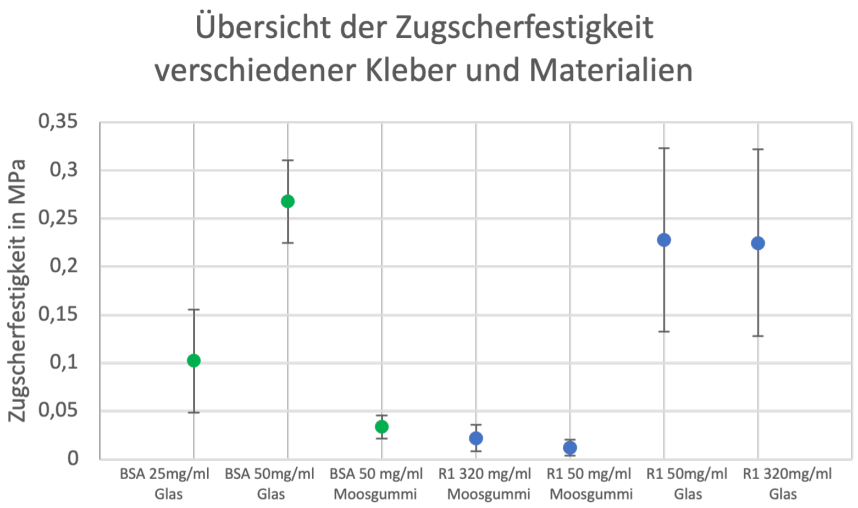


Diagramm 13: Übersicht der Zugscherfestigkeit verschiedener Kleber und Materialien

In Diagramm 13 fällt auf, dass die Werte der Messungen mit Glas sehr viel höher liegen als die mit Moosgummi, was zumindest zum Teil an der poröseren Oberfläche liegt.
Weiterhin ist zu sehen, dass die Konzentration des *BSA* einen großen Unterschied macht, während dieser eher kleiner bei *R1* zu sein scheint. Allerdings fehlen bei *R1* Messwerte mit einer Konzentration von 25 $\frac{mg}{ml}$. Man kann aber in guter Näherung annehmen, dass die Konzentration ab einem gewissen Wert keine große Rolle mehr spielt, da das Material und der Kleber gesättigt sind.
Im Allgemeinen liegt die Zugscherfestigkeit von BSA höher als *R1*, obwohl es auch einzelne Werte von *R1* gibt, die höher liegen als der Mittelwert von *BSA*. Nichtsdestotrotz hat der Proteinkleber auf Oberflächen wie Glas gute Klebeeigenschaften im Größenordnungsbereich von BSA.
Zuletzt ist auffällig, dass die Werte von *R1* sehr viel mehr schwanken als die von *BSA*, was an der Standardabweichung zu sehen ist. Die tatsächlichen Werte müssen also auch hier durch weitere Messungen überprüft werden.

In Tabelle 4 sind nochmals die Mittelwerte der jeweils drei bis fünf Messungen gezeigt.

Tabelle 4: Mittelwerte der Messungen

Protein	Konzentration	Material	Kraftmaximum [N]	Zugscherfestigkeit [MPa]
BSA	$25\frac{mg}{ml}$	Glas	25,02	0,102
BSA	$50\frac{mg}{ml}$	Glas	65,63	0,2676
BSA	$50\frac{mg}{ml}$	Moosgummi	8,26	0,0337
R1	$320\frac{mg}{ml}$	Moosgummi	5,42	0,0221
R1	$50\frac{mg}{ml}$	Moosgummi	3,01	0,0123
R1	$50\frac{mg}{ml}$	Glas	55,91	0,2279
R1	$320\frac{mg}{ml}$	Glas	55,16	0,2249

3.3.3 Weitere Versuche

Die Messung der Schälbelastung hat leider nicht funktioniert, da der Kleber die Materialien (in diesem Fall Moosgummi) so gut zusammen gehalten hat, dass das Material eher zerrissen ist, statt sich voneinander zu lösen. Aus diesem Grund konnten hier keine Messwerte erhoben werden.

Die Messung der Zugbelastung (Blockversuch) konnte leider aus zeitlichen Gründen nicht mehr umgesetzt werden, wobei die Erkenntnisse aus diesem Versuch vermutlich interessant gewesen wären, da die Bewegung in eine andere Richtung geht.

4 Diskussion und Ausblick

Das Ziel dieses Projektes, einen nachhaltigen und biobasierten Kleber herzustellen, war erfolreich.

Es wurden im Verlauf eines Jahres drei Bakterienkulturen gezüchtet, welche die Zielproteine hergestellt haben. Alle drei Kulturen haben dabei am Ende der Kultivierung ähnliche Zelldichten, obwohl die Kultur von *2x R1* überraschenderweise zusätzlich zur Herstellung eines doppelt so großen Proteins noch die höchste Wachstumsrate aufwies.
Die gewünschten Proteine wurden aus den Zellen der Bakterien extrahiert und wurden nach dem Zellaufschluss durch Chromatographie getrennt.
Die Aufreinigung hat ebenfalls gute Ergebnisse geliefert, was mithilfe von SDS-Page überprüft wurde. Dabei lagen beide Proteine danach eigentlich in Reinform vor.
In der letzten Phase wurde der biobasierte Kleber getestet und herausgefunden, dass dieser besser auf weniger porösen Oberflächen funktioniert. Daraufhin wurden Versuche gestartet, den Kleber viskoser zu machen - bis jetzt noch erfolglos. Dies ist besonders wichtig, da ein späteres Einsatzgebiet in der Medizin als Knochenkleber ist.
Trotzdem hat der Proteinkleber sehr gut auf Oberflächen wie Glas funktioniert und zeigte eine ähnlich große Zugscherfestigkeit wie BSA.

Im Moment ist der Kleber leider noch nicht einsatzbereit, hauptsächlich da er mehr getestet und untersucht werden muss. Es ist außerdem nicht klar, ob andere Kombinationen der beiden Teilproteine, wie zum Beispiel *R1-R2* sogar noch besser kleben. Auch ob der Kleber unter Wasser klebt, konnte noch nicht überprüft werden, was ihn maßgeblich von anderen biobasierten Klebern absetzen würde. Letzlich muss der Kleber noch viskoser gemacht werden, wofür es bereits Ansätze gibt, welche aber bisher noch nicht umgesetzt wurden.

Generell zeigen die in dieser Arbeit beschriebenen Prozesse und biobasierten Kleber ein großes Einsatzpotenzial, welche aber noch weitere Untersuchungen erfordern, insbesondere der Einsatz auf porösen Oberflächen muss ermöglicht und die Verwendung unter Wasser getestet werden.

5 Danksagung

Wir bedanken uns herzlich bei allen, die uns die Arbeit an diesem Projekt möglich gemacht haben.

Dazu zählen in erster Linie Frau Julia Hilsendegen, Frau Kristina Schleining, Frau Birgit Roser, Frau Dr. Iris Perner-Nochta und Herr Prof. Jürgen Hubbuch des KITs, die es uns ermöglicht haben, in deren Laboren dieses Projekt durchzuführen und die uns währenddessen begleitet haben. Für Ihr Engagement und Ihre Bereitschaft, uns zu helfen, bedanken wir uns sehr herzlich.

Unser Dank gilt ebenfalls Dr. Hans-Werner und Josephine Hector für Ihre Stiftung des Hector-Seminars. Für die zahlreichen Eindrücke und vertiefenden Einblicke in das wissenschaftliche Arbeiten, die wir dadurch erhalten konnten, möchten wir uns bedanken.

Zuletzt möchten wir gerne unseren Kursleiterinnen und Kursleitern, die uns am Hector-Seminar begleitet haben, danken. Ihre Unterstützung war über die Jahre hinweg tragend für unsere Zeit im Hector-Seminar und die folgenden Jahre. Hervorheben möchten wir hier Norbert Krieg und Thomas Knecht, die uns maßgeblich in diesem letzten Jahr begleitet haben.

6 Literaturverzeichnis

[1] Wunderer, Ladurner et al., P. Nat. Academy of Sciences, 2019 (https://www.uibk.ac.at/cmbi/downloads/cmbi-broschuere-2018-2021.pdf)

[2] https://goldbio.com/articles/article/the-easiest-to-understand-overview- of-protein-expression

[3] J. Gegner, Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 2008, 39 (1), 33 – 44. DOI: 10.1002/mawe.200700228.

[4] K. Redaktion, Schlütersche Fachmedien GmbH Do, 2019.

[5] P. Bertemes, R. Pjeta, J. Wunderer, A. L. Grosbusch, B. Lengerer, K. Grüner, M. Knapp, B. Mertens, N. Andresen, M. W. Hess, S. Tomaiuolo, A. Zankel, P. Holzer, W. Salvenmoser, B. Egger, P. Ladurner, International journal of molecular sciences 2021, 22 (22). DOI: 10.3390/ijms222212228.

[6] J. Wunderer, B. Lengerer, R. Pjeta, P. Bertemes, L. Kremser, H. Lindner, T. Ederth, M. W. Hess, D. Stock, W. Salvenmoser, P. Ladurner, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2019, 116 (10), 4297 – 4306. DOI: 10.1073/pnas.1814230116.

[7] A. V. Pocius, Adhesion and adhesives technology: An introduction, 4th ed., Hanser Publications, Cincinnati 2021.

[8] Liqing Wu, Bin Yang, Jiaming Bi, Jing Wang, Development of bovine serum albumin certified reference material

7 Anhang

7.1 Tabellen der Kultivierung

Tabelle 5: Hauptkultur mit induziertem IPTG - *R1*

Probe	Uhrzeit	Laufzeit $[min]$	OD - BW	Verdünnung	OD
1	10:00	0	0,09055	1	
2	10:40	40	0,1002	1	
3	11:30	90	0,1651	1	
4	12:00	120	0,285	1	
5	12:15	135		2	0,44
6 (Induktion)	12:45	165		2	0,52
7 (Induktion)	13:30	210		2	0,71
8 (Induktion)	14:30	270		3	0,84
9 (Induktion)	09:14	ca. 20,5 h		10	1,74

Tabelle 6: Hauptkultur mit induziertem IPTG - *R2*

Probe	Uhrzeit	Laufzeit $[min]$	OD - BW	Verdünnung	OD
1	10:05	0	0,09705	1	
2	10:42	40	0,10375	1	
3	11:32	90	0,18245	1	
4	12:04	120	0,3221	1	
5	12:20	135		2	0,47
6 (Induktion)	12:50	165		2	0,56
7 (Induktion)	13:33	210		2	0,77
8 (Induktion)	14:30	270		3	0,95
9 (Induktion)	09:14	ca. 20,5 h		10	1,49

Tabelle 7: Hauptkultur mit induziertem IPTG - *2x R1*

Probe	Uhrzeit	Laufzeit $[min]$	OD - BW	Verdünnung	OD
1	10:11	0	0,09995	1	
2	10:44	40	0,1094	1	
3	11:34	90	0,1902	1	
4	12:06	120	0,33245	1	
5	12:22	135		2	0,499
6 (Induktion)	12:55	165		2	0,57
7 (Induktion)	13:36	210		2	0,78
8 (Induktion)	14:30	270		3	1,14
9 (Induktion)	09:14	ca. 20,5 h		10	2,27

7.2 Tabellen der SDS-Page

Tabelle 8: Proben der *R1*-Kultur

R1	1	2	3	4	5	6
Probe		unind. ÜS	Marker	ind. ÜS a	ind. Pellet	ind. ÜS b
c unv. $[\frac{mg}{ml}]$		(1:10)		51,7 (1:10)	(1:10)	8,7
V_Sample [µl]		13		3,9	13	2,3
V_Milli Q [µl]		0		9,1	0	10,7
V_SB-Mastermix [µl]		7		7	7	7
V_total [µl]		20		20	20	20

R1	7	8	9	10	11	12
Probe	wash 1	wash 2	Elution 70%	Elution 100%		
c unv. $[\frac{mg}{ml}]$	9,7	0,7	82,1 (1:10)	6,8		
V_Sample [µl]	2,1	13	2,4	3		
V_Milli Q [µl]	10,9	0	10,6	10		
V_SB-Mastermix [µl]	7	7	7	7		
V_total [µl]	20	20	20	20		

Tabelle 9: Proben der *2x R1*-Kultur

2x R1	1	2	3	4	5	6
Probe		unind. ÜS	Marker	ind. ÜS a	ind. Pellet	ind. ÜS b
c unv. [$\frac{mg}{ml}$]		(1:10)		50,5 (1:10)	(1:10)	15,4
V_Sample [µl]		13		4	13	1,3
V_Milli Q [µl]		0		9	0	11,7
V_SB-Mastermix [µl]		7		7	7	7
V_total [µl]		20		20	20	20

2x R1	7	8	9	10	11	12
Probe	wash 1	wash 2	Elution 70%	Elution 100%	wash waste	
c unv. [$\frac{mg}{ml}$]	9	0,2	3,7	0,8		
V_Sample [µl]	2,2	13	5,4	13	13	
V_Milli Q [µl]	10,8	0	7,6	0	0	
V_SB-Mastermix [µl]	7	7	7	7	7	
V_total [µl]	20	20	20	20	20	

7.3 Tabellen Zugscherversuche

Tabelle 10: Messungen mit Glas und *BSA* 25 $\frac{mg}{ml}$

Probe	Kraftmaximum [N]	Zugscherfestigkeit [MPa]	Kommentar
1	-2,79	-0,0114	
2	19,32	0,0787	
3	40,08	0,1634	
4	15,67	0,0639	
5			Gewicht hat an der Fügung geklebt, welche beim Abmachen kaputt gegangen ist

Tabelle 11: Messungen mit Glas und *BSA* 50 $\frac{mg}{ml}$

Probe	Kraftmaximum [N]	Zugscherfestigkeit [MPa]	Kommentar
1	67,93	0,277	Gewicht hat sich an der Fügung festgeklebt
2	52,82	0,2153	
3	78,17	0,3187	Gefüge etwas schief geklebt, deshalb Vorkraft von ca. 3 N
4	63,58	0,2592	
5			schief geklebt

Tabelle 12: Messungen mit Moosgummi und *BSA* 50 $\frac{mg}{ml}$

Probe	Kraftmaximum [N]	Zugscherfestigkeit [MPa]	Kommentar
1	3,84	0,0156	
2	9,88	0,0403	
3	10,08	0,0411	
4	9,25	0,0377	

Tabelle 13: Messungen mit Moosgummi und *R1* 320 $\frac{mg}{ml}$

Probe	Kraftmaximum [N]	Zugscherfestigkeit [MPa]	Kommentar
1	6,11	0,0249	
2	0,76	0,0031	
3	5,92	0,0241	
4	8,91	0,0363	

Tabelle 14: Messungen mit Moosgummi und *R1* 50 $\frac{mg}{ml}$

Probe	Kraftmaximum [N]	Zugscherfestigkeit [MPa]	Kommentar
1	2,64	0,0108	
2	5,21	0,0212	
3	1,17	0,048	versehentlich vor dem Versuch Position geändert

Tabelle 15: Messungen mit Glas und *R1* 50 $\frac{mg}{ml}$

Probe	Kraftmaximum [N]	Zugscherfestigkeit [MPa]	Kommentar
1	37,02	0,1509	
2	41,6	0,1696	hat beim Einspannen leicht geknackt
3	38,03	0,155	
4	79,94	0,3259	
5	82,95	0,3382	

Tabelle 16: Messungen mit Glas und *R1* 320 $\frac{mg}{ml}$

Probe	Kraftmaximum [N]	Zugscherfestigkeit [MPa]	Kommentar
1	32,33	0,1318	
2	4,27	0,0174	Probe 1 war nicht richtig getrennt, weshalb Probe 1 und 2 gleich sind
3	67,78	0,2763	
4	38,32	0,1562	Vorkraft ging nicht niedriger als 3 N
5	82,2	0,3351	
6	5,39	0,022	hat beim Einspannen geknackt