



Fakultät Life Sciences

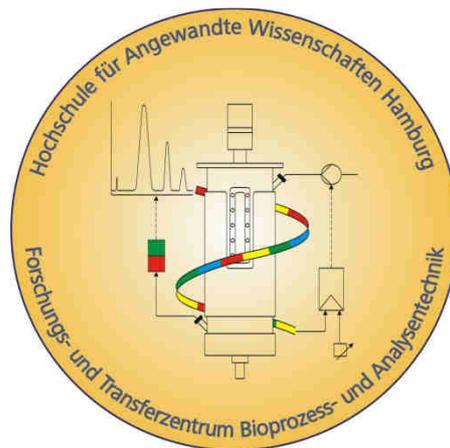
Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Hamburg University of Applied Sciences

## Bachelorarbeit

Biotechnologie

Expression des antimikrobiellen Peptides NK-2 in der Variante  
C7A-M11L-D21K in *Pichia pastoris*.



Jakob Christian Brandt

31. Juli 2015

1. Gutachter

Prof. Dr. Jörg Andrä  
(HAW Hamburg)

2. Gutachterin

Prof. Dr. Gesine Cornelissen  
(HAW Hamburg)

# I. Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Thema „Expression des antimikrobiellen Peptides NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K in *Pichia pastoris*“ ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Jakob Christian Brandt

Hamburg, den 31.07.2015

## II. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Forschungs- und Transferzentrum für Bioprozess- und Analysetechnik der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Gesine Cornelissen und Prof. Dr. Jörg Andrä für die Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit bedanken, sowie für das interessante Thema und die zur Verfügung gestellten Geräte und Materialien.

Besonderer Dank gilt meinem Laborpartner Jan Demmer, der mich perfekt aufgenommen und vorbildlich in die Thematik eingearbeitet hat.

Außerdem möchte ich dem Team des BPA-Labors für die tolle Integrierung in die Arbeitsgruppe und die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danken.

# III. Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Kurzfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Das Expressionssystem <i>Pichia pastoris</i></b> .....	<b>5</b>
<b>5</b>	<b>Antimikrobielle Peptide</b> .....	<b>7</b>
5.1	Arten und Vorkommen von antimikrobiellen Peptiden .....	8
5.2	Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden .....	10
5.2.1	Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden gegen Mikroorganismen .....	10
5.2.1.1	Antimikrobielle Aktivität durch Interaktion mit der Zellmembran.....	10
5.2.1.2	Antimikrobielle Aktivität durch zellinterne Wirkung.....	13
5.2.2	Weitere Wirkungsweisen von antimikrobiellen Peptiden und ihre Anwendungsgebiete.....	13
5.3	NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K.....	15
5.3.1	Bisherige Expression von antimikrobiellen Peptiden in <i>Pichia pastoris</i> .....	18
<b>6</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
6.1	<i>Pichia pastoris</i> SMD1168 mit Gen für NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K.....	21
6.2	Produktionsstrategie und Bioreaktor Biostat® ED5 .....	22
6.2.1	Aufbau des Bioreaktors Biostat® ED5.....	22
6.2.2	Fermentationsstrategie zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden in <i>Pichia pastoris</i> .....	24
6.3	Agarosediffusionstest.....	27
6.3.1	Durchführung des Agarosediffusionstest.....	27
6.3.2	Auswertung des Agarosediffusionstest mittels ImageJ.....	28
<b>7</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>29</b>
7.1	Analyse der Fermentation im Bioreaktor Biostat® ED5 .....	29
7.1.1	Bilanzierungsgleichungen .....	29
7.1.2	Analyse der Fermentation JDJB2015 .....	33
7.2	Auswertung des Agarosediffusionstest.....	42

7.3	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	47
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>52</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>11</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>12</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>57</b>
12.1	Medien und Ansätze.....	57
12.1.1	Medien und Vorlagen der Fermentation .....	57
12.1.2	Ansätze für den Agarosediffusionstest .....	59
12.2	Verwendete Chemikalien.....	60
12.3	Verwendete Geräte .....	62
12.4	Standardarbeitsanweisung zum Agarosediffusionstest.....	64

# 1 Kurzfassung

Die Zahl der antibiotikaresistenten pathogenen Mikroorganismen hat in den vergangenen Jahren immer weiter zugenommen. Daher liegt der Fokus der aktuellen Forschung unter anderem auf der Suche nach Alternativen zu den klassischen Antibiotika. Eine dieser Alternativen ist die Stoffklasse der antimikrobiellen Peptide.

Ein besonders aussichtsreicher Kandidat innerhalb der Gruppe der antimikrobiellen Peptide ist NK-2. Da die chemische Synthese mit ca. 1000 €/mg sehr teuer ist, soll der Versuch unternommen werden, dieses Peptid in der rekombinanten Hefe *Pichia pastoris* herzustellen. Hierzu wurde in einer vorhergehenden Bachelorarbeit das Gen für NK-2 in das Genom von *P. pastoris* eingebaut.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieser Stamm in einem hochinstrumentierten Bioreaktor Biostat® ED5 der Firma Sartorius kultiviert und mittels Methanolinduktion zur Produktion des Zielpeptides angeregt. Während der Fermentation wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und mittels Agarosediffusionstest hinsichtlich antimikrobieller Aktivität analysiert.

Die Fermentation wurde auf Grundlage der aufgezeichneten Messwerte und der daraus abgeleiteten Stoffwechselfparameter ausgewertet. Die Analyse der Messwerte zeigt ein Maximum von verschiedenen Stoffwechselfparametern bei einer Prozesszeit von 54 h, also 31 h nach Produktionsstart.

Die Auftragung der Proben auf den Agarosediffusionstest zeigte keine antimikrobielle Aktivität im Überstand. Ebenso konnte keine Aktivität in den aufgeschlossenen Zellen nachgewiesen werden. Allerdings hat sich herausgestellt, dass jeder Medienbestandteil des Fermentationsmediums für sich bereits die Aktivität des synthetischen Peptides NK-2 in einer Konzentration von 50 µg/ml vollständig hemmt.

Im Rahmen einer anderen Arbeit wurden die Fermentationsproben mittels SDS-PAGE analysiert. Es konnte eine Bande auf Höhe des synthetischen Referenzpeptides nachgewiesen werden, die erst nach Induktion mit Methanol sichtbar wird. Proben, die vor der Induktion genommen wurden, zeigten keine Bande auf Höhe der Referenz.

Somit könnten die Ergebnisse des Agarosediffusionstests und der SDS-PAGE darauf hindeuten, dass während der Kultivierung von *P. pastoris* erfolgreich das Zielpeptid NK-2 exprimiert und in das Medium sekretiert wurde, es aber aufgrund von Medienbestandteilen in seiner Aktivität gehemmt wird und daher nicht im Agarose-diffusionstest nachgewiesen werden kann.

## 2 Abstract

The number of antibiotic-resistant pathogenic microorganisms has steadily increased in recent years. That is why current research is focusing on finding alternatives to classical antibiotics. One of these alternatives is the class of antimicrobial peptides.

A promising candidate within the class of antimicrobial peptides is NK-2. The chemical synthesis being very expensive (ca. 1000 €/mg), an attempt of recombinant production of that peptide in the yeast *Pichia pastoris* is to be made. To this end, the gene for NK-2 was integrated in the genome of *P. pastoris* in the course of a prior Bachelor thesis.

For the present work, this strain was cultivated in a highly instrumented bioreactor Biostat<sup>®</sup> ED5 from Sartorius and stimulated to produce the targeted peptide by methanol induction. During the fermentation, samples were taken at regular intervals and analysed in terms of antimicrobial activity by use of Agar Diffusion Assay.

The fermentation was analysed in terms of recorded measured values and the metabolic parameters derived therefrom. The analysis of the measurement data of the fermentation reveals a maximum of a variety of metabolic parameters after ca. 54 h, thus 31 h after start of production.

In the course of different thesis, the samples of the fermentation were analysed by use of SDS-PAGE. A band which only becomes visible after methanol induction could be detected at the height of the synthetic reference peptide. Samples taken before induction do not show any band at the height of the reference.

The application of samples on the Agar Diffusion Assay did not show any antimicrobial activity in the supernatant. Neither was there any activity to be detected in open cells. However, it emerged that each component of the fermentation medium itself already entirely inhibits the activity of the synthetic peptide NK-2 in a concentration of 50 µg/ml.

So, the results of Agar Diffusion Assay and SDS-PAGE indicate a successful expression of the targeted peptide during the cultivation of *P. pastoris* as well as its secretion into the medium. The activity of the targeted peptide, however, is inhibited by components of the medium and therefore cannot be identified in the Agar Diffusion Assay.

### 3 Einleitung und Zielsetzung

Die Zahl der Antibiotikaresistenzen pathogener Mikroorganismen hat in den vergangenen Jahren immer weiter zugenommen. Daher steigt der Bedarf an wirksamen und kostengünstigen Alternativen zu konventionellen Antibiotika immer weiter. Im März 2015 wurde vom Bundesministerium für Gesundheit ein 10-Punkte-Plan zur Bekämpfung von Antibiotikaresistenzen vorgestellt. Punkt 8 dieses Plans sieht vor, die Forschung an möglichen Alternativen stärker zu fördern (Bundesministerium für Gesundheit 2015).

Eine dieser Alternativen ist die Stoffgruppe der antimikrobiellen Peptide (AMP). Antimikrobielle Peptide bestehen meist aus ca. 20 bis 40 Aminosäuren und sind reich an den Aminosäuren Lysin und Arginin, wodurch ein kationischer Ladungsüberschuss entsteht. Des Weiteren liegen sich innerhalb der Sekundärstruktur hydrophobe und hydrophile Aminosäuren gegenüber und erzeugen somit ein amphipatisches Molekül (Hancock & Lehrer 1998).

AMPs sind Teil des angeborenen Immunsystems und in nahezu jeder höheren Lebensform nachweisbar. Besonders bei Pflanzen und Insekten, die über kein adaptives Immunsystem verfügen, sind AMPs stark verbreitet. Aber auch beim Menschen oder anderen Säugetieren sind viele AMPs bekannt. Inzwischen wurden über 2500 verschiedene Arten charakterisiert und jedes Jahr kommen ca. 100 weitere hinzu (Zasloff 2002; Wang et al. 2015).

Ihre antimikrobielle Wirkung erhalten die Peptide durch die bereits beschriebenen Eigenschaften. Durch die starke positive Ladung lagern sich die Peptide an die negativ geladene Membran von Bakterien an. In Gegenwart der Membran bildet sich der amphipatische Charakter aus, aufgrund dessen das Peptid mit den hydrophoben Teilen zur Bakterienmembran ausrichtet wird. Schließlich dringen die Peptide in die Membran ein und die Zellen lysieren. Dieses auf rein biophysikalischen Wechselwirkungen beruhende Wirkprinzip macht AMPs so interessant für die pharmakologische Forschung, da es Bakterien kaum möglich ist, hiergegen Resistenzen auszubilden (Nguyen et al. 2011).

Als besonders aussichtsreicher Kandidat hat sich NK-2 herausgestellt, ein Peptid, das nicht nur gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen, sondern auch gegen bestimmte Krebszellen Wirkung zeigt (Gross et al. 2013).

NK-2 ist das Zielpeptid der vorliegenden Arbeit. Es ist eine verkürzte Variante von NK-Lysin. NK-Lysin wurde erstmals in den Natural-Killer-Zellen im Darm von Schweinen

nachgewiesen. NK-2 ist die aktive Region von NK-Lysin, die sich innerhalb NK-Lysins von Aminosäure 39 bis 65 erstreckt (Andersson et al. 1995; Andrä et al. 2007).

Da aber die Herstellung von AMPs über den klassischen Syntheseweg sehr teuer ist und nur geringe Menge produziert werden können, wird immer häufiger der Versuch unternommen, diese Peptide rekombinant herzustellen (Van 't Hof et al. 2001; Jin et al. 2013).

Bei der rekombinanten Herstellung von Peptiden wird das Gen, welches für das Peptid codiert, in das Genom eines geeigneten Expressionssystems eingebaut. Im Fall der vorliegenden Arbeit wurde das Gen für das Peptid NK-2 in die einzellige, methanotrophe Hefe *P. pastoris* eingebracht (Jordan 2015).

Die Expression in der sehr gut erforschten eukaryotischen *P. pastoris* bietet viele Vorteile, so z. B. die post-translationale Modifikation von Proteinen. Des Weiteren ist *P. pastoris* durch die Zellwand weit weniger anfällig gegen AMPs als es z. B. das ebenfalls gängige prokaryotische Expressionssystem *E. coli* wäre.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die rekombinante Hefe *P. pastoris* in einem hochinstrumentierten 5.5 l Bioreaktor Biostat® ED5 der Firma Sartorius zu kultivieren und das Peptid NK-2 herzustellen. In der anschließenden Analytik sollte festgestellt werden, ob und wie viel Peptid erzeugt wurde und ob dieses gegen Mikroorganismen aktiv ist.

## 4 Das Expressionssystem *Pichia pastoris*

Bei *Pichia pastoris* handelt es sich um eine Hefeart, die Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen kann. Im Methanolstoffwechsel katalysiert das Enzym Alkoholoxidase (AOX) die Reaktion von Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid. Da aber die Affinität der Alkoholoxidase zum Sauerstoff relativ gering ist, wird von der Zelle eine verhältnismäßig große Menge an Enzym produziert.

Die Alkoholoxidase wird mittels zweier Gene, dem AOX1- und dem AOX2-Gen codiert, wobei AOX1 für den Großteil der Stoffwechselleistung verantwortlich ist. Bei Zellen, die auf Methanol wachsen, beträgt der Anteil der RNA, die für AOX codiert, ca. 5 % der Gesamt-RNA. Wächst *P. pastoris* jedoch auf einer anderen Kohlenstoffquelle, so ist keine AOX-RNA nachweisbar. Dies zeigt, wie stark der Promotor für die AOX-Gene ist und wie definiert die Expression initiiert werden kann (Cregg & Madden 1988; Ahmad et al. 2014).

Mitte der 1970er Jahre war Methanol sehr günstig, da es aus dem ebenfalls sehr günstigen Methan leicht hergestellt werden konnte. Daher sollte ein Verfahren entwickelt werden, bei dem *P. pastoris* in Hochzellendichte (bis zu 130 g Biotrockenmasse/l) kultiviert wird und anschließend als Tierfutter mit hohem Proteingehalt zum Einsatz kommt. Durch Preissteigerungen von Methan und gleichzeitig immer kostengünstigerem Soja kam es allerdings nie zur Markteinführung von sogenanntem Single Cell Protein (Cereghino & Cregg 2000).

Stattdessen wurden die Patente an *Pichia pastoris* 1993 an ein Forschungsinstitut übertragen, um das Expressionssystem *P. pastoris* der Wissenschaft zugänglich zu machen. In den folgenden Jahren entwickelte sich *P. pastoris* zu einem sehr erfolgreichen Expressionssystem für rekombinante Proteine.

Hierbei machte man sich die Eigenschaften der AOX-Gene und der AOX-Promotoren zunutze. Wird das Gen für ein Zielpeptid hinter dem AOX-Promotor eingebracht und die Hefe wächst auf Methanol, kommt es zu extrem hohen Expressionsraten des Zielpeptides. Wächst die Hefe hingegen auf einer anderen C-Quelle, wird kein Peptid exprimiert. Diese Art von Schalter ist für die kontrollierte Herstellung rekombinanter Proteine von großem Vorteil.

Das Einbringen des Zielproteingens kann auf verschiedene Arten erfolgen. Eine Übersicht hierzu ist in Abb. 1 dargestellt.

Zunächst ist der Wildtyp des AOX-Gens dargestellt. Beide AOX-Gene (blau) sind vorhanden. Wird nun das Gen für das Zielprotein (rot) zwischen AOX-Promotor und AOX1-Gen eingebaut, so bleibt das AOX1-Gen intakt. Dieser Typ wird als Mut<sup>+</sup> bezeichnet. Mut setzt

sich zusammen aus Methanol (M) und dem engl. „utilization“ (ut) für Nutzung. Somit deutet das Plussymbol an, dass dieser Typ Methanol gut verstoffwechseln kann.

Wird das Gen für das Zielprotein so eingebracht, dass das AOX1-Gen ersetzt wird, entsteht der Mut<sup>S</sup>-Typ. „S“ steht hierbei für das engl. slow (langsam), da der Methanolstoffwechsel nur noch über das viel schwächere AOX2-Gen abgewickelt werden kann und somit das Wachstum viel langsamer stattfindet als beim Wildtyp.

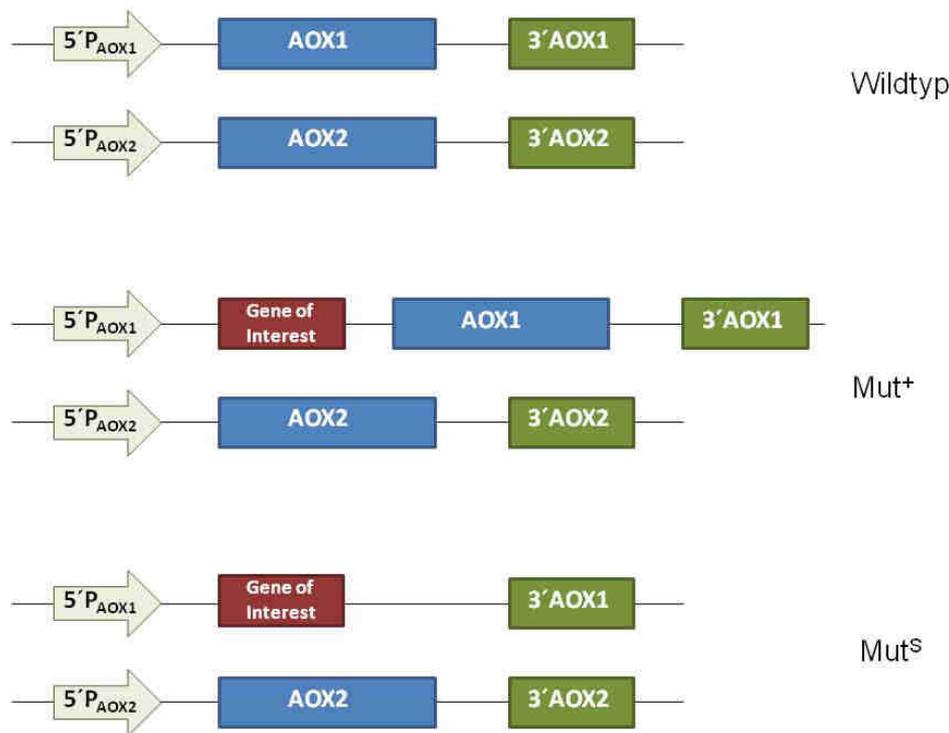


Abb. 1: Schematische Darstellung der AOX-Gene in *Pichia pastoris*. Aufgeführt sind, von oben nach unten, der Wildtyp, bei dem beide AOX-Gene (blau) intakt sind, der Mut<sup>+</sup>-Typ, bei dem das Zielgen (rot) vor das AOX1-Gen eingesetzt wurde und der Mut<sup>S</sup>-Typ, bei dem das AOX1-Gen durch das Zielgen ersetzt wurde. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Löggering & Luttmann 2010.

Neben den vielfältigen Möglichkeiten bei der Klonierung von *Pichia pastoris* zeichnet sich diese Hefeart im Gegensatz zu anderen Hefearten noch durch eine starke Neigung zur Zellatmung aus. Somit ist es möglich, bei aeroben Fermentationen sehr hohe Zelldichten zu erreichen (Cereghino & Cregg 2000).

Ein weiterer Grund für den Erfolg von *P. pastoris* ist die Tatsache, dass im Vergleich zu anderen eukaryotischen Systemen, wie z. B. Insekten- oder Säugerzellen, die Kultivierungskosten deutlich geringer sind. Dennoch bringt *P. pastoris* mit der post-translationalen Modifikation, also z. B. Bildung von Disulfidbrücken oder Glykosylierung, typische eukaryotische Vorteile mit sich.

## 5 Antimikrobielle Peptide

Bei antimikrobiellen Peptiden handelt es sich um einen Teil des angeborenen Immunsystems und somit sind AMPs nicht nur in Säugetieren, sondern auch in Pflanzen, Insekten und anderen Wirbeltieren vorhanden. AMPs ermöglichen es dem Organismus, sich gegen pathogene Viren, Bakterien oder Pilze aus der Umgebung zu schützen und Infektionen abzuwehren.

Antimikrobielle Peptide sind mit 1 kDa bis 5 kDa im Vergleich zu anderen Biomolekülen sehr klein. Sie bestehen aus ca. 20 bis 40 Aminosäuren, die insgesamt eine positive Nettoladung aufweisen. Zudem bilden sich meist innerhalb der Sekundärstruktur hydrophobe und hydrophile Bereiche aus, die dann den amphipatischen Charakter der Moleküle ausmachen. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es den AMPs möglich, mit der negativ geladenen Membran von Bakterien zu interagieren, zu permeabilisieren und schließlich die Zellen zu lysieren (Van 't Hof et al. 2001).

Da gegen diese rein physikalischen Wechselwirkungen nahezu keine Resistenzbildung möglich ist, sind AMPs vielversprechende Kandidaten der Forschung im Bereich Antibiotika (Brogden 2005). Aber auch im Bereich der Sepsisbehandlung oder als Krebstherapeutikum werden AMPs momentan erforscht (Haney & Hancock 2013).

In den folgenden Abschnitten sollen die verschiedenen Arten von AMPs und die genauen Wirkmechanismen näher betrachtet werden.

## 5.1 Arten und Vorkommen von antimikrobiellen Peptiden

Wie bereits einleitend beschrieben sind AMPs in nahezu allen Lebensformen verbreitet. Bis Juni 2015 wurden 2579 AMPs beschrieben (APD & University of Nebraska 2015). Abb. 2 zeigt die Verteilung dieser beschriebenen AMPs auf die verschiedenen Lebensformen, in denen sie das erste Mal nachgewiesen wurden.

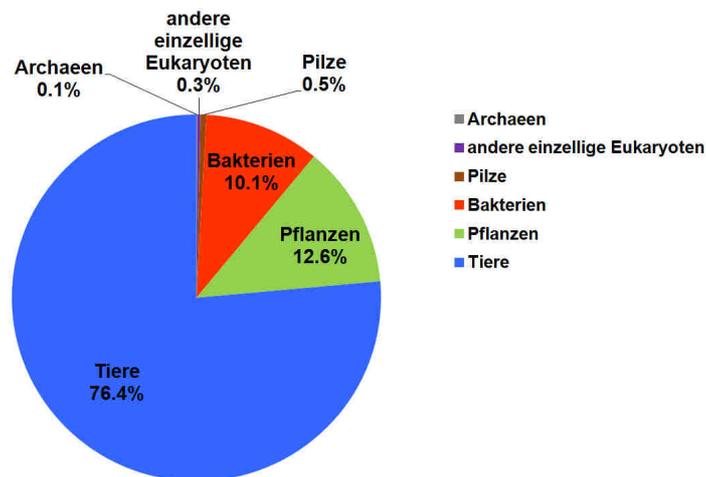


Abb. 2: Prozentuale Verteilung der bisher beschriebenen antimikrobiellen Peptide auf die verschiedenen Lebensformen. Datenquelle: APD & University of Nebraska 2015.

Wie in Abb. 2 zu erkennen ist, stammt ein Großteil der bisher isolierten AMPs aus Tieren oder Pflanzen. Aber auch Bakterien und Pilze zeigen die Produktion von antimikrobiellen Peptiden, um sich gegen fremde Mikroorganismen oder Viren zu schützen.

Viel häufiger als aufgrund ihrer Herkunft werden AMPs aber aufgrund ihrer Struktur und physikalisch-chemischen Eigenschaften charakterisiert. Die drei Hauptstrukturgruppen sind in Abb. 3 anhand von Beispielpeptiden dargestellt.

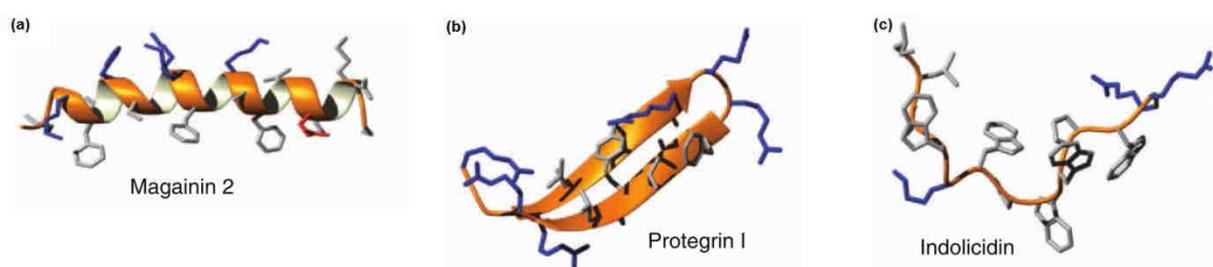


Abb. 3: Darstellung der drei Hauptstrukturgruppen von AMPs anhand von Beispielpeptiden. (a) Magainin 2 repräsentiert die Gruppe der  $\alpha$ -helikalen Peptide, (b) Protegrin I repräsentiert die Gruppe der  $\beta$ -Faltblatt Peptide und (c) Indolicidin repräsentiert die Gruppe der ausgedehnten Peptide. Positiv geladene Seitenketten sind in Blau dargestellt. Quelle: Nguyen et al. 2011.

Zu den bekannten Vertretern der Gruppe der  $\alpha$ -helikalen Peptide zählen Magainin, welches zuerst auf der Haut von Fröschen nachgewiesen wurde, LL-37, welches unter anderem im Menschen vorkommt und NK-Lysin und dessen Derivat NK-2, das aus dem Schwein stammt und Zielpeptid dieser Arbeit ist. Aber auch Peptide wie Melittin, das im Bienengift vorkommt oder Cecropin, das aus einer Mottenart stammt, zählen zur Gruppe der  $\alpha$ -helikalen Peptide. In der zweiten Gruppe, der der Peptide mit  $\beta$ -Faltblatt Struktur, werden unter anderem Peptide wie Protegrin, das aus Leukozyten vom Schwein stammt, oder Human  $\beta$ -Defensin, das, wie der Name schon andeutet, aus dem Menschen stammt, zusammengefasst. Zu den Peptiden der dritten Gruppe, also der der ausgedehnten Peptide ohne regelmäßige Sekundärstruktur, zählt unter anderem Indolicidin, das im Rind nachgewiesen wurde (Nguyen et al. 2011).

Zusätzlich zu den drei Hauptstrukturgruppen existieren noch weitere Untergruppen und andere Sonderfälle. So gibt es z. B. auch anionische Peptide, wie z. B. Maximin H5, das in Amphibien, oder Dermcidin, das im Menschen vorkommt. Des Weiteren sind teilweise Peptidfragmente von größeren Proteinen antimikrobiell wirksam. Hierzu zählen unter anderem Lactoferricin vom Protein Lactoferrin oder die antimikrobiellen Domänen von Lysozym oder Ovalbumin (Brogden 2005).

## 5.2 Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden

Die Wirkung von antimikrobiellen Peptiden lässt sich zum Großteil auf ihre physikalischen und strukturellen Eigenschaften zurückführen. Das breite Spektrum der Wirkungsweise von AMPs ist in Abb. 4 illustriert. Die genauen Wirkmechanismen gegen Mikroorganismen oder auch gegen Krebszellen und die Wirkungsweise als Immunregulator sollen in den folgenden Unterabschnitten erläutert werden.

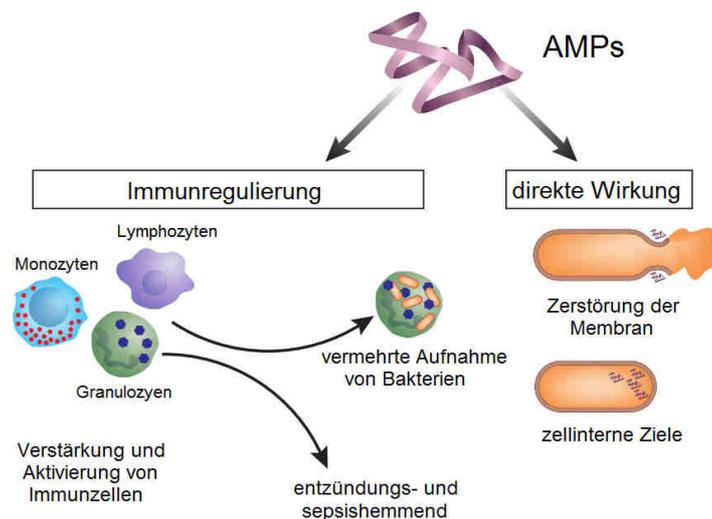


Abb. 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Wirkmechanismen von antimikrobiellen Peptiden. Quelle: in Anlehnung an: Hancock & Sahl 2006.

### 5.2.1 Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden gegen Mikroorganismen

Die antimikrobielle Aktivität der Peptide lässt sich im Wesentlichen auf zwei Punkte zurückführen. Zum einen interagieren AMPs aufgrund ihrer physikalisch-strukturellen Eigenschaften mit der Membran der Mikroorganismen und lysieren diese schließlich, zum anderen können einige AMPs in die Zelle eindringen und dort verschiedene Stoffwechselwege hemmen.

#### 5.2.1.1 Antimikrobielle Aktivität durch Interaktion mit der Zellmembran

Die Interaktionen von AMPs mit der Zellmembran lassen sich mit Hilfe dreier Modelle beschreiben. Allen Modellen ist gemeinsam, dass sich die AMPs zunächst an die Membran anlagern, bis eine bestimmte Schwellenwertkonzentration im  $\mu\text{M}$ -Bereich erreicht ist. Daraufhin kommt es zur Permeabilisierung der Membran, was zu einem erhöhten Ionenaustrom und Wassereinstrom sowie schließlich zum Zelltod führt (Shai & Oren 2001).

### Barrel-Stave-Modell

Obwohl das Barrel-Stave-Modell ausschließlich das Verhalten des AMPs Alamethicin beschreibt, ist es dennoch eines der gängigen Modelle zur Beschreibung der Interaktion mit Membranen. Die aus dem Englischen stammenden Wörter „barrel“ für Fass und „stave“ für Fassdaube deuten bereits an, wie sich die AMPs in dieser Modellvorstellung verhalten. In Abb. 5 wird schematisch das Barrel-Stave-Modell dargestellt. Zunächst aggregieren die angelagerten Peptide an der Membranoberfläche, bis diese schließlich in die Phospholipid-Doppelschicht eindringen. Innerhalb der Membran bilden ca. drei bis elf Peptide ein Bündel, bei dem die hydrophoben Bereiche des Peptides nach außen in Richtung der ebenfalls hydrophoben Fettsäureketten der Phospholipide zeigen. Nach innen zeigen die hydrophilen Bereiche und bilden somit eine Pore mit ca. 1.8 nm Innendurchmesser (Brogden 2005).

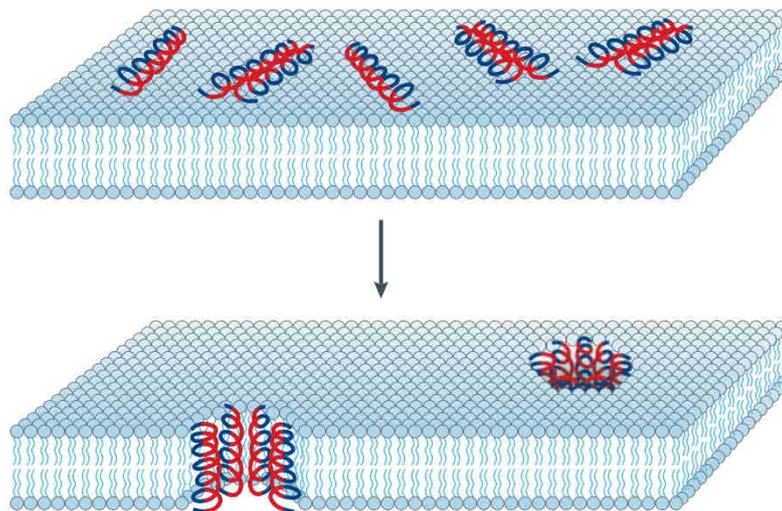


Abb. 5: Schematische Darstellung des Barrel-Stave-Modells. Die hydrophilen Bereiche des Peptides sind in Rot und die hydrophoben Bereiche des Peptides in Blau dargestellt. Quelle: Brogden 2005.

### Carpet-Modell

Bei dem sogenannten Carpet-Modell (engl. „carpet“ für Teppich) lagern sich die AMPs aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen an die negativ geladenen Köpfe der Phospholipid-Doppelschicht an und bilden eine Art Teppich auf dessen Oberfläche. Ab einer bestimmten Konzentration wirken die AMPs dann ähnlich wie ein Detergens und zerstören die Phospholipid-Doppelschicht. Häufig kommt es hierbei noch zur Bildung von Mizellen aus AMPs und herausgetrennten Phospholipiden. Zurück bleiben Poren mit AMPs im Inneren, an denen sich die Phospholipide ringförmig anordnen (Brogden 2005). Der schematische Ablauf des Carpet-Modells ist in Abb. 6 dargestellt.

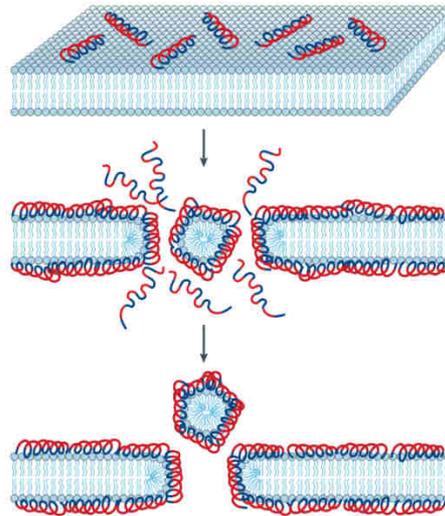


Abb. 6: Schematische Darstellung des Carpet-Modells. Die hydrophilen Bereiche des Peptides sind in Rot und die hydrophoben Bereiche des Peptides in Blau dargestellt. Quelle: Brogden 2005.

### **Toroidal-Modell**

Bei dem sogenannten Toroidal-Modell (engl. „toroidal“ für ringförmig) dringen die Peptide in die Phospholipid-Doppelschicht ein und formen dort gemeinsam mit den Phospholipiden eine Pore. Hierbei orientieren sich die hydrophilen Gruppen der Peptide und die hydrophilen Köpfe der Phospholipide nach innen. Das Ergebnis sind mit einem Innendurchmesser von 3 nm bis 5 nm relativ große Poren (Brogden 2005). Ein schematischer Ablauf der Interaktion von AMPs mit der Membran nach dem Toroidal-Modell ist in Abb. 7 dargestellt.

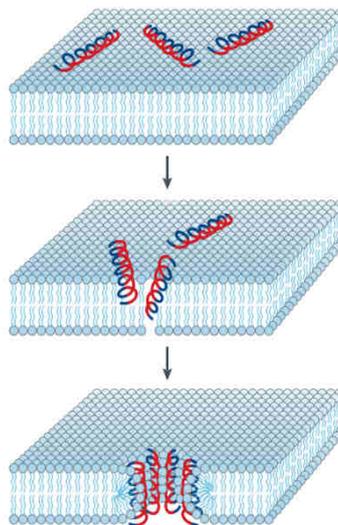


Abb. 7: Schematische Darstellung des Toroidal-Modells. Die hydrophilen Bereiche des Peptides sind in Rot und die hydrophoben Bereiche des Peptides in Blau dargestellt. Quelle: Brogden 2005.

Zusätzlich zu den drei genannten Modellen gibt es noch weitere Modellvorstellungen, wie AMPs mit der Membran von Mikroorganismen wechselwirken. So können bereits einzelne Peptide die Phospholipid-Doppelschicht durcheinander bringen („disordered toroidal pore“) und somit Poren formen. Oder es kommt durch die Einwirkung von AMPs zur Abnahme der Membrandicke („membrane thinning“). Weitere Mechanismen sind z. B. molekulare Elektroporation oder „anion carrier“, was bei stark positiv geladenen AMPs vorkommen kann (Nguyen et al. 2011).

### **5.2.1.2 Antimikrobielle Aktivität durch zellinterne Wirkung**

Neben der Zerstörung der Zellmembran ist es einigen Peptiden möglich, durch die Membran hindurch zu gelangen und innerhalb der Zelle auf verschiedenste Weisen zu wirken. So dringen z. B. anionische Peptide in die Zelle ein und bewirken dort eine Ausfällung von intrazellulären Bestandteilen (Brogden et al. 1996). Des Weiteren gibt es Berichte, dass Indolicidin (vgl. Abb. 3) in der Lage ist, die DNA-Synthese zu stören (Subbalakshmi & Sitaram 1998). Viele weitere intrazelluläre Wirkmechanismen sind im Review von (Brogden 2005) beschrieben.

## **5.2.2 Weitere Wirkungsweisen von antimikrobiellen Peptiden und ihre Anwendungsgebiete**

Wie in Abb. 8 zu erkennen ist, unterscheiden sich Bakterienmembranen von Säugerzellmembranen hinsichtlich ihrer Phospholipidzusammensetzung deutlich. Bakterienmembranen enthalten größere Mengen an Teichonsäuren, wodurch die Membran stark negativ geladen ist. Demgegenüber stehen Säugerzellenmembranen, die auf der Außenseite der Membran einen hohen Gehalt an zwitterionischem Phosphatidylcholin aufweisen und somit eine positive Nettoladung ausbilden. Daher interagieren AMPs viel stärker mit Bakterienmembranen als mit Säugerzellmembranen (Oren & Shai 1998).

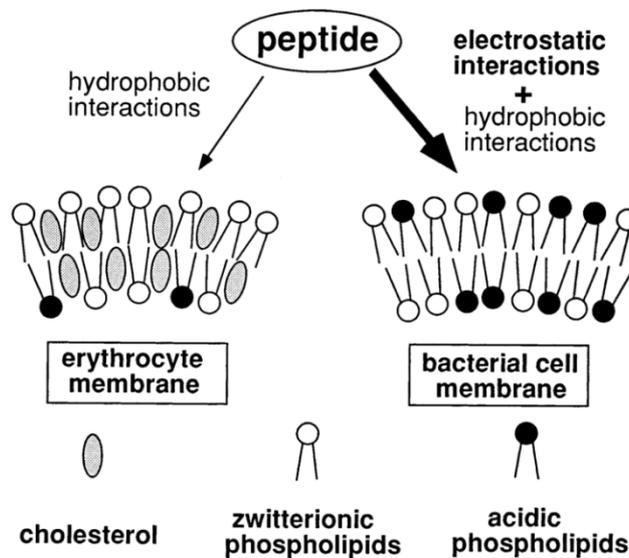


Abb. 8: Schematische Darstellung der Phospholipidzusammensetzung von Säugerzellenmembranen (hier repräsentiert durch Erythrozyten) und Bakterienmembranen. Quelle: Matsuzaki 1999.

Diese Selektivität von AMPs hinsichtlich der Phospholipidzusammensetzung wird sich bei der Erforschung neuer Krebstherapeutika zunutze gemacht. Da bei Krebszellen die natürliche Asymmetrie der Membran gestört ist und vermehrt Phosphatidylserin auf der Außenseite der Membran vorkommt, können AMPs selektiv an diesen Zellen binden und diese zerstören (Zwaal & Schroit 1997).

Zudem wurde mehrfach beschrieben, dass AMPs in der Lage sind, Lipopolysaccharide, den sepsis auslösenden Bestandteil von Bakterienmembranen, zu binden und somit unschädlich zu machen (Haney & Hancock 2013; Yount & Yeaman 2013). Klinische Studien zu AMPs mit diesen sogenannten Endotoxin neutralisierenden Eigenschaften führten aber bislang zu keiner Marktreife. So wurde z. B. Neuprex™ (Xoma Corp., USA), das auf einem AMP beruht und gegen Meningokokken-Sepsis eingesetzt werden sollte, von der Food and Drug Administration (FDA) aufgrund von unvollständigen Daten nicht zugelassen. Ähnliche Berichte gibt es auch zu anderen Phase-III-Kandidaten zur Endotoxinneutralisation (Van 't Hof et al. 2001).

Ein neues Feld der Forschung hingegen ist der Einsatz von AMPs als Immunregulator. Hierbei wirken die AMPs nicht direkt, sondern stimulieren die körpereigenen Immunzellen und fördern so z. B. die Wundheilung (Hancock & Sahl 2006).

### 5.3 NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K

Im Jahr 1995 wurde das antimikrobielle Peptid NK-Lysin in den Natural-Killer-Zellen von Hausschweinen nachgewiesen. NK-Lysin zeigt Wirkung gegen ein breites Spektrum von gram-positiven und gram-negativen Bakterien, aber nur geringe Hämolyseaktivität (Andersson et al. 1995).

Bei NK-2 handelt es sich um den antimikrobiell aktiven Abschnitt aus NK-Lysin von AS 39 bis 65 mit einer Größe von 3.16 kDa. Ebenfalls getestet wurde der Abschnitt von AS 40 bis 63 (NK-1), welcher aber eine deutlich geringere Aktivität zeigte (Andrä & Leippe 1999).

In Tab. 1 ist die Aminosäuresequenz von NK-Lysin und dessen Derivate als Einbuchstaben-code dargestellt. Die Derivate des NK-Lysin wurden mittels Festphasenpeptidsynthese mit einem amidierten C-Terminus hergestellt. Lediglich bei dem Peptid mit der Endung OH ist der C-Terminus wie bei natürlichen Peptiden und somit auch beim rekombinanten Peptid mit einer Carboxylgruppe versehen. Die amidierten Peptide tragen somit eine negative Ladung weniger als das Peptid mit dem freien C-Terminus.

Tab. 1: Übersicht über die Aminosäuresequenz von NK-Lysin und dessen Derivate. Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-code dargestellt und Veränderungen bzw. Ausschnitte der Ursprungsstruktur sind fett markiert.

Peptid	Aminosäuresequenz	Nettoladung
NK-Lysin	GLICESCRKIIQKLEDMVGPQPNEDTVTQAASRV CDKM <b>KILRGVCKKIMRTFLRRISKDILTGKKPQAI</b> CVDIKICKEKTGLI	+9
NK-2	KILRGV <b>CKKIMRTFLRRISKDILTGKK</b> -NH <sub>2</sub>	+10
C7A-M11L-D21K	KILRGV <b>AKKILRTFLRRISKKILTGKK</b> -NH <sub>2</sub>	+12
C7A-M11L-D21K-OH	KILRGV <b>AKKILRTFLRRISKKILTGKK</b> -OH	+11

Beim Zielpeptid der vorliegenden Arbeit handelt es sich um NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K (ALK). Das heißt, im Vergleich zum ursprünglichen NK-2 wurde bei dieser Variante an der siebten Stelle Cystein gegen Alanin und an der elften Stelle Methionin gegen Leucin getauscht. Somit wurden schwefelhaltige Aminosäuren aus dem Peptid entfernt, was die Oxidation verringert. Des Weiteren wurde an der 21. Stelle Asparaginsäure gegen Lysin getauscht, um die Gesamtnettoladung von +10 auf +12 zu erhöhen.

In Abb. 9 sind NK-Lysin (grau / rot) und NK-2 (rot) in der Sekundärstruktur, die sie in polarer Umgebung ausbilden, dargestellt.

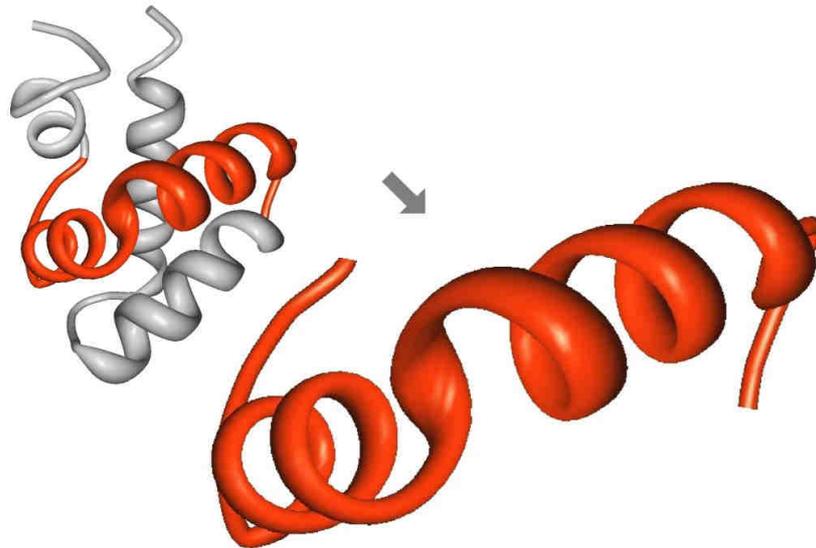


Abb. 9: Darstellung von NK-Lysin (grau / rot) und NK-2 (rot) in der Sekundärstruktur. Quelle: 1NKL.pdb und Liepinsh et al. 1997.

Deutlich zu erkennen ist, dass NK-Lysin und besonders NK-2 zum Großteil eine  $\alpha$ -helikale Sekundärstruktur ausbilden. Dies wird vor allem interessant im Hinblick auf die daraus resultierende Anordnung der Aminosäuren. In Abb. 10 sind die einzelnen Aminosäuren hinsichtlich ihrer Hydrophobizität farblich codiert.

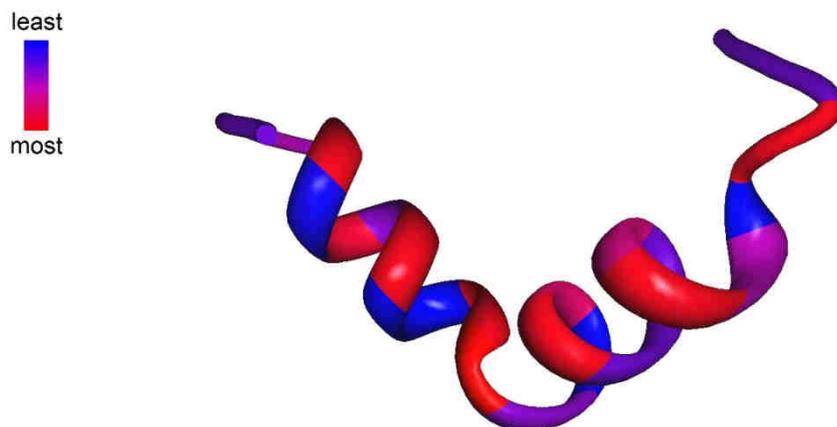


Abb. 10: Darstellung der Hydrophobizität von NK-2. Von Blau nach Rot steigt die Hydrophobizität an. Quelle: 1NKL.pdb und Liepinsh et al. 1997.

Hierbei stehen blau markierte Bereiche für hydrophile Bereiche, lila markierte Bereiche für schwach hydrophile bzw. hydrophobe Bereiche und rote Bereiche für starke Hydrophobizität. Auffällig ist, dass die stark hydrophoben Bereiche auf einer Seite der  $\alpha$ -Helix gehäuft auftreten. Daher könnte sich das Peptid bei Interaktion mit einer Bakterienmembran genau an dieser Seite anlagern.

Die eigentliche antimikrobielle Wirkung scheint NK-2 aber erst durch die hohe positive Nettoladung zu gewinnen. Es konnte gezeigt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der antimikrobiellen Wirkung und der Höhe der Nettoladung des Peptides vorliegt. Demgegenüber besteht kein Zusammenhang zwischen der Stärke der Hydrophobizität und der antimikrobiellen Wirkung (Andrä et al. 2007).

Wie in Abb. 11 zu erkennen ist, bildet NK-Lysin (gelb) in Gegenwart einer Biomembran (weiß) ein starkes elektrisches Feld (blau) aus. Es werden Werte von bis zu 0.2 V erreicht.

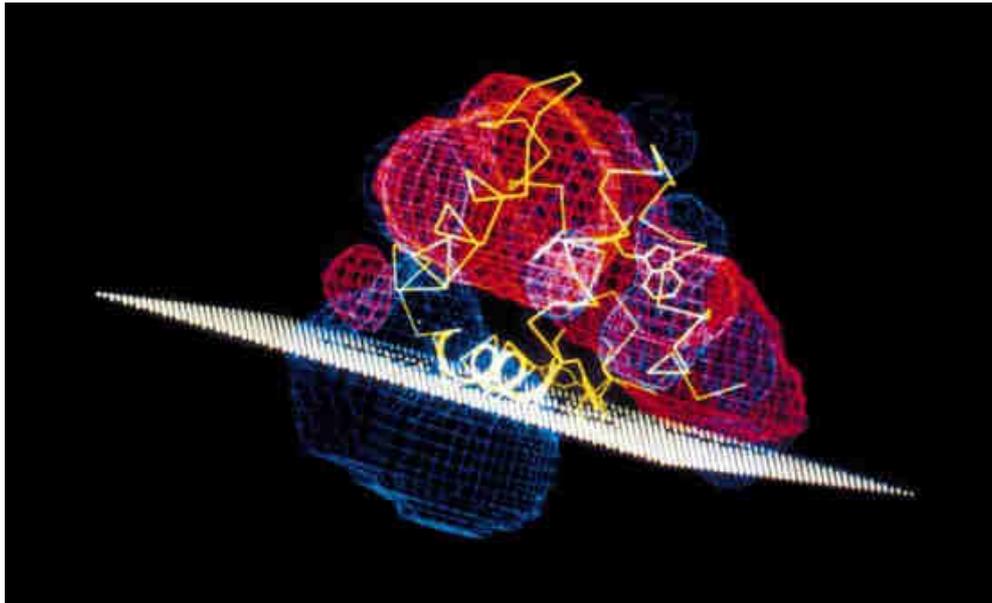


Abb. 11: Simulierte Darstellung von NK-Lysin (gelb) in Gegenwart einer Biomembran (weiß). Dargestellt sind die elektrischen Felder mit einer Spannung von 0.2 V in Blau und einer Spannung von 0 V in Rot. Quelle: Miteva et al. 1999.

Werte von 0.2 V über einen längeren Zeitraum reichen aus für die sogenannte molekulare Elektroporation (Miteva et al. 1999). NK-Lysin und folglich besonders NK-2 sind also in der Lage, aufgrund der hohen positiven Nettoladung und dem daraus resultierenden elektrischen Feld Membranen zu permeabilisieren.

Die starke positive Nettoladung von NK-2 ist ebenfalls ursächlich für die hohe Selektivität gegenüber krebserkrankten Zellen. Normalerweise besteht zwischen der Außen- und Innenseite der Membran eine Asymmetrie hinsichtlich der Anteile verschiedener Phospholipide. Auf der Außenseite kommen hauptsächlich zwitterionische Phosphatidylcholine und Sphingomyeline ohne Nettoladung vor (Zwaal & Schroit 1997; Schröder-Borm et al. 2003). Demgegenüber treten auf der Innenseite negativ geladene Phosphatidylserine auf. Diese Asymmetrie wird durch die Flippasen aktiv aufrecht erhalten. Bei krebserkrankten Zellen ist die Asymmetrie gestört und negativ geladene Phosphatidylserine treten auf die Außenseite der Membran, wodurch diese nun negative Ladungsträger enthält. Diese

negativen Phosphatidylserine sind Angriffspunkte für das NK-Lysin, welches somit in der Lage ist, Krebszellen selektiv zu zerstören. Dies wird durch Untersuchungen bestätigt, in denen NK-2 hohe Aktivität gegen Sarkoidzellen oder Kolorektalkarzinomzellen zeigte, aber nur niedrige Hämolyseaktivität (Gross et al. 2013; Maletzki et al. 2014).

### **5.3.1 Bisherige Expression von antimikrobiellen Peptiden in *Pichia pastoris***

Da AMPs vielversprechende Eigenschaften hinsichtlich Antibiotikaaanwendung oder Chemotherapeutikum besitzen, steigt der Bedarf an größeren Mengen von AMPs für die Forschung und vor allem für mögliche spätere therapeutische Anwendungen. Die Isolation von AMPs aus Naturstoffen scheidet aufgrund der geringen Verfügbarkeit und Ausbeute aus. Auch ist die synthetische Herstellung von AMPs sehr teuer. So kosten z. B. 1 mg des Peptides NK-2 ca. 1000 € und die Kosten der Synthese steigen mit zunehmender Peptidlänge exponentiell an. Daher wird der Versuch unternommen, AMPs rekombinant z. B. in Hefe herzustellen, da diese durch ihre Zellwand nicht so anfällig gegenüber AMPs ist. Allerdings ist auch eine Expression in Hefezellen nicht unbegrenzt möglich, da z. B. Cecropin Aktivität gegen die Hefe *Candida albicans* zeigt (Andrä et al. 2000).

Seit dem Jahr 2005 nimmt die Zahl der Veröffentlichungen zum Thema Expression von AMPs in *P. pastoris* stetig zu. Eine Übersicht über einige der bisher erfolgten Expressionen und dabei gewählte Parameter und erzielte Ausbeuten ist in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Übersicht über einige der bisher erfolgten Expressionen von antimikrobiellen Peptiden in *P. pastoris*

Name des AMPs	<i>P. pastoris</i> Stamm	Kultur-gefäß	Flüssig-volumen	Fermentationsbedingungen	Aufreinigungsstrategie	Ausbeute	Nachweis
Shrimp Protein <i>Ch</i> -penaeidin	KM71	Schüttel- kolben (SK)	10 ml	- 28 °C - pH = 6.0 - 0.5 % MeOH alle 24 h	- IEXC	108.0 mg/l	(Li et al. 2005)
CecropinA– Magainin2 Hybrid	SMD1168 Mut <sup>S</sup>	Bioreaktor (BR)	3 l	- 28 °C - pH = 5.0 - 1.0 %MeOH	- 10 kDa Filtration - RP-HPLC	22 mg/l	(Jin et al. 2006)
ABP-CM4	GS115	SK	50 ml	- 28 °C - pH = 6.0 - 0.5 % MeOH alle 24 h bei 20 °C - 230 rpm	- Gefriertrocknung - Resusp. in H <sub>2</sub> O - Erhitzen auf 100°C und Zentrifugation - Überstand auf SEC	40 mg/l	(Zhang et al. 2006)
CruFc	KM71	BR	5 l Reaktorvol.	- Nach <i>Pichia Fermentation Process Guidelines</i>	- Ammoniumsulf.-Fällung - SEC	237 mg/l	(Zhang et al. 2007)
HKABF	KM71	BR	4 l	- 30 °C - pH = 5.0 – 5.5 - pO <sub>2</sub> = 20 %	- mit 6-His-Tag auf HisTrap Säule - RP-HPLC	15 mg/l nach Aufreinigung	(Wang et al. 2008)
Human α-defensin 5	GS115	BR	15 l Reaktorvol.	- 30 °C - pH = 5.0 - pO <sub>2</sub> = 30 – 40 %	- SEC - Gefriertrocknung - RP-HPLC	165 mg/l	(Wang et al. 2009)
Perinerin	GS115	SK	50 ml	- 30 °C - MeOH alle 24 h ohne Mengenangabe	- 10 kDa Filtration - Aceton-Fällung - IEXC	- 35 mg/l - 146.7 mg/l nach Aufreinigung	(Zhou et al. 2009)
CecropinAD	GS115	SK	50 ml	- 28 °C - pH = 5.0 - 1 % MeOH alle 24 h	- 10 kDa Filtration - RP-HPLC	18 mg/l nach Aufreinigung	(Jin et al. 2009)

Name des AMPs	<i>P. pastoris</i> Stamm	Kultur-gefäß	Flüssig-volumen	Fermentationsbedingungen	Aufreinigungsstrategie	Ausbeute	Nachweis
Cecropin–Melittin Hybrid	X-33	SK	25 ml	- 30 °C - 220 rpm - pH = 5.0 - 1 % MeOH alle 24 h	k.A.	90 mg/l bei 48 h und 28 °C	(Cao et al. 2010)
hPAB-β (Variante von Human β-Defensin 2)	GS115	SK BR	50 ml 3.7 l	- 30 °C - pH = 5.0 - pO <sub>2</sub> = 30 – 50 % - 1 % MeOH	- 10 kDa Filtration - IEXC	240 mg/l	(Chen et al. 2011)
Plectasin	X-33	SK BR	10 ml 5 l Reaktorvol.	- 30 °C - 0.5 % (v/v) MeOH	- 1 kDa Dialyse - SEC - RP-HPLC	537 mg/l	(Zhang et al. 2011)
Sheep β-defensin-1	GS115	SK	25 ml	- 30 °C - 0.5 % MeOH alle 24 h	- SEC	80 mg/l	(Zhao & Cao 2012)
Cecropin D	SMD1168	SK	50 ml	- 28 – 30 °C - 250 – 300 rpm	k.A.	485 mg/l	(Guo et al. 2012)
Dybowski-2CAMA	X-33	BR	5 l Reaktorvol.	- 28 °C - pH = 6.0 - pO <sub>2</sub> = 30 – 40 % - 1 % MeOH	- 0.45 µm Filtration - Erhitzen auf 100 °C - SEC - RP-HPLC	ca. 25 mg/l	(Jin et al. 2013)
NZ17074 (Variante von Arenicin-3) mit SUMO3 als Fusionsprotein	X-33	BR	5 l Reaktorvol.	- 29 °C - pH = 5.5 - 1000 rpm bei Begasung von 8 l/min	- Ni <sup>2+</sup> -Affinitätschromatographie - 28 h bei 50 °C in 50 % Ameisensäure zum Trennen von SUMO3	- 61.8 mg/l	(Wang et al. 2014)
Cecropin P4	X-33	SK	20 ml	- 30 °C, 300 rpm - 1 % MeOH alle 24 h	k.A.	k.A.	(Song & Lee 2014)

## 6 Material und Methoden

### 6.1 *Pichia pastoris* SMD1168 mit Gen für NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Vincent Jordan an der Universität Hamburg wurde das Gen für NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K in das Genom von *Pichia pastoris* SMD1168 eingebracht (Jordan 2015). Bei *Pichia pastoris* SMD1168 handelt es sich um einen Stamm mit besonders geringer Proteaseaktivität, was bei langen Kultivierungen und hohen Zelldichten von Vorteil ist (Higgins & Cregg 1998).

Für die Klonierung wurde das Gen in den Expressionsvektor pPICZ $\alpha$  eingebracht. Der Vektor trägt die Promotorregion für das AOX1-Gen, einen Genabschnitt für die Zeocin<sup>TM</sup>-Resistenz, welche die Selektion von positiven Klonen ermöglicht, und eine  $\alpha$ -Signalsequenz, die bewirkt, dass das Zielpeptid aus der Zelle ausgeschleust und ins Medium sekretiert wird (Invitrogen 2006). Der Vektor wird mittels Restriktionsenzymen geschnitten und linearisiert. Durch homologe Rekombination lagern sich Teile des AOX1-Promotors an die Promotorregion im Genom von *P. pastoris* an und ersetzen diese. Der Vorgang ist in Abb. 12 schematisch dargestellt. Somit werden die Gene des Plasmides hinter dem AOX1-Promotor und vor dem AOX1-Gen eingebaut. Es entsteht ein Mut<sup>+</sup>-Typ, da das AOX1-Gen intakt bleibt.

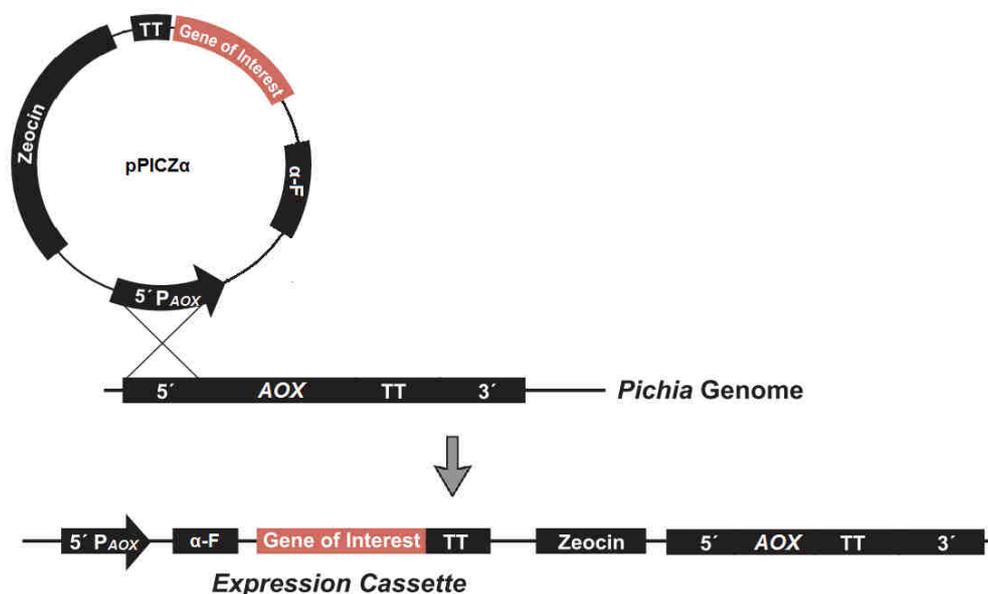


Abb. 12: Schematische Darstellung der homologen Rekombination zwischen Expressionsvektor pPICZ $\alpha$  und dem Genom von *P. pastoris*. Das rot dargestellte Gene of Interest ist in diesem Fall NK-2 in der Variante C7A-M1L-D21K. Quelle: Abgeändert in Anlehnung an Invitrogen 2010.

## 6.2 Produktionsstrategie und Bioreaktor Biostat® ED5

### 6.2.1 Aufbau des Bioreaktors Biostat® ED5

Die Kultivierung von *Pichia pastoris* zur Expression des Zielpeptides wurde in dem in Abb. 13 dargestellten Bioreaktor Biostat® ED5 der Firma Sartorius, Göttingen durchgeführt.

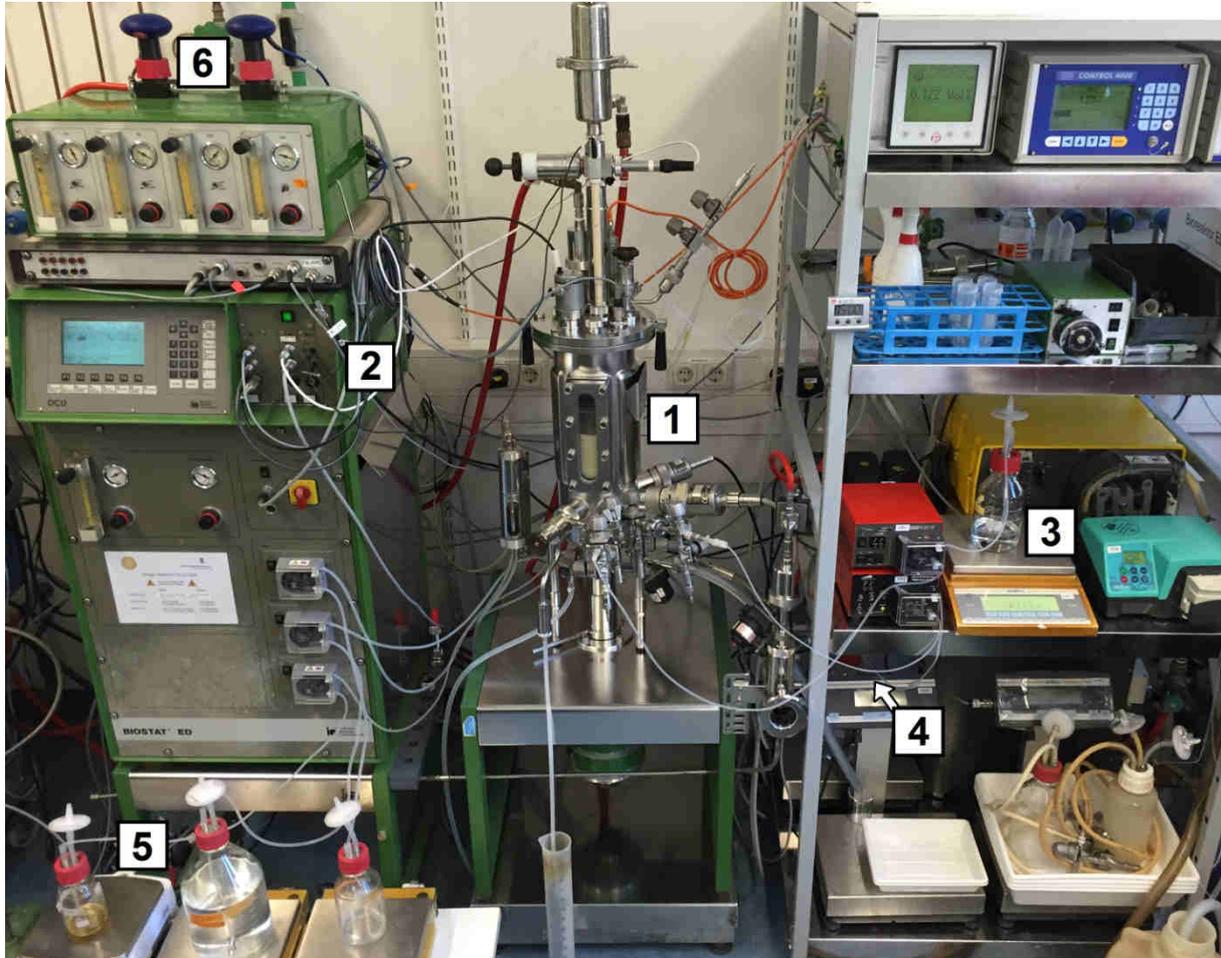


Abb. 13: Der Bioreaktor Biostat® ED5 mit Fermenter (1), DCU (2), Glycerinvorlage (3), Methanolvorlage (4), Säure-, Base- und Antischaumvorlage (5) und Abgasanalytik (6).

Der Kessel (Nr. 1 in Abb. 13) des Bioreaktors besteht aus 1.4435 Edelstahl und ist *in situ* sterilisierbar. Das Arbeitsvolumen beträgt 5.5 l bei einem Gesamtvolumen von 7.1 l. Das Höhe-zu-Durchmesser-Verhältnis des Reaktors beträgt 3:1 und die Temperierung ist über einen mit Wasser gefüllten Doppelmantel realisiert. Im Reaktor befinden sich der Begasungsring und die Rührerwelle, an der drei 6-Blatt-Scheibenrührer und ein mechanischer Schaumzerstörer angebracht sind. Die Welle wird von unten durch eine *in situ* sterilisierbare doppelte Gleitringdichtung in den Reaktor geführt. Außerdem befinden sich im Reaktor vier Schikanen, die das Mitrotieren der Flüssigkeit verhindern.

Seitlich am Bioreaktor sind fünf 25 mm-Ports vorhanden, in die Sonden und Armaturen eingebaut werden können. Im Sondenport links vorne befindet sich das ebenfalls *in situ* sterilisierbare Probenahmeventil. Daneben befindet sich die Zwillingsbrücke, durch die Glycerin (Nr. 3 in Abb. 13) und Methanol (Nr. 4 in Abb. 13) nachgefüttert werden können oder zu Beginn des Prozesses das Inokulum eingeleitet wird. In dem seitlichen Port befindet sich die Trübungssonde, mit deren Hilfe und anhand von vorher ermittelter Parameter online eine Zellkonzentration errechnet werden kann. Im Port dahinter befindet sich die Leitfähigkeitssonde, die im Laufe der Fermentation einen Eindruck davon vermittelt, wie viel Nährsalze von den Zellen aufgenommen wurden. Im Port auf der Rückseite befindet sich die Gelöstsauerstoffelektrode, die es ermöglicht, inline den  $pO_2$ -Wert zu überwachen und zu regeln.

Im Reaktordeckel befinden sich sieben 19 mm-Ports, durch die ebenfalls Sonden und Armaturen in den Reaktor geführt werden. Zunächst sind im Deckel die Sonden für Temperatur und pH-Wert zu finden, die so lang sind, dass sie bis in die Flüssigphase reichen. Außerdem ist im Reaktordeckel die Schaumsonde montiert, die ein Alarmsignal sendet, sobald Schaum kurz unter dem Reaktordeckel steht. Die Zuluftstrecke mit *in situ* sterilisierbarem 0.45  $\mu$ m-Zuluftfilter befindet sich ebenfalls auf dem Reaktordeckel und ist über eine Kupplungsverbindung mit dem Begasungsring verbunden.

In der Abluftstrecke befinden sich der Abluftkühler, ein Drucksensor, ein Überdruckventil und eine „high foam“-Sonde, die alarmiert, falls Schaum kurz vor dem Abluftfilter steht. Am oberen Ende der Abluftstrecke befindet sich das mit einem Manometer versehene Gehäuse mit einem 0.45  $\mu$ m-Abluftfilter. Hinter dem Abluftfilter befinden sich die Sensoren der Firma BlueSens, Herten, die die Konzentration von  $CO_2$  und  $O_2$  in der Abluft messen (Nr. 6 in Abb. 13). Des Weiteren befindet sich die Titrationsbrücke auf dem Reaktordeckel, durch welche die Korrekturmittel (Nr. 5 in Abb. 13) Säure, Base und Antischaummittel in den Reaktor geleitet werden.

Eine der wichtigsten Sonden, die ebenfalls über den Reaktordeckel in den Reaktor geführt wird, ist die Methanolsonde der Firma Biotechnologie Kempe, Kleinmachnow. Hiermit wird eine Messung der Methanolkonzentration inline ermöglicht, die dann zur Regelung der Methanolzufütterpumpe genutzt werden kann.

Die Steuerung und Regelung der Ventile und Pumpen erfolgt durch die Digital Control Unit (DCU) (Nr. 2 in Abb. 13). Des Weiteren ist ein PC mit der Software MFCS/win an das System angeschlossen (in Abb. 13 nicht abgebildet), über den unter anderem die  $pO_2$ -Regelung eingestellt werden kann.

Eine detailliertere Beschreibung des Biostat<sup>®</sup> ED5 und dessen Peripherie ist der Bachelorarbeit von Janko Lucks zu entnehmen (Luck 2013).

## 6.2.2 Fermentationsstrategie zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden in *Pichia pastoris*

Die Produktionsstrategie von AMPs in *Pichia pastoris* SMD1168 beruht zum Großteil auf Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe „Forschungs- und Transferzentrum Bioprozess- und Analysetechnik“ der HAW Hamburg. In dieser Arbeitsgruppe wurden bereits Prozesse mit *Pichia pastoris* KM71 zur Herstellung eines potentiellen Malariavakzins durchgeführt. In Abb. 14 ist die Prozessführung anhand von verschiedenen Prozessparametern beispielhaft dargestellt.

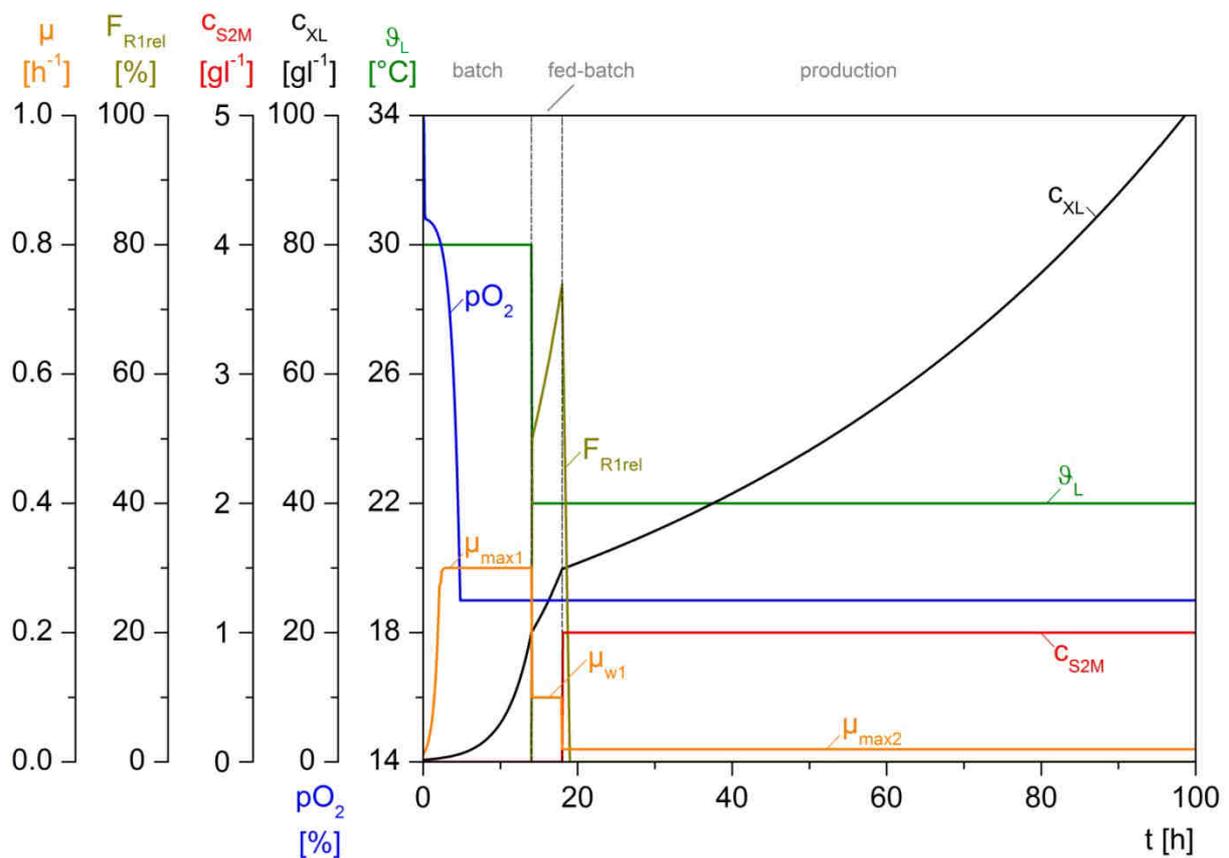


Abb. 14: Auftragung der wichtigsten Prozessgrößen bei der Expression von AMPs in *Pichia pastoris*. Dargestellt sind die Wachstumsrate  $\mu$  in  $h^{-1}$ , die relative Pumpgeschwindigkeit der Glycerinpumpe  $F_{R1rel}$  in %, die Methanolkonzentration im Medium  $c_{S2M}$  in g/l, die Zellmassenkonzentration  $c_{XL}$  in g/l, der bei Luftbegasung auf 100 % kalibrierte Sauerstoffpartialdruck im Medium  $pO_2$  in % und die Temperatur des Mediums  $\theta_L$  in °C.

Zu Beginn jedes Prozesses werden je 200  $\mu$ l Zellsuspension aus einer Kryokultur entnommen und in drei 1 l-Schüttelkolben mit je 150 ml FM22-Medium überführt. Diese werden dann bei 30 °C und 170 rpm im Schüttelschrank für ca. 18 h inkubiert. Mit dieser Schüttelkolbenkultur wird der Fermenter, in dem ca. 3 l Medium vorgelegt sind, auf eine Zelldichte von 0.3 g/l angeimpft. Das Startvolumen der Fermentation soll nach dem Animpfen

3.7 l betragen. Durch das Animpfen wird das vorgelegte Medium auf die Konzentration des FM22-Mediums herunterverdünnt. Der darauffolgende beispielhafte Prozess, der in Abb. 14 dargestellt ist, gliedert sich in drei Hauptphasen.

### **Batch-Phase**

Der Prozess beginnt mit der Batch-Phase, in der die Zellen unlimited auf Glycerin wachsen. Direkt nach dem Animpfen des Bioreaktors mit der Schüttelkolbenkultur fällt der  $pO_2$ -Wert, da nun Verbraucher im System sind. Zu Beginn adaptieren die Zellen an die veränderten Bedingungen, bis diese schließlich mit  $\mu_{max1}$  von ca.  $0.3 \text{ h}^{-1}$  exponentiell wachsen. Während dieses Wachstums nimmt der  $pO_2$ -Wert hyperbolisch ab, bis er einen definierten Wert erreicht. Bei diesem Prozess liegt der  $pO_2$ -Wert, der über die Rührerdrehzahl geregelt wird, bei 25 %. Die Temperatur während der Batch-Phase wird auf  $30 \text{ °C}$  geregelt. Der pH-Wert wird während des gesamten Prozesses mit Säure und Base auf einen Wert von 5.0 geregelt. Auch der Druck wird während des gesamten Prozesses auf 0.5 bar geregelt. Die Regelung des Drucks auf diesen Wert dient zum einen der Verringerung des Risikos von Kontaminationen und zum anderen zur Erhöhung des  $pO_2$ -Wertes.

Am Ende der Batch-Phase ist das gesamte Glycerin im Medium aufgebraucht. Der Stoffwechsel der Zellen fährt herunter und es wird weniger Sauerstoff verbraucht. Da die Rührerdrehzahl konstant bleibt, steigt der  $pO_2$ -Wert stark an. Der Regler des Rührers ist kaskadiert, sodass der Drehzahlsollwert  $N_{St,w}$  reduziert wird, bis der Sollwert  $pO_2$  dem Istwert  $pO_2$  entspricht. Beide Kriterien, ein Anstieg des  $pO_2$ -Wertes auf 35 % und ein Abfall der Rührerdrehzahl um 40 rpm in einer Minute, werden von der in der Arbeitsgruppe programmierten Toolbox in MFCS/win registriert. Diese Kriterien sind Signale für das Batch-Ende.

### **Fed-Batch-Phase**

Nach Erkennung des Batch-Endes wird die Zufütterung von Glycerin über die Zwillingsbrücke automatisch gestartet. Gleichzeitig wird die Temperatur auf  $22 \text{ °C}$  herabgesenkt, um die Zellen bereits in dieser Phase an die geringe Temperatur adaptieren zu lassen. Der eigentliche Grund für die Temperatursenkung ist die Herabsetzung der Aktivität der durch Zelllyse freiwerdenden Proteasen während der Produktionsphase. Während der Fed-Batch-Phase wird das exponentielle Wachstum über ein Zufütterungsprofil der Glycerinpumpe auf  $\mu_{w1} = 0.1 \text{ h}^{-1}$  gesteuert. Ist eine Zellkonzentration von 30 g/l erreicht, wird die Glycerinzufüterraterate innerhalb einer Stunde linear auf 0 g/l heruntergefahren.

### **Produktionsphase**

Noch während die Glycerinzufuhr linear abnimmt, wird die Methanolzufütterung gestartet. Auf Methanol wachsen die Zellen unlimitiert aber bedeutend langsamer als auf Glycerin, nämlich mit einer Wachstumsrate  $\mu_{\max 2}$  von ca.  $0.015 \text{ h}^{-1}$ . Die Methanolkonzentration wird während der gesamten Produktionsphase auf  $1.0 \text{ g/l}$  geregelt. Ist die gewünschte Zelldichte erreicht, kann die Fermentation abgebrochen und die Zellsuspension geerntet werden.

## 6.3 Agarosediffusionstest

Beim Agarosediffusionstest (ADT) handelt es sich um einen Aktivitätstest von antimikrobiell wirkenden Substanzen gegenüber Mikroorganismen. Hierfür werden lebende Bakterienzellen in einen noch flüssigen Agar gegeben und dann in Platten gegossen. In den ausgehärteten Agar werden anschließend Löcher gestanzt, in die ein definiertes Volumen der zu testenden Substanz gegeben wird. Die antimikrobielle Substanz diffundiert daraufhin in den Agar und hemmt dort das Wachstum der eingegossenen Mikroorganismen. Nach einer Inkubation über Nacht sind die Mikroorganismen hochgewachsen und als Rasen mit dem bloßen Auge erkennbar. Um die ausgestanzten Bereiche herum, die mit antimikrobiell wirksamer Substanz befüllt wurden, sind deutliche Höfe zu erkennen. Bei gleichbleibendem Probenvolumen gibt die Fläche der Höfe über die ungefähre Konzentration bzw. über die Wirksamkeit der Substanz Aufschluss. Das im ADT als Referenz verwendete synthetische NK-2 in der Variante ALK-OH wurde mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt und vom Forschungszentrum Borstel zur Verfügung gestellt.

Der Agarosediffusionstest, der nachfolgend beschrieben wird, ist zum Großteil an den Agarosediffusionstest von Lehrer et al. aus dem Jahr 1991 angelehnt.

### 6.3.1 Durchführung des Agarosediffusionstest

200 µl einer Kryokultur der Testorganismen, z. B. *E. coli* K12 M15, werden in einen 300 ml Schüttelkolben (SK) mit 50 ml TSB-Medium gegeben. Die Bakterien wachsen über Nacht ca. 18 h bei 170 rpm und 30 °C im Schüttelinkubator. Um Organismen zu erhalten, die sich in der exponentiellen Phase des Wachstums befinden, werden 200 µl aus dem ersten SK in einen zweiten SK überimpft und für weitere 3 h bei gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird der Inhalt des zweiten SK auf zwei 50 ml-Falcons verteilt und bei 900 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet wird mit 20 ml eines 4 °C kalten 10 mM-Natriumphosphatpuffers (NaPB) resuspendiert und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der entstehende Überstand wird verworfen und das Zellpellet wird in 5 ml des NaPB resuspendiert. Die optische Dichte (OD) wird bei 620 nm gemessen und der Leerwert von Wasser wird abgezogen. Mit der Gleichung 6.1 lässt sich aus der gemessenen OD eine ungefähre Anzahl der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (CFU / ml) abschätzen (Lehrer et al. 1991).

$$\text{CFU / ml} = 4 \cdot 10^8 \cdot \Delta\text{OD}_{620} - 3 \cdot 10^7 \quad (6.1)$$

Ein Volumen, das nach Gleichung 6.1 1 bis  $40 \times 10^6$  CFU/ml enthält, wird in einen nach dem Autoklavieren noch flüssigen,  $(42 \pm 2)$  °C warmen NaPB, der 1 % Agarose, 0.03 % TSB-

Gemisch und 0.02 % Tween 20 enthält, gegeben. Die Bakteriensuspension wird mit der Agaroseflüssigkeit schnell vermischt und auf einer ebenen Fläche in Petrischalen gegossen, sodass diese eine ( $1 \pm 0.5$ ) mm dicke Schicht bildet. Hierbei sollte die Schichtdicke so gering wie möglich gehalten werden, da diese für die Sensitivität des Tests maßgeblich ist.

Nachdem die Agarose ausgehärtet ist, werden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze 3 mm große Löcher hineingestanz, die dann mit 5  $\mu$ l der zu testenden Substanz bzw. Probe befüllt werden. Die so präparierten Platten werden bei 30 °C für 3 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird die erste Schicht Agarose mit einer zweiten Schicht, die 6 % des TSB-Gemisches enthält, überschichtet. Nachdem auch diese ausgehärtet ist, werden die Platten für 18 h bei 30 °C im Brutschrank inkubiert und wie in Abschnitt 6.3.2 beschrieben ausgewertet. Eine detaillierte Standardarbeitsanweisung (SOP) zur Durchführung des ADT ist dieser Arbeit im Anhang beigefügt. Die genauen Medienzusammensetzungen sind dem Anhang im Abschnitt 12.1.2 zu entnehmen.

### **6.3.2 Auswertung des Agarosediffusionstest mittels ImageJ**

Die Auswertung des ADT erfolgt über die Flächenbestimmung der Höfe. Hierfür werden die Platten im Durchlichtmodus bei 600 dpi zusammen mit einem Lineal eingescannt. Die so erzeugte Bilddatei lässt sich mit dem kostenfreien Programm ImageJ öffnen und mit Hilfe des miteingescannten Lineals kalibrieren (ImageJ 2015). Werden nun die Höfe mit der „Oval“-Funktion nachgezeichnet, lässt sich ihre Fläche in mm<sup>2</sup> bestimmen. Die Fläche der ausgestanzten unteren Schicht Agarose wird von der Fläche des Hofes abgezogen und man erhält so die Nettofläche, die ausschließlich durch die antimikrobielle Substanz verursacht wurde. Diese Fläche lässt sich dann mit anderen Ergebnissen vergleichen. Eine detaillierte Beschreibung zur Bedienung von ImageJ ist ebenfalls in der SOP im Anhang zu finden.

## 7 Ergebnisse und Diskussion

### 7.1 Analyse der Fermentation im Bioreaktor Biostat<sup>®</sup> ED5

Die Analyse der Fermentation bezüglich betrachteter Parameter und Stoffwechselraten erfolgt in Anlehnung an die Bachelorarbeit von Janko Lucks (Luck 2013).

#### 7.1.1 Bilanzierungsgleichungen

##### Gasbilanz

Bei der Begasung mit Luft werden die Sensoren auf die Stoffmengenanteile  $x_{CAIR} = 0.00045$  und  $x_{OAIR} = 0.20950$  kalibriert. Bei zusätzlicher Begasung mit reinem Sauerstoff ändern sich die Stoffmengenanteile  $x_{OGin}$  und  $x_{CGin}$ ,

$$x_{OGin}(t) = x_{OAIR} \cdot \frac{F_{nAIR}(t)}{F_{nG}(t)} + 1 \cdot \frac{F_{nO2}(t)}{F_{nG}(t)} \quad (7.1)$$

$$x_{CGin}(t) = x_{CAIR} \cdot \frac{F_{nAIR}(t)}{F_{nG}(t)} + 0 \cdot \frac{F_{nO2}(t)}{F_{nG}(t)} \quad (7.2)$$

im Zuluftstrom. Die Stoffmengenanteile in der Abluft werden von den BlueSens-Sensoren ermittelt. Aus den Zu- und Abluftanteilen von  $CO_2$  und  $O_2$  lässt sich dann die Sauerstoffverbrauchsrate  $Q_{O2}$ ,

$$Q_{O2}(t) = Q_{O2max}(t) \cdot \frac{x_{OGin}(t) \cdot [1 - x_{CGout}(t)] - x_{OGout}(t) \cdot [1 - x_{CGin}(t)]}{1 - x_{OGout}(t) - x_{CGout}(t)} \quad (7.3)$$

ermitteln. Der Faktor  $Q_{O2max}$ ,

$$Q_{O2max}(t) = \frac{F_{nG}(t) \cdot M_{O2}}{V_{nM} \cdot V_L(t)} \quad (7.4)$$

setzt sich zusammen aus der Begasungsrate  $F_{nG}$  in l/h, der molaren Masse  $M_{O2} = 32$  g/mol, dem molaren Volumen  $V_{nM} = 22.414$  l/mol und dem Flüssigvolumen im Reaktor  $V_L$  in l.

Auf ähnliche Weise wie  $Q_{O2}$  lässt sich auch die Kohlendioxidproduktionsrate  $Q_{CO2}$ ,

$$Q_{CO2}(t) = Q_{CO2max}(t) \cdot \frac{x_{CGout}(t) \cdot [1 - x_{OGin}(t)] - x_{CGin}(t) \cdot [1 - x_{OGout}(t)]}{1 - x_{OGout}(t) - x_{CGout}(t)} \quad (7.5)$$

bestimmen. Analog zu  $Q_{O_2max}$  ist  $Q_{CO_2max}$ ,

$$Q_{CO_2max}(t) = \frac{F_{nG}(t) \cdot M_{CO_2}}{V_{nM} \cdot V_L(t)} \quad (7.6)$$

zu berechnen. Aus  $Q_{O_2}$  und  $Q_{CO_2}$  lässt sich über die jeweiligen molaren Massen von  $CO_2$  und  $O_2$  der Respiratorische Quotient (RQ),

$$RQ(t) = \frac{Q_{CO_2}(t) \cdot M_{O_2}}{Q_{O_2}(t) \cdot M_{CO_2}} \quad (7.7)$$

errechnen. Dieser gibt Aufschluss über das Verhältnis von produziertem Kohlendioxid zu verbrauchtem Sauerstoff. Außerdem lässt sich die Sauerstoffverbrauchsrate  $Q_{O_2}$  ins Verhältnis mit der Zellmasse  $c_{XL}$  setzen und so die spezifische Sauerstoffaufnahme  $q_{O/X}$ ,

$$q_{O/X}(t) = \frac{Q_{O_2}(t)}{c_{XL}(t)} \quad (7.8)$$

errechnen.

### Substratbilanz

Zur Bilanzierung der Substratverbrauchsrate werden die Vorlagegefäße auf Waagen gestellt und deren Signale ausgewertet.

Die volumetrische S1-Eintragsrate  $Q_{S1in}$ ,

$$Q_{S1in}(t) = \frac{m_{R1}(t_i) - m_{R1}(t_{i-1})}{V_L(t_i) \cdot \Delta t} \quad (7.9)$$

bezieht sich in diesem Fall auf Glycerin und errechnet sich aus den Differenzwerten des Waagensignals und dem Flüssigvolumen im Reaktor. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass Glycerin in der Vorlage eine Konzentration von  $c_{Gly\_in\_R1} = 250 \text{ g/l}$  und somit eine Dichte von  $\rho_{R1} = 1046.5 \text{ g/l}$  hat. Mit Hilfe der Gleichungen der Dichte  $\rho_{R1}$ ,

$$\rho_{R1} = \frac{m_{R1}}{V_{R1}} \quad (7.10)$$

und der Gleichung für die Konzentration  $c_{Gly\_R1}$ ,

$$c_{\text{Gly}_R1} = \frac{m_{\text{Gly}_R1}}{V_{R1}} \quad (7.12)$$

lässt sich die Masse des Waagensignals in die Masse des reinen Glycerins umrechnen.

Somit wird die Masse für reines Glycerin  $m_{\text{Gly}_R1}$ ,

$$m_{\text{Gly}_R1} = c_{\text{Gly}_R1} \cdot \frac{m_{R1}}{\rho_{R1}} \quad (7.14)$$

in Gleichung 7.9 eingesetzt und es ergibt sich  $Q_{S1in}$ ,

$$Q_{S1in}(t) = \frac{m_{\text{Gly}_R1}(t_i) - m_{\text{Gly}_R1}(t_{i-1})}{V_L(t) \cdot \Delta t} \quad (7.15)$$

zur Bilanzierung der Masse von reinem Glycerin. Die spezifische Glycerinaufnahmerate  $q_{S1/X}$ ,

$$q_{S1/X}(t) = \frac{Q_{S1}(t)}{c_{XL}(t_i)} \quad (7.16)$$

errechnet sich aus dem Verhältnis von  $Q_{S1}$  zu der Zellkonzentration  $c_{XL}$ .

Die volumetrische S2-Eintragsrate  $Q_{S2in}$ ,

$$Q_{S2in}(t) = \frac{m_{R2}(t_i) - m_{R2}(t_{i-1})}{V_L(t) \cdot \Delta t} \quad (7.17)$$

bezieht sich auf das zweite Substrat, in diesem Fall Methanol. Für Methanol entfällt die Umrechnung über die Konzentration, da 100 %iger Methanol in der Vorlage verwendet wird. Somit ist  $m_{R2} = m_{\text{MeOH}_R2}$ . Da aber die Methanolzugabe gesteuert wird und so in einer bestimmten Konzentration vorliegt, muss diese berücksichtigt werden. Im gleichen Schritt wird  $Q_{S2in}$  noch auf die Zellkonzentration bezogen und man erhält die spezifische Methanolaufnahmerate  $q_{S2/X}$ .

$$q_{S2/X}(t) = \frac{m_{R2}(t_i) - m_{R2}(t_{i-1}) + c_{S2M}(t_i) \cdot m_L(t_i) - c_{S2M}(t_{i-1}) \cdot m_L(t_{i-1})}{c_{XL}(t_i) \cdot V(t_i) \cdot \Delta t} \quad (7.18)$$

Unter der Annahme, dass *Pichia pastoris* bei aerober Fermentation relativ wenig organische Säuren produziert, ist die Änderung des pH-Wertes wohl darauf zurück zu führen, dass das basische Korrekturmittel Ammoniak als Stickstoffquelle dient (Lucks 2013). Wird Ammoniak von den Zellen aufgenommen, sinkt der pH-Wert. Da dieser aber geregelt wird, wird ständig

Ammoniak nachgeführt. Somit lässt sich näherungsweise über die Ammoniakverbrauchsrate auf die Stickstoffaufnahme schließen. Da Stickstoff einer der wichtigsten Bestandteile von Aminosäuren ist, lassen sich hierüber außerdem Rückschlüsse über die Proteinproduktion in der Zelle ziehen.

Die Bilanzierung des verbrauchten Ammoniaks erfolgt analog zur Bilanzierung des Glycerins. Die Konzentration des Ammoniaks in der Vorlage beträgt 125 g/l bei einer Dichte von 966.2 g/l.

Somit kann aus dem Waagsignal die Masse an reinem Ammoniak bestimmt werden, das dem Fermenter zugeführt wird. Im Ammoniakmolekül liegt Stickstoff mit einem Masseanteil von 82.24 % vor. Mit diesem Faktor ist eine Umrechnung von  $m_{\text{NH}_3, \text{T}_2}$  auf  $m_{\text{N}, \text{T}_2}$  möglich. Mit Hilfe von Gleichung 7.19 ist so die spezifische Stickstoffaufnahme  $q_{\text{N/X}}$ ,

$$q_{\text{N/X}}(t) = \frac{m_{\text{N}, \text{T}_2}(t_i) - m_{\text{N}, \text{T}_2}(t_{i-1})}{c_{\text{XL}}(t_i) \cdot V_{\text{L}}(t_i) \cdot \Delta t} \quad (7.19)$$

zu errechnen.

## 7.1.2 Analyse der Fermentation JDJB2015

### Übersicht

In Abb. 15 ist die Fermentation JDJB2015 mit den wichtigsten Prozessgrößen und Parametern dargestellt. Während der gesamten Fermentation lag der Druck im Fermenter bei 0.5 bar und der pH-Wert wurde mittels Ammoniak und Phosphorsäure auf  $\text{pH} = 5$  geregelt. Gut zu erkennen ist, dass kurz nach dem Animpfen der  $\text{pO}_2$ -Wert auf etwa 85 % absinkt, da sich die Zellen, die dem Fermenter zugeführt werden, in der exponentiellen Phase befinden und daher sofort Sauerstoff aus dem Medium aufnehmen.

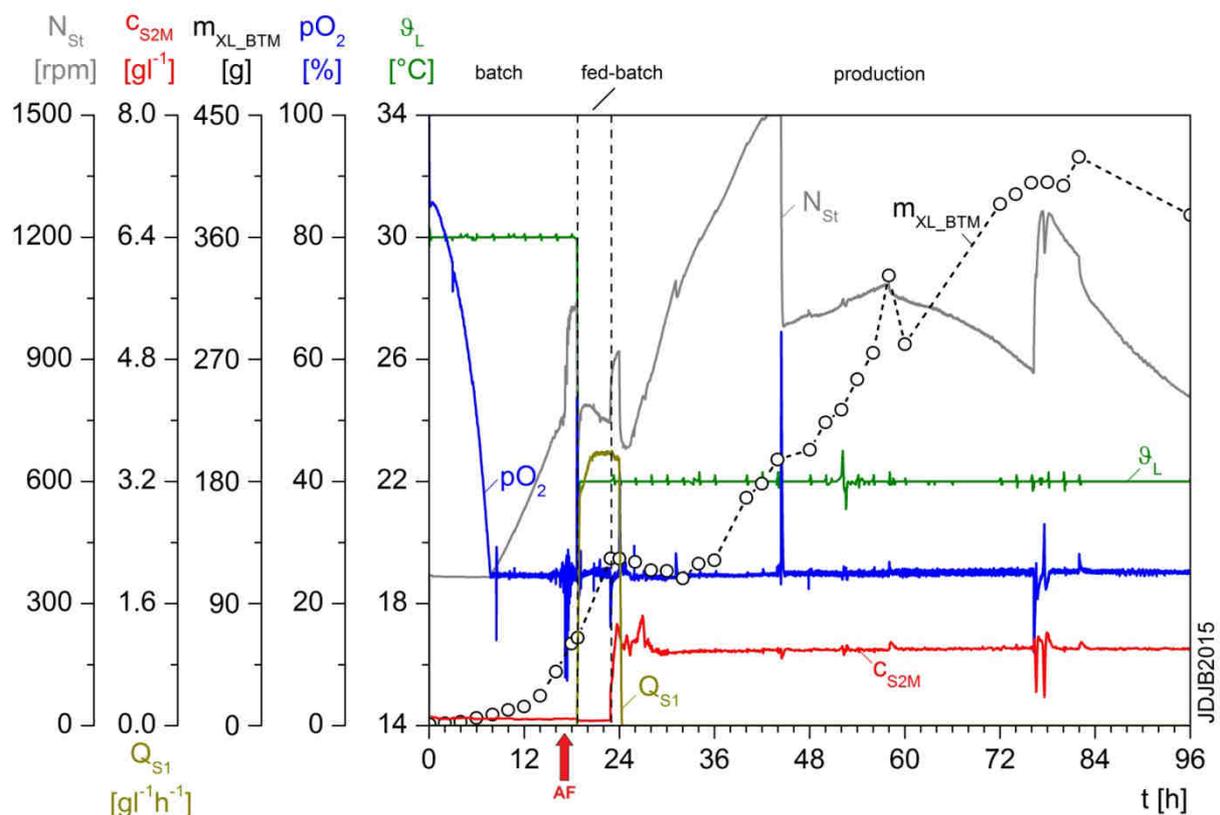


Abb. 15: Übersicht der gewählten Parameter für die Fermentation JDJB2015. Dargestellt ist der  $\text{pO}_2$ -Wert, die Temperatur  $\theta_L$ , die aus den BTM-Werten ermittelte Zellmasse  $m_{\text{XL\_BTM}}$ , die Methanolkonzentration  $c_{\text{S2M}}$ , und die volumetrische Glycerineintragsrate  $Q_{\text{S1in}}$ . Der Zugabezeitpunkt von Antischaummittel (AF) ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

In den weiteren Stunden wachsen die Zellen exponentiell und nehmen weiter Sauerstoff aus dem Medium auf. Sobald der  $\text{pO}_2$ -Sollwert von 25% unterschritten wird, setzt die  $\text{pO}_2$ -Regelung über die Rührerdrehzahl ein. Zum Zeitpunkt  $t = 17.1$  h stand der Schaum trotz mechanischem Schaumzerstörer bis zum Antischaumsensor und es wurden 2.45 g Antischaummittel in den Reaktor gefördert. Im Medium wurde zuvor kein Antischaummittel vorgelegt. Gut zu erkennen ist das exponentielle Wachstum der Zellen anhand der aus den

Biotrockenmassewerten (BTM) berechneten Zellmasse  $m_{XL\_BTM}$ . Für die Batch-Phase ergibt sich ein  $\mu_{max1} = 0.21 \text{ h}^{-1}$ .

Zum Zeitpunkt  $t = 18.6 \text{ h}$  ist das Glycerin im Medium aufgebraucht und die Batch-End-Erkennung schaltet in die Fed-Batch-Phase um. Während der Fed-Batch-Phase wurde die Temperatur auf  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  abgesenkt und Glycerin aus der Vorlage in den Fermenter gepumpt. Aus Erkenntnissen vorheriger Fermentationen sind die Pumpeneinstellungen so gewählt, dass die Zellen kontrolliert bei einem  $\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$  wachsen. Bei einer früheren Fermentation lag die Konzentration der Glycerinvorlage bei  $500 \text{ g/l}$ . Hier war die Pumprate aber so langsam, dass die Tropfen, die in den Fermenter gepumpt wurden, sofort aufgebraucht wurden und somit der  $p\text{O}_2$ -Wert ständig hochschnellte. Daher wurde bei dieser Fermentation die Konzentration auf  $250 \text{ g/l}$  herabgesetzt. Wie zu erkennen ist, konnte dadurch das Schwingen des  $p\text{O}_2$ -Wertes während der Fed-Batch-Phase erfolgreich verhindert werden. Allerdings lag die Anfangspumprate der Glycerinpumpe bereits bei  $86 \%$  der Maximalpumprate. Wie an der Glycerineintragsrate  $Q_{S1in}$  zu erkennen ist, konnte die Pumprate also nur zu Beginn der Fed-Batch-Phase wie geplant exponentiell gesteigert werden. Ab dem Zeitpunkt  $t = 20.5 \text{ h}$  lag die Pumprate bei  $100 \%$  und es wurde kein exponentielles Zufütterungsprofil mehr gefahren. Bis zum Ende der Fed-Batch-Phase lag somit eine Glycerinlimitierung vor und die Zellen wuchsen nur noch linear. Über die gesamte Fed-Batch-Phase ergibt sich ein  $\mu_{w1} = 0.14 \text{ h}^{-1}$ .

Zu Prozesszeit  $t = 23.0 \text{ h}$  ist die gewünschte Zellkonzentration von  $30 \text{ g/l}$  erreicht und die Produktionsphase wird eingeleitet. Aufgrund eines Fehlers im MFCS-Rezept wurde die Glycerinpumprate nicht linear heruntergefahren. Daher wurde die Glycerinpumpe bei  $t = 24.0 \text{ h}$  manuell ausgeschaltet. Währenddessen wurde Methanol aus der Vorlage in den Reaktor gepumpt, bis eine Konzentration von  $1 \text{ g/l}$  im Medium vorlag. Über die Methanolsonde wurde die Methanolkonzentration gemessen und infolgedessen die Methanolkumprate geregelt. Für die Produktionsphase ergibt sich ein  $\mu_{max2} = 0.02 \text{ h}^{-1}$ .

Zum Zeitpunkt  $t = 96.0 \text{ h}$  war kein weiteres Wachstum zu erkennen und die Fermentation wurde beendet.

## Gasbilanz

In Abb. 16 sind die Ergebnisse der Abgasanalytik dargestellt. Aufgetragen sind der Stoffmengenanteil von Sauerstoff in der Abluft  $x_{O_2}$ , der Stoffmengenanteil von Kohlendioxid in der Abluft  $x_{CO_2}$ , die Rührerdrehzahl  $N_{St}$  und der  $pO_2$ -Wert.

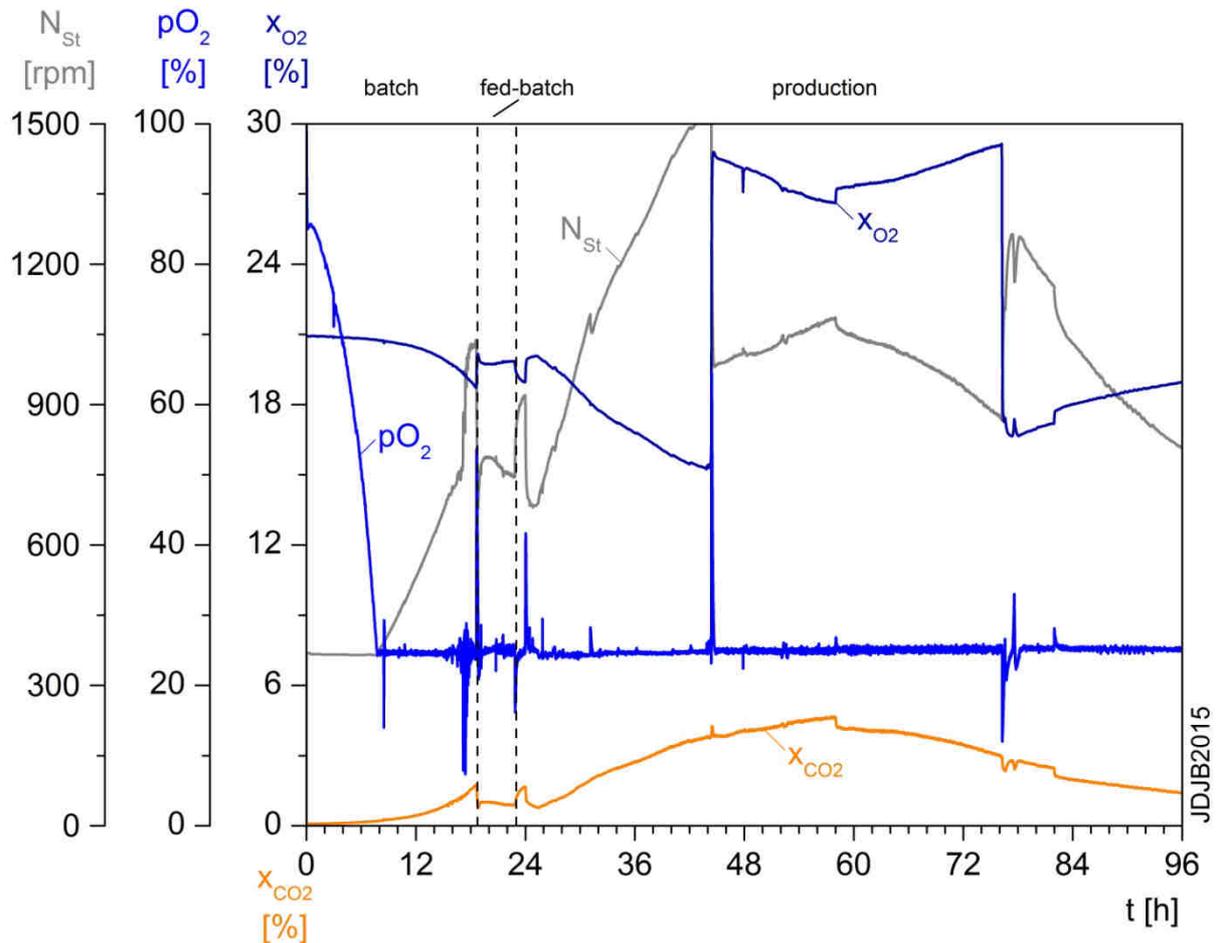


Abb. 16: Darstellung der Abgasanalysewerte der Fermentation JDJB2015. Dargestellt sind der Stoffmengenanteil von Sauerstoff in der Abluft  $x_{O_2}$ , Stoffmengenanteil von Kohlendioxid in der Abluft  $x_{CO_2}$ ,  $pO_2$ -Wert und Rührerdrehzahl  $N_{St}$ .

Die  $pO_2$ -Sonde wird vor der Fermentation unter Fermentationsbedingungen kalibriert. Hierfür wird in das Medium bei 30 °C, 0.5 bar und 350 rpm mit 5.5 l/min Stickstoff eingeleitet. Der sich einstellende Wert wird als „0 %“ gesetzt. Unter gleichen Bedingungen wird Luft eingeleitet und der sich einstellende Wert als „100 %“ gesetzt.

Wie bereits beschrieben sinkt der  $pO_2$ -Wert kurz nach dem Animpfen stark ab, da sich die Zellen aus dem Inokulum in der exponentiellen Phase befinden und sofort Sauerstoff aus dem Medium aufnehmen. Der  $pO_2$ -Wert wird zunächst über die Rührerdrehzahl geregelt. Da zu Beginn die Zellkonzentration und somit der Sauerstoffbedarf gering ist, reicht eine Drehzahl von 350 rpm aus, um den  $pO_2$ -Wert über 25 % zu halten. Nach  $t = 7.5$  h ist der  $pO_2$ -Wert von 25 % erreicht und die Drehzahl von 350 rpm reicht nicht mehr aus, um den

$pO_2$ -Wert über dem Sollwert zu halten. Zu diesem Zeitpunkt setzt die  $pO_2$ -Regelung über die Rührerdrehzahl ein und die Drehzahl wird stufenlos gesteigert. Zum Zeitpunkt  $t = 17.1$  h wurde Antischaummittel in den Reaktor gefördert. Dadurch wird die Sauerstofftransferate von der Gasphase in die Flüssigphase verringert. Um den  $pO_2$ -Wert weiterhin auf 25 % zu halten, muss daher die Rührerdrehzahl deutlich gesteigert werden. Während der Batch-Phase ist das exponentielle Wachstum der Zellen gut an  $x_{O_2}$  und  $x_{CO_2}$  zu erkennen, welches absinkt bzw. exponentiell ansteigt.

Während der Fed-Batch-Phase ist kein Anstieg des Kohlendioxidanteils zu erkennen, was darauf hindeutet, dass der Stoffwechsel aufgrund der Temperaturänderung deutlich verlangsamt ist. Die Rührerdrehzahl nimmt während der Fed-Batch-Phase sogar leicht ab. Allerdings zeigen die Ergebnisse der BTM-Bestimmung, dass ein deutliches Zellwachstum vorlag.

Zu Beginn der Produktionsphase liegen sowohl Glycerin als auch Methanol als Substrat vor und ein leichter Anstieg im Kohlendioxidanteil ist zu erkennen. Ebenso steigt die Rührerdrehzahl. Nachdem die Glycerinpumpe ausgeschaltet wurde, sackt die Drehzahl stark ab. Die Zellen beginnen ihren Stoffwechsel umzustellen und erneut steigt die Rührerdrehzahl an, um den  $pO_2$ -Wert auf 25 % zu halten. Zum Zeitpunkt  $t = 44.4$  h ist die Maximaldrehzahl von 1500 rpm erreicht und eine  $pO_2$ -Regelung über die Rührerdrehzahl ist nicht mehr möglich. Daher wird die Begasung von Luft auf Gasmix umgestellt. Hierbei wird, statt wie vorher mit 5.5 l/min Luft, jetzt mit 4.5 l/min Luft und 1 l/min reinem Sauerstoff begast. Dies ist deutlich am sprunghaften Anstieg des Sauerstoffstoffmengenanteils in der Abluft zu erkennen. Während der Begasung mit Luft/Sauerstoff wird der  $pO_2$ -Wert wieder über die Rührerdrehzahl geregelt. Da zum Zeitpunkt  $t = 58$  h etwa 400 ml Zellbrühe aus dem Reaktor entnommen wurden, kommt es aufgrund von veränderten Durchmischungsverhältnissen und geringerem Sauerstoffbedarf zu einem kleinen Anstieg von  $x_{O_2}$  und einem Abfall von  $x_{CO_2}$ . Ebenso verhält es sich zu Prozesszeit  $t = 82$  h, da auch hier Zellbrühe entnommen wurde. Zu Prozesszeit  $t = 76.2$  h ist ersichtlich, dass die Zellen ein Wachstumsmaximum durchlaufen haben und eine Begasung mit einem Gasmix nicht mehr nötig ist. Nach Einstellung von 5.5 l/min Luft steigt die Rührerdrehzahl deutlich an, aber bleibt weit unterhalb der Maximaldrehzahl von 1500 rpm.

In Abb. 17 sind die respiratorischen Größen aufgetragen, die mit Hilfe der Abgasanalytikwerte berechnet wurden. Der Respiratorische Quotient (RQ) gibt Aufschluss über das Verhältnis von abgegebenem Kohlendioxid zu aufgenommenem Sauerstoff. Bei der katabolen Metabolisierung von Kohlenhydraten liegt der RQ bei 1. Bei vergleichbaren *P. pastoris*-Stämmen liegt der RQ bei der Verstoffwechslung von Glycerin bei ca. 0.86.

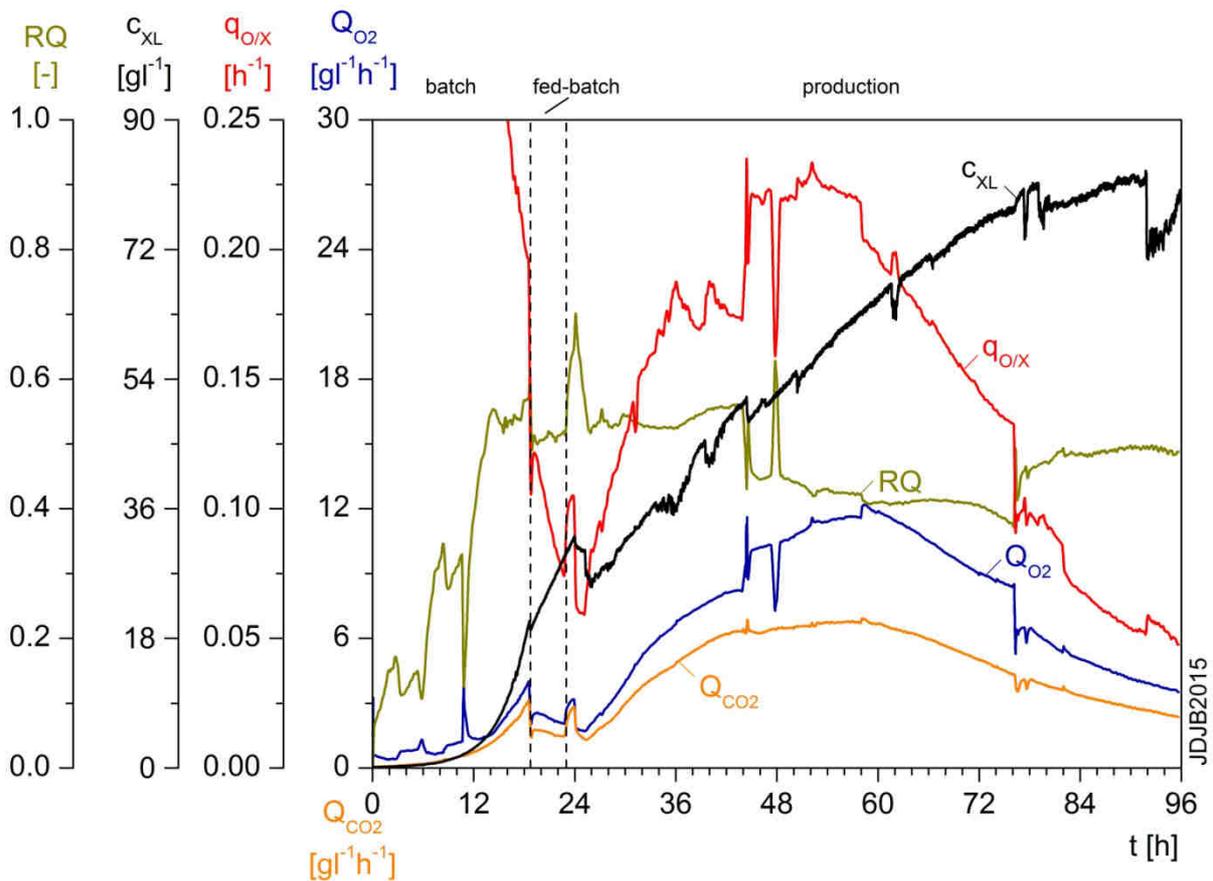


Abb. 17: Auftragung der aus den Abgasanalytikwerten abgeleiteten respiratorischen Größen.

Wie in Abb. 17 zu erkennen ist, steigt der RQ während der Batch-Phase langsam an, bis dieser einen Wert von ca. 0.55 erreicht. Die Abweichung zum Literaturwert von 0.86 ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei der Produktion von Kohlenhydraten, die für das Zellwachstum benötigt werden, ein niedrigerer RQ vorliegt. Dies liegt daran, dass Kohlenhydrate ein höheres C:H-Verhältnis als Glycerin haben und somit bei der Bildung von Kohlenhydraten Sauerstoff frei wird. Dieser wird zellintern mit freiwerdenden Wasserstoffionen zu Wasser umgesetzt und fällt somit aus der Bilanzierung heraus (Lucks 2013).

Wie sich schon aus den Werten der Abgasanalytik abgezeichnet hat, ist bei  $Q_{O_2}$  und  $Q_{CO_2}$  ein deutliches Maximum zu erkennen. Der Versatz in der Kurve von  $Q_{O_2}$  und  $q_{O/X}$  ist auf das An- und Abschalten der Gasmixbegasung zurückzuführen. Das Maximum deutet darauf hin, dass die Zellen hinsichtlich ihrer Stoffwechselaktivität ebenfalls ein Maximum durchlaufen. Das Maximum der Aktivität liegt bei ca.  $t = 54$  h, also ca. 31 h nach Induktion mit Methanol.

Möglicherweise liegt das Absinken der Stoffwechselaktivität nach ca. 54 h an einer Limitierung durch ein Spurenelement oder Ähnlichem. Allerdings wurde für diese Fermentation bereits Vollsalzmedium eingesetzt, um dieses Problem weitestgehend auszuschließen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Produkt, welches antimikrobielle Wirkung hat, möglicherweise auch die Aktivität von *Pichia pastoris* herabsenkt.

### Substratbilanz

In Abb. 18 sind die spezifischen Größen der Substratbilanzierung aufgetragen. Bilanziert werden die spezifische Aufnahme rate von Glycerin während der Fed-Batch-Phase, die spezifische Methanolaufnahmerate während der Produktionsphase und die spezifische Stickstoffaufnahme rate während aller drei Phasen.

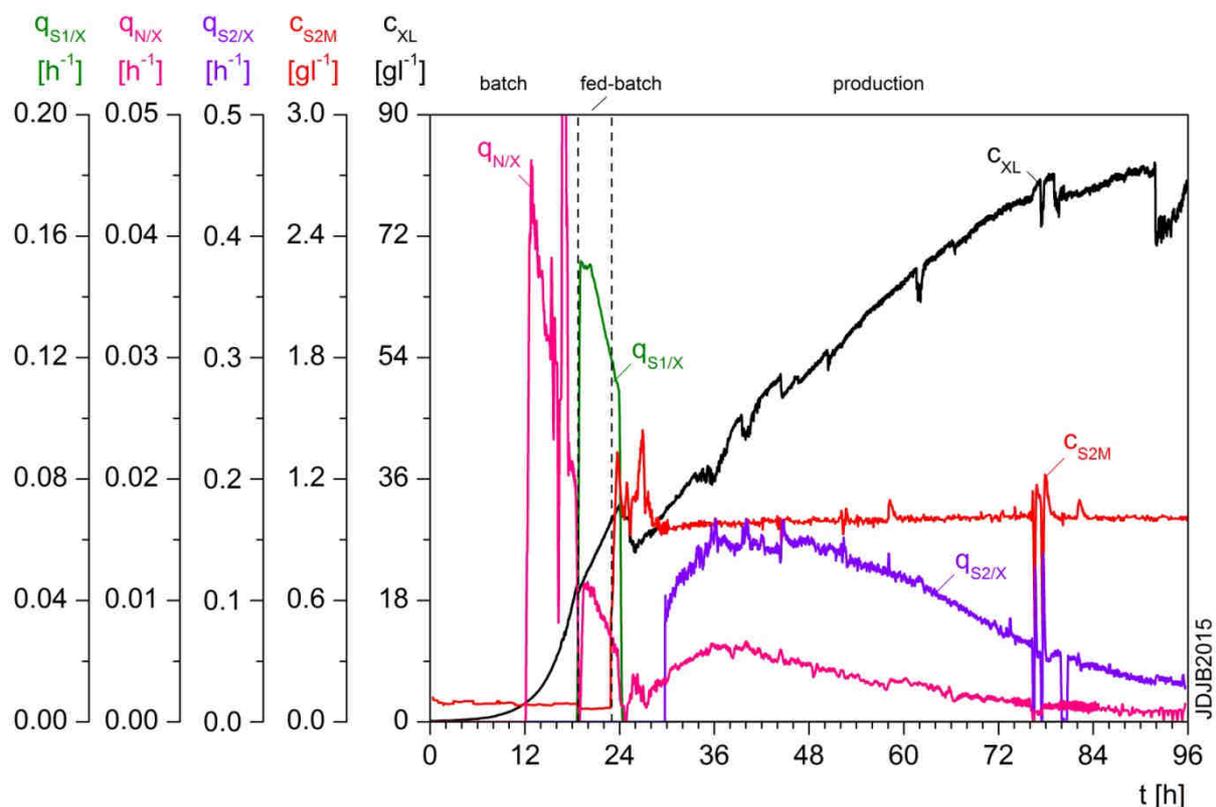


Abb. 18: Auftragung der Größen der Substratbilanzierung. Dargestellt sind die spezifische Glycerinaufnahmerate  $q_{S1/X}$ , die spezifische Stickstoffaufnahme rate  $q_{N/X}$ , die spezifische Methanolaufnahmerate  $q_{S2/X}$ , die Methanolkonzentration im Medium  $C_{S2M}$  und die Zellkonzentration  $C_{XL}$ .

Die spezifische Glycerinaufnahmerate  $q_{S1/X}$  ist in Grün dargestellt. Im Optimalfall ist die Pumpe so eingestellt, dass sich ein exponentielles Feedprofil ergibt und somit  $q_{S1/X}$  eine Parallele zur Abszisse bildet. Da die Pumpgeschwindigkeit aber schon nach 2 h in der Fed-Batch-Phase ihr Maximum erreicht hatte, wurde bei steigender Zellkonzentration mit

konstanter Zufütterung gepumpt. Somit ergibt sich ein fallendes  $q_{S1/X}$  für den Rest der Fed-Batch-Phase.

Da die Waage, auf der die Basenvorlage stand, erst ab  $t = 12$  h Werte aufgezeichnet hat, kann erst ab diesem Zeitpunkt die Stickstoffaufnahme bilanziert werden. Zum Zeitpunkt  $t = 17$  h stand sehr hoher Schaum im Kopfraum des Reaktors, der nur teilweise vom mechanischen Schaumzerstörer zerstört wurde. Base, die zur pH-Regulierung in den Reaktor gepumpt wurde, wurde relativ lange durch den Schaum zurückgehalten. Als dann eine größere Menge Base in die Flüssigphase gelangte, stieg der pH-Wert zu stark an und Säure wurde gegentitriert. Aber auch die Säure gelangte nicht sofort in die Flüssigphase, weshalb sich die Korrekturmittelverbäuche gegenseitig aufschaukelten. Daher ist  $q_{N/X}$  im Bereich von ca.  $t = 16$  h bis  $t = 18$  h nicht auswertbar. Während der Fed-Batch-Phase wird die spezifische Stickstoffaufnahme immer geringer. Zu Beginn der Produktion sinkt diese dann fast auf Null, bis sich die Zellen an das veränderte Substrat adaptiert haben. Daraufhin steigt  $q_{N/X}$  fast bis auf  $0.08 \text{ h}^{-1}$  an. Zum Zeitpunkt  $t = 38$  h, also ca. 15 h nach Produktionsstart, ist ein lokales Maximum von  $q_{N/X} = 0.005 \text{ h}^{-1}$  erreicht und die spezifische Stickstoffaufnahme beginnt langsam zu sinken. Der Abfall von  $q_{N/X}$  deutet möglicherweise darauf hin, dass bis zu diesem Zeitpunkt viel Stickstoff aufgenommen wurde, um das Enzym Alkoholoxydase und möglicherweise das Zielpeptid herzustellen. Aufgrund der zum späteren Zeitpunkt fallenden Methanolaufnahmerate wird nicht mehr so viel Alkoholoxydase benötigt und die spezifische Stickstoffaufnahme sinkt.

Ähnlich dem Problem mit der Waage für die Base hat auch die Waage für die Methanolvorlage erst ab  $t = 30$  h, also ca. 7 h nach Produktionsstart, Werte aufgezeichnet. Auch für den Verlauf der spezifischen Methanolaufnahmerate  $q_{S2/X}$  ist ein Maximum zu einem ähnlichen Zeitpunkt wie bei der Stickstoffaufnahme zu erkennen. Hier zeigt sich aber ein etwas längeres Plateau von  $t = 38$  bis  $t = 54$  h, in dem die spezifische Methanolaufnahmerate auf relativ konstantem Niveau bei  $q_{S2/X} = 0.15 \text{ h}^{-1}$  verbleibt. Interessanterweise deckt sich dieses Maximum der Substratstoffwechselaktivität mit dem Maximum, das aus den Werten der Abgasanalytik ermittelt wurde. Hier liegt es ebenfalls etwa bei einer Prozesszeit von  $t = 54$  h.

## **SDS-PAGE**

In Ergänzung zu den hier gezeigten Daten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Jan Demmer die Proben der Fermentation JDJB2015 mittels SDS-PAGE analysiert. Die SDS-PAGE dient dazu, festzustellen, ob sich im Kulturüberstand Peptide in der Größe des Zielpeptides befinden. In Abb. 19 ist das eingescannte Gel der SDS-PAGE dargestellt.

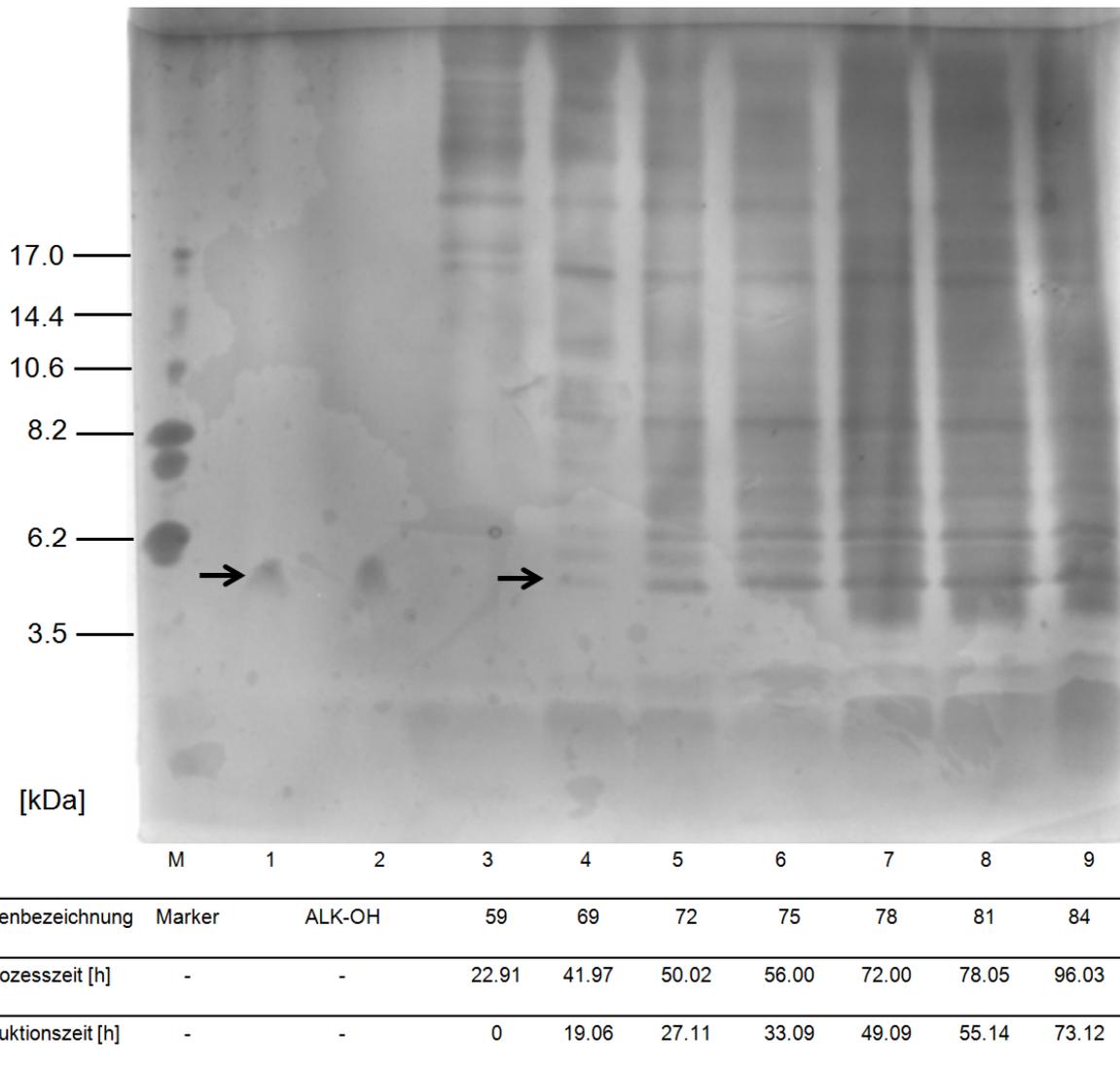


Abb. 19: Abbildung des 15 %igen Trenngels der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung zur Fermentation JDJB2015. In Spalte M ist der Marker, in Spalte 1 und 2 die synthetische Form des Peptides ALK-OH in unterschiedlichen Konzentrationen, in Spalte 3 ist der Kulturüberstand vor Methanolinduktion und in Spalte 4 bis 9 der Kulturüberstand zu verschiedenen Zeitpunkten nach Methanolinduktion aufgetragen. Die Lage des synthetischen Referenzpeptides ALK-OH und die der in Frage kommende Bande im Überstand ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Vom Marker in Spalte M wurde 1 µg aufgetragen. Vom synthetischen Referenzpeptid C7A-M11L-D21K-OH (ALK-OH) wurde in der ersten Spalte 0.1 µg und in der zweiten Spalte 0.05 µg aufgetragen. Die Position des Referenzpeptides ist in Abb. 19 mit einem Pfeil markiert. Das synthetische Peptid ALK-OH hat eine Größe von 3.16 kDa und zeigt somit ein etwas anderes Laufverhalten als die Peptide des Größenstandards in Spalte M.

Der Kulturüberstand in Spalte 3, der vor der Methanolinduktion entnommen wurde, zeigt auf der gleichen Höhe wie das synthetische Peptid ALK-OH keine Bande. Somit liegt vor der

Induktion kein Peptid mit der gleichen Größe wie das Zielpeptid im Überstand vor. Der Kulturüberstand in Spalte 4, also 19.06 h nach Induktion, zeigt eine Bande auf gleicher Höhe zum Referenzpeptid. Folglich könnte es sich bei dieser Bande um das Zielpeptid handeln, das nach erfolgter Methanolinduktion exprimiert wurde. Die Intensität der Bande auf dieser Höhe nimmt im Verlauf der Fermentation noch zu (Spalte 5 – Spalte 9), allerdings nimmt auch die Hintergrundfärbung zu. Daher kann nicht von einer übermäßig starken Expression des Peptides auf dieser Höhe gesprochen werden. Dennoch ist es nicht ausgeschlossen, dass es sich bei dem Peptid auf der Höhe des synthetischen ALK-OH um das Zielpeptid handelt.

## 7.2 Auswertung des Agarosediffusionstest

Der Agarosediffusionstest ist eine relativ einfache Methode, um nachzuweisen, ob sich im Kulturüberstand eine Substanz mit antimikrobieller Wirkung befindet. Da der Kulturüberstand an sich keine antimikrobielle Wirkung zeigt, würde eine Aktivität auf das zu exprimierende Zielpeptid zurückzuführen sein. In Abb. 20 sind die Ergebnisse des ADT zur Fermentation JDJB2015 in einem Säulendiagramm dargestellt. Die Fläche der Höfe wurde gemäß der Beschreibung im Methodenteil ermittelt. Bei einer Mehrfachbestimmung gibt der Fehlerbalken die Standardabweichung der Ergebnisse an.

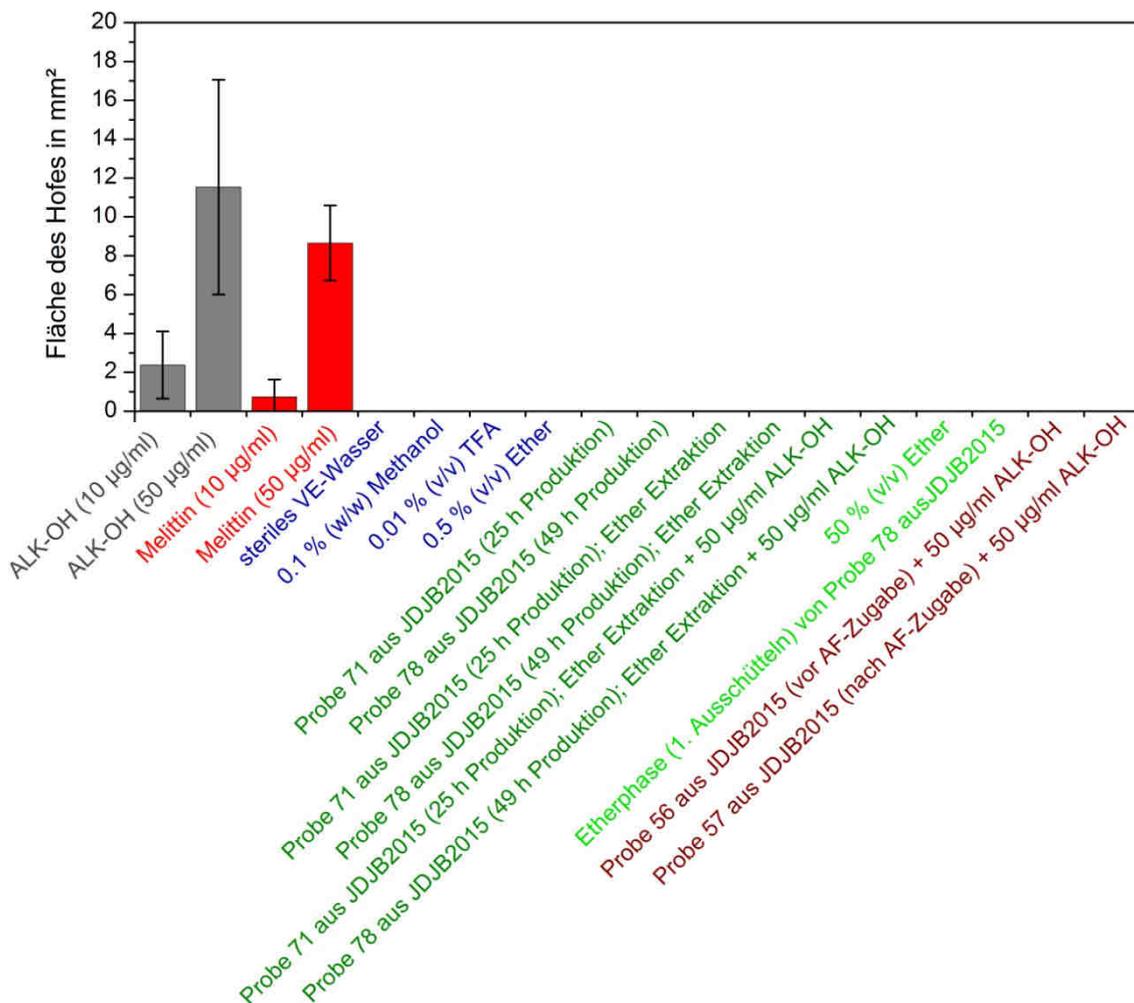


Abb. 20: Auswertung des Agarosediffusionstest zu Proben aus der Fermentation JDJB2015. In Grau ist das Referenzpeptid ALK-OH und in Rot die Positivkontrolle Melittin dargestellt. In Dunkelblau sind die Negativkontrollen und in Dunkelgrün die Fermentationsproben mit und ohne Etherextraktion dargestellt. In Hellgrün ist die Etherphase mit dazugehöriger Negativkontrolle dargestellt. Braun dargestellt sind die Fermentationsproben kurz vor und kurz nach Antischaummittelzugabe, die mit ALK-OH versetzt wurden.

Als Referenz wurde auf jeder Platte des ADT immer die synthetische Variante von ALK-OH in zwei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen (grau). Bei einem Auftragsvolumen von 5 µl ergibt sich für ALK-OH eine Nachweisgrenze von weniger als 50 ng. Als Positivkontrolle wurde das antimikrobielle Peptid Melittin ebenfalls in zwei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen (rot). Bei einer Konzentration von 10 µg/ml sind kleine Höfe zu erkennen. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml sind deutlich größere Höfe sehr gut zu erkennen. Des Weiteren wurde steriles VE-Wasser, 0.1 % Methanol, 0.01 % TFA und 0.5 % Ether als Negativkontrolle aufgetragen.

Proben des Kulturüberstandes nach 25 h Produktion (Probe 71) und nach 49 h Produktion (Probe 78) zeigen keine antimikrobielle Aktivität.

Da möglicherweise Lipide oder andere hydrophobe Bestandteile die Aktivität des antimikrobiellen Peptides herabsetzen, wurden die Proben 71 und 78 drei Mal mit -20 °C kaltem Diethylether ausgeschüttelt. Aber auch in dieser Probe konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob eine andere Substanz für die Aktivitätshemmung verantwortlich ist oder sich kein antimikrobielles Peptid im Überstand befindet, wurde der Überstand nach der Etherextraktion mit synthetischem ALK-OH versetzt. Aber auch hier zeigte sich keine Aktivität. Da synthetisches ALK-OH in 0.01 % TFA in einer Konzentration von 50 µg/ml normalerweise einen ca. 12 mm<sup>2</sup> großen Hof erzeugt, muss im Überstand eine Komponente sein, die die Aktivität hemmt.

Zur Sicherheit, dass Peptid nicht auch in die Etherphase gelangt ist und somit verworfen wurde, wurde die Etherphase nach dem ersten Ausschütteln ebenfalls auf den ADT aufgetragen. Aber auch hier zeigte sich keine Aktivität.

Um zu überprüfen, ob möglicherweise Antischaummittel die Aktivität des Zielpепtides hemmt, wurde der Kulturüberstand aus Prozesszeit  $t = 16$  h und der Kulturüberstand aus Prozesszeit  $t = 18$  h mit synthetischem ALK-OH versetzt. Die Proben wurden zu einem Zeitpunkt kurz vor Antischaumzugabe und zu einem Zeitpunkt kurz nach Antischaumzugabe genommen. Das Ergebnis zeigt, dass in keiner der beiden Proben das synthetische Peptid antimikrobielle Wirkung ausbildet und somit das Antischaummittel nicht oder nicht ausschließlich verantwortlich für die Aktivitätshemmung ist.

Um zu überprüfen, welche Komponente im Überstand die Aktivität des synthetischen ALK-OH hemmt, wurde der ADT mit den einzelnen Medienbestandteilen durchgeführt. Zu jeder Probe wurde jeweils ALK-OH bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml hinzugefügt. Das Ergebnis des ADT zur Überprüfung der Medienbestandteile ist in Abb. 21 dargestellt.

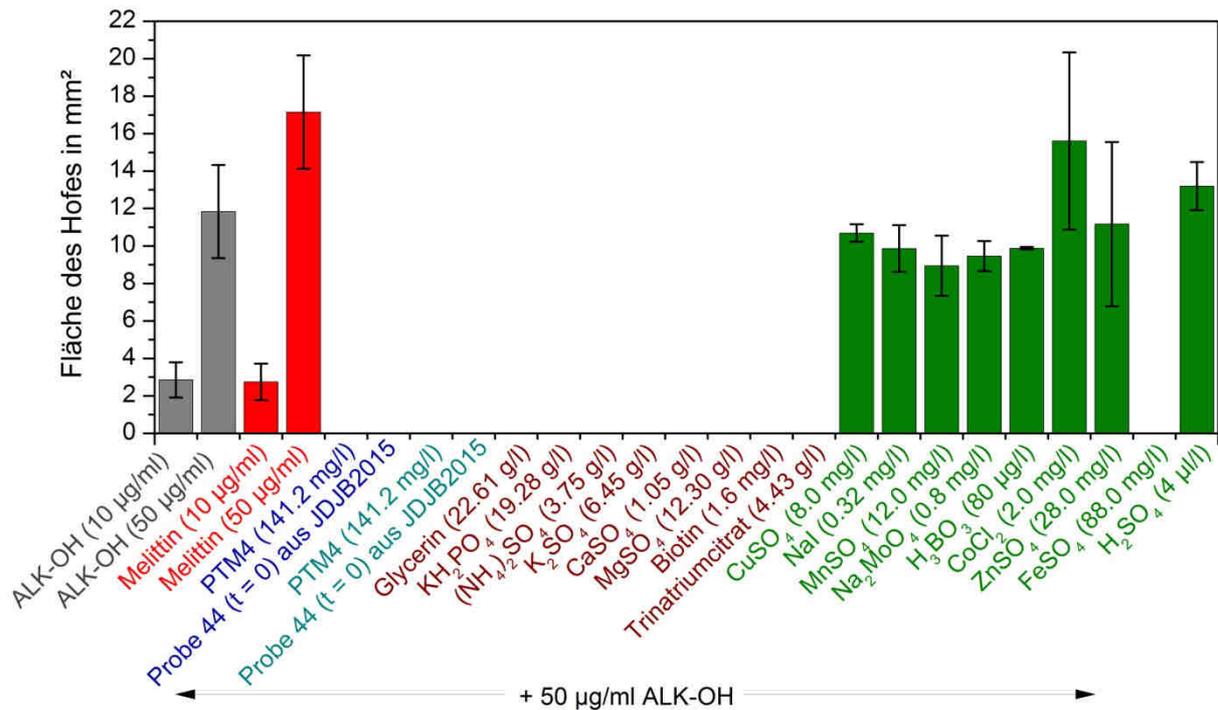


Abb. 21: Agarosediffusionstest mit Standardaddition von 50 µg/ml ALK-OH zu den einzelnen Medienbestandteilen des FM-22-Mediums. In Grau bzw. Rot dargestellt sind synthetisches ALK-OH und Melittin. In Dunkelblau sind PTM4 und Probe 44 dargestellt. Diese repräsentieren die Negativkontrolle. PTM4 und Probe 44 mit ALK-OH in einer Konzentration von 50 µg/ml sind in Hellblau dargestellt. Die Bestandteile des FM-22-Mediums wurden ebenfalls mit ALK-OH versetzt und sind in Braun dargestellt. Die mit ALK-OH versetzten Bestandteile des PTM4 sind in Dunkelgrün dargestellt.

Auch in dem in Abb. 21 dargestellten ADT wurden ALK-OH (grau) und Melittin (rot) in zwei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Wieder sind bei beiden Peptiden und beiden Konzentrationen Höfe zu erkennen.

Als Negativkontrolle (dunkelblau) wurden die Spurenelementlösung PTM4 und die Probe 44 der Fermentation JDJB2015, die direkt nach dem Animpfen genommen wurde (t = 0 h), aufgetragen. Beide Proben zeigen wie erwartet keine antimikrobielle Aktivität. Außerdem wurde dem PTM4 und Probe 44 das synthetische Peptid ALK-OH in einer Konzentration von 50 µg/ml hinzugesetzt (hellblau). Aber auch hier zeigt das Peptid keine Wirkung.

Um aufzuklären, welcher Bestandteil des FM-22 Mediums die Aktivität hemmt, wurde jeder einzelne Bestandteil des Mediums zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml mit ALK-OH versetzt. Hierbei wurden allerdings die Hauptbestandteile des Medium (braun) durch die Zugabe von ALK-OH auf eine Konzentration von 82 % im Vergleich zum Vollmedium herunterverdünnt. Dennoch zeigt jede Medienkomponente für sich eine Hemmung der Aktivität von ALK-OH in einer Konzentration von 50 µg/ml. Sogar Bestandteile wie Glycerin oder das Vitamin Biotin in einer Konzentration von 1.6 mg/l hemmen das Peptid.

Die Spurenelementlösung PTM4 liegt im Medium in einer Konzentration von 141.2 mg/l vor. Wie gezeigt, wird ALK-OH sogar in der Spurenelementlösung PTM4 gehemmt. Um nachzuweisen, welche Komponente innerhalb der PTM4-Lösung für die Hemmung verantwortlich ist, wurden die Einzelkomponenten der PTM4-Lösung jeweils mit ALK-OH bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml versetzt (grün). Auffällig ist hierbei, dass anscheinend das FeSO<sub>4</sub> in einer Konzentration von 88.0 mg/l für die Hemmung verantwortlich ist. Bei allen anderen Bestandteilen der PTM4-Lösung zeigen sich Höfe, die in ihrer Fläche mit der des Standards vergleichbar sind.

Um sicherzustellen, dass möglicherweise produziertes Peptid nicht in den Überstand sekretiert wurde, sondern in der Zelle verblieben ist, wurde ein Zellaufschluss nach SOP für AOX-Bestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse des ADT zum Zellaufschluss sind in Abb. 22 dargestellt.

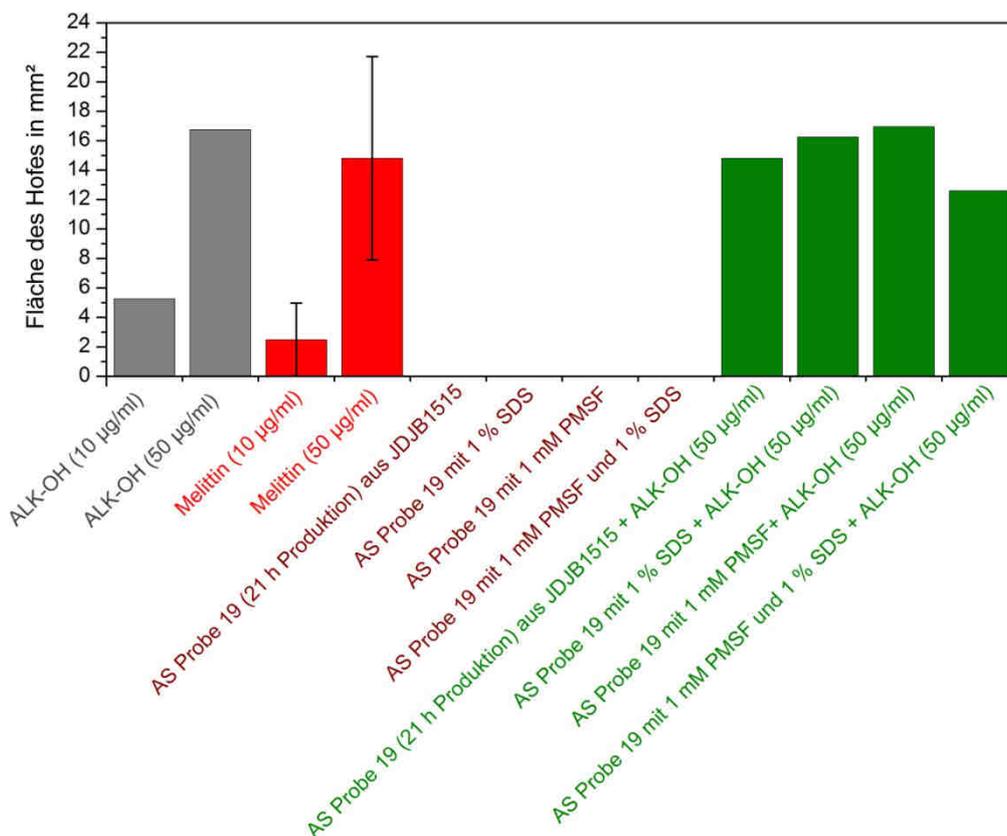


Abb. 22: Agarosediffusionstest zum Zellaufschluss von Proben aus der Fermentation JDJB1515. In Grau bzw. Rot dargestellt sind synthetisches ALK-OH und Melittin. In Braun dargestellt ist ein Zellaufschluss mit unterschiedlichen Reagenzien. In Dunkelgrün dargestellt ist dieser Zellaufschluss, zu dem ALK-OH hinzugefügt wurde.

Der Aufschluss der Probe 19 (21 h Produktion) aus Fermentation JDJB1515 wurde in vier verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Zum einen wurden die Zellen nur in 10 mM NaPB

resuspendiert und mit 1 mm-Glasperlen im Eppendorfreaktionsgefäß aufgeschlossen. Zum anderen wurden Aufschlüsse mit Glasperlen und 1 % SDS, Glasperlen mit 1 mM PMSF und Glasperlen mit 1 % SDS und 1 mM PMSF angesetzt. Die Glasperlen und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der Überstand auf den ADT aufgetragen (braun).

Außerdem wurden die jeweiligen Aufschlüsse mit ALK-OH zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt. Das Ergebnis in Abb. 22 zeigt, dass in den Aufschlüssen (braun) keine Substanz mit antimikrobieller Wirkung vorliegt. Die Ergebnisse der Standardaddition (grün) zeigen aber gleichzeitig, dass keine Substanz vorliegt, die eine mögliche Aktivität hemmen würde, da das zugesetzte ALK-OH zu vergleichbar großen Höfen führt. Somit kann mit hinreichender Sicherheit gesagt werden, dass sich kein aktives Peptid in den Zellen befindet. Möglicherweise wurde es erfolgreich sekretiert oder aber es hat trotz Zugabe von SDS an die Zellbruchstücke gebunden und wurde mitabzentrifugiert.

Zusammengefasst zeigt der ADT, dass der Kulturüberstand nach der Induktion mit Methanol nicht antimikrobiell wirksam ist. Außerdem lässt sich keine antimikrobielle Wirkung des Zellaufschlusses nachweisen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass jeder Medienbestandteil des FM-22-Mediums für sich bereits ALK-OH in einer Konzentration von 50 µg/ml vollständig in seiner Aktivität hemmt. Somit ist nicht auszuschließen, dass das Zielpeptid während der Produktionsphase der Fermentation erfolgreich exprimiert und ins Medium sekretiert wurde, dort allerdings durch Medienbestandteile in seiner Aktivität gehemmt wird.

## 7.3 Schlussfolgerungen und Ausblick

Wie in den vorigen Abschnitten gezeigt, konnte *Pichia pastoris* gemäß Fermentationsstrategie erfolgreich kultiviert werden.

Das Maximum der Stoffwechselfparameter während der Produktionsphase könnte an der erhöhten Produktion von Alkoholoxydase liegen. Sollte das Gen des Zielpeptides korrekt in das Genom eingebaut worden sein, müsste somit auch das Zielpeptid exprimiert werden.

Die SDS-PAGE aus der Masterarbeit von Jan Demmer zeigt eine Bande nach der Induktion, auf der Höhe des synthetischen Referenzpeptides. Vor der Induktion zeigt der Überstand keine Bande auf dieser Höhe. Dies spricht dafür, dass Peptid in der richtigen Größe während der Produktionsphase exprimiert wurde.

Der Agarosediffusionstest, der als Aktivitätstest für antimikrobielle Peptide dient, zeigte hingegen keine Aktivität des Überstandes und zwar unabhängig von der Induktionszeit. Des Weiteren konnte keine Aktivität in aufgeschlossenen Zellen nachgewiesen werden.

Die entscheidende Erkenntnis aus dem Agarosediffusionstest ist allerdings, dass jeder Medienbestandteil des FM-22-Mediums für sich bereits die Aktivität des synthetischen Peptides ALK-OH (50 µg/ml) vollständig hemmt. Sogar das Eisensulfat aus der Spurenelementlösung PTM4 liegt in einer Konzentration vor, welche das synthetische Peptid ebenfalls vollständig hemmt.

Somit besteht die Wahrscheinlichkeit, dass das Zielpeptid erfolgreich exprimiert und in das Medium sekretiert wurde, dort aber aufgrund der ionischen Medienbestandteile keine Aktivität zeigt.

Für eine nähergehende Untersuchung des Überstandes müsste dieser zunächst weiter aufgereinigt werden. In der Literatur sind verschiedene Maßnahmen beschrieben, von denen sich eine Filtration durch einen 0.45 µm-Filter mit anschließender RP-HPLC vielfach als zielführend erwiesen hat (Jin et al. 2006; Jin et al. 2009; Wang et al. 2009; Zhang et al. 2011). Die RP-HPLC bietet zudem den Vorteil, dass größere Mengen des Überstandes auf die Säule aufgetragen werden können und somit mögliches Zielpeptid gesammelt wird. Bei der Elution in geringerem Volumen findet somit eine Aufkonzentrierung statt.

Mit dem so gereinigten und aufkonzentrierten Überstand könnte anschließend erneut ein ADT durchgeführt werden und untersucht werden, ob während der Kultivierung erfolgreich aktives NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K produziert werden konnte.

## 8 Literaturverzeichnis

- Ahmad, M. et al., 2014. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, pp.5301–5317.
- Andersson, M. et al., 1995. NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity. *The EMBO journal*, 14(8), pp.1615–1625.
- Andrä, J. et al., 2007. Rationale for the design of shortened derivatives of the NK-lysin-derived antimicrobial peptide NK-2 with improved activity against gram-negative pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, 282(20), pp.14719–14728.
- Andrä, J., Berninghausen, O. & Leippe, M., 2000. Cecropins, antibacterial peptides from insects and mammals, are potently fungicidal against *Candida albicans*. *Medical Microbiology and Immunology*, 189, pp.169–173.
- Andrä, J. & Leippe, M., 1999. Candidacidal activity of shortened synthetic analogs of amoebapores and NK-lysin. *Medical Microbiology and Immunology*, 188, pp.117–124.
- APD & University of Nebraska, 2015. The Antimicrobial Peptide Database. Available at: <http://aps.unmc.edu/AP> [Accessed June 19, 2015].
- Brogden, K. a et al., 1996. Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(January), pp.412–416.
- Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology*, 3(MARCH), pp.238–250.
- Bundesministerium für Gesundheit, 2015. Bekämpfung resistenter Erreger: 10-Punkte-Plan zur Vermeidung behandlungsassoziierter Infektionen und Antibiotika-Resistenzen. Available at: [https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/dateien/Downloads/A/Antibiotikaresistenzstrategie/10-Punkte\\_Antibiotika-Resistenzen.pdf](https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/dateien/Downloads/A/Antibiotikaresistenzstrategie/10-Punkte_Antibiotika-Resistenzen.pdf).
- Cao, Y. et al., 2010. Design, recombinant expression, and antibacterial activity of the cecropins-melittin hybrid antimicrobial peptides. *Current microbiology*, 61(3), pp.169–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20111863> [Accessed January 22, 2015].
- Cereghino, J.L. & Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, 24, pp.45–66.
- Chen, Z. et al., 2011. Recombinant antimicrobial peptide hPAB- $\beta$  expressed in *Pichia pastoris*, a potential agent active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(2), pp.281–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20857289> [Accessed January 22, 2015].
- Cregg, J.M. & Madden, K.R., 1988. Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Developments in industrial microbiology*, 29, pp.33–41.

- Gross, S., Wilms, D. & Krause, J., 2013. Design of NK-2-derived peptides with improved activity against equine sarcoid cells. *Journal of Peptide Science*, (February), pp.619–628.
- Guo, C. et al., 2012. Secretion and activity of antimicrobial peptide cecropin D expressed in *Pichia pastoris*. *Experimental and therapeutic medicine*, 4(6), pp.1063–1068. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3494115&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 22, 2015].
- Hancock, R.E.W. & Lehrer, R., 1998. Cationic peptides: A new source of antibiotics. *Tibtech*, 16.
- Hancock, R.E.W. & Sahl, H.-G., 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), pp.1551–1557.
- Haney, E.F. & Hancock, R.E.W., 2013. Peptide design for antimicrobial and immunomodulatory applications. *Biopolymers*, 100(6), pp.572–583.
- Higgins, D.R. & Cregg, J.M., 1998. *Pichia* Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 103.
- Invitrogen, 2010. pGAPZ A , B , and C pGAPZ $\alpha$  A , B , and C *Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins. Available at: [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pgapz\\_man.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pgapz_man.pdf).
- Invitrogen, 2006. Put the proven strength of *Pichia* behind your protein expression - *Pichia pastoris* Expression System. , pp.2–5.
- Jin, F. et al., 2009. Expression and characterization of antimicrobial peptide CecropinAD in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 44(1), pp.11–16. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511308002729> [Accessed January 22, 2015].
- Jin, F. et al., 2006. Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1-8)-magainin2(1-12) in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein expression and purification*, 50(2), pp.147–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931049> [Accessed January 22, 2015].
- Jin, L. et al., 2013. Expression of Antimicrobial Peptide Dybowski-2CAMA in *Pichia pastoris* and Characterization of its Antibacterial Activity. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(8), pp.1005–1010.
- Jordan, V., 2015. *Klonierung von C7A-M11L-D21K in pPICZ-alpha mit anschließender Transformation von Pichia pastoris*. Universität Hamburg.
- Lehrer, R.I. et al., 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *Journal of immunological methods*, 137, pp.167–173.
- Li, L. et al., 2005. High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 39(2), pp.144–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15642464> [Accessed January 22, 2015].

- Liepinsh, E. et al., 1997. Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nat.Struct.Biol.*, 4, pp.793–795. Available at: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1NKL> [Accessed April 20, 2015].
- Lögering, K. & Luttmann, R., 2010. Optimization of Recombinant Enzyme Production with *Pichia pastoris* in an Integrated Industrial Scale-down Production Plant.
- Lucks, J., 2013. *Untersuchung des Produktionsverhaltens von Pichia pastoris in einem Integrierten Bioprozess*. Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.
- Maletzki, C. et al., 2014. Host defense peptides for treatment of colorectal carcinoma – a comparative in vitro and in vivo analysis. *Oncotarget*, 5(12).
- Matsuzaki, K., 1999. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462, pp.1–10.
- Miteva, M. et al., 1999. Molecular electroporation: A unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Letters*, 462, pp.155–158.
- Nguyen, L.T., Haney, E.F. & Vogel, H.J., 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*, 29(9), pp.464–472. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001>.
- Oren, Z. & Shai, Y., 1998. Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides. *Peptide Science*, 47, pp.451–463. Available at: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1998\)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F/abstract)
- Schröder-Borm, H. et al., 2003. Molecular basis for membrane selectivity of NK-2, a potent peptide antibiotic derived from NK-lysin. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1612, pp.164–171.
- Shai, Y. & Oren, Z., 2001. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 22, pp.1629–1641.
- Song, K. & Lee, W., 2014. Antibacterial Activity of Recombinant Pig Intestinal Parasite Cecropin P4 Peptide Secreted from *Pichia pastoris*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(2), pp.278–283.
- Subbalakshmi, C. & Sitaram, N., 1998. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiology Letters*, 160(January), pp.91–96.
- Van 't Hof, W. et al., 2001. Antimicrobial peptides: Properties and applicability. *Biological Chemistry*, 382(April), pp.597–619.
- Wang, A. et al., 2009. High level expression and purification of bioactive human alpha-defensin 5 mature peptide in *Pichia Pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology*, 84, pp.877–884.

- Wang, G. et al., 2015. Antimicrobial peptides in 2014. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 8(1), pp.123–150. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25806720> [Accessed March 31, 2015].
- Wang, L. et al., 2008. Production and characterization of a novel antimicrobial peptide HKABF by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 43(10), pp.1124–1131. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511308001906> [Accessed January 22, 2015].
- Wang, X.J. et al., 2014. Recombinant production of the antimicrobial peptide NZ17074 in *Pichia pastoris* using SUMO3 as a fusion partner. *Letters in applied microbiology*, 59(1), pp.71–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24617894> [Accessed January 22, 2015].
- Yount, N.Y. & Yeaman, M.R., 2013. Peptide antimicrobials: Cell wall as a bacterial target. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277, pp.127–138.
- Zaslloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(January), pp.389–395.
- Zhang, J. et al., 2006. Expression and characterization of antimicrobial peptide ABP-CM4 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*, 41(2), pp.251–256. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511305002680> [Accessed January 22, 2015].
- Zhang, J. et al., 2011. Expression of plectasin in *Pichia pastoris* and its characterization as a new antimicrobial peptide against *Staphylococcus* and *Streptococcus*. *Protein expression and purification*, 78(2), pp.189–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21558006> [Accessed January 22, 2015].
- Zhang, J. et al., 2007. Expression, purification, and characterization of recombinant Chinese shrimp crustin-like protein (CruFc) in *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters*, 29(5), pp.813–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17333464> [Accessed January 22, 2015].
- Zhao, P. & Cao, G., 2012. Production of bioactive sheep  $\beta$ -defensin-1 in *Pichia pastoris*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(1), pp.11–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21643707> [Accessed January 22, 2015].
- Zhou, Q., Li, M. & Xi, T., 2009. Cloning and expression of a clamworm antimicrobial peptide perinerin in *Pichia pastoris*. *Current microbiology*, 58(4), pp.384–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19198937> [Accessed January 22, 2015].
- Zwaal, R.F.A. & Schroit, A.J., 1997. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *The Journal of The American Society of Hematology*, 89(4), pp.1121–1132.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
AF	Antifoam (deutsch: Antischaummittel)
AMP	Antimikrobielles Peptid
AOX	Alkoholoxidase
BR	Bioreaktor
BTM	Biotrockenmasse
CFU	Colony Formin Unit (deutsch: koloniebildende Einheit)
ALK	NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K mit amidierem C-Terminus
ALK-OH	NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K mit Carboxylgruppe am C-Terminus
DCU	Digital Control Unit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	dots per inch
FDA	Food and Drug Administration
IEXC	Ionenaustauschchromatographie
kDa	Kilodalton
MFCS	Multi Fermenter Control System
NaPB	Dinatriumhydrogenphosphatpuffer
NK-Lysin	Antimikrobielles Peptid (Wortherkunft: NK = Natural Killer)
OD	Optische Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
RP-HPLC	Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEC	Size Exclusion Chromatography
SK	Schüttelkolben
SOP	Standard Operating Procedure
TFA	Trifluoressigsäure
TSB	Tryptic Soy Broth
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

## 10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht über die Aminosäuresequenz von NK-Lysin und dessen Derivate. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode dargestellt und Veränderungen bzw. Ausschnitte der Ursprungsstruktur sind fett markiert.	15
Tab. 2	Übersicht über einige der bisher erfolgten Expressionen von antimikrobiellen Peptiden <i>in P. pastoris</i>	19

# 11 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Schematische Darstellung der AOX-Gene in *Pichia pastoris*. Aufgeführt sind, von oben nach unten, der Wildtyp, bei dem beide AOX-Gene (blau) intakt sind, der Mut<sup>+</sup>-Typ, bei dem das Zielgen (rot) vor das AOX1-Gen eingesetzt wurde und der Mut<sup>S</sup>-Typ, bei dem das AOX1-Gen durch das Zielpeptid ersetzt wurde. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Lögering & Luttmann 2010. 6
- Abb. 2 Prozentuale Verteilung der bisher beschriebenen antimikrobiellen Peptide auf die verschiedenen Lebensformen. Datenquelle: APD & University of Nebraska 2015. 8
- Abb. 3 Darstellung der drei Hauptstrukturgruppen von AMPs anhand von Beispielpeptiden. (a) Magainin 2 repräsentiert die Gruppe der  $\alpha$ -helikalen Peptide, (b) Protegrin I repräsentiert die Gruppe der  $\beta$ -Faltblatt Peptide und (c) Indolicidin repräsentiert die Gruppe der ausgedehnten Peptide. Positiv geladene Seitenketten sind in Blau dargestellt. Quelle: Nguyen et al. 2011. 8
- Abb. 4 Schematische Darstellung der verschiedenen Wirkmechanismen von antimikrobiellen Peptiden. Quelle: in Anlehnung an: Hancock & Sahl 2006. 10
- Abb. 5 Schematische Darstellung des Barrel-Stack-Modells. Die hydrophilen Bereiche des Peptides sind in Rot und die hydrophoben Bereiche des Peptides in Blau dargestellt. Quelle: Brogden 2005. 11
- Abb. 6 Schematische Darstellung des Carpet-Modells. Die hydrophilen Bereiche des Peptides sind in Rot und die hydrophoben Bereiche des Peptides in Blau dargestellt. Quelle: Brogden 2005. 12
- Abb. 7 Schematische Darstellung des Toroidal-Modells. Die hydrophilen Bereiche des Peptides sind in Rot und die hydrophoben Bereiche des Peptides in Blau dargestellt. Quelle: Brogden 2005. 12
- Abb. 8 Schematische Darstellung der Phospholipidzusammensetzung von Säugerzellenmembranen (hier repräsentiert durch Erythrozyten) und Bakterienmembranen. Quelle: Matsuzaki 1999. 14
- Abb. 9 Darstellung von NK-Lysin (grau / rot) und NK-2 (rot) in der Sekundärstruktur. Quelle: 1NKL.pdb und Liepinsh et al. 1997. 16
- Abb. 10 Darstellung der Hydrophobizität von NK-2. Von Blau nach Rot steigt die Hydrophobizität an. Quelle: 1NKL.pdb und Liepinsh et al. 1997. 16

- Abb. 11 Simulierte Darstellung von NK-Lysin (gelb) in Gegenwart einer Biomembran (weiß). Dargestellt sind die elektrischen Felder mit einer Spannung von 0.2 V in Blau und einer Spannung von 0 V in Rot. Quelle: Miteva et al. 1999. 17
- Abb. 12 Schematische Darstellung der homologen Rekombination zwischen Expressions-vektor pPICZ $\alpha$  und dem Genom von *P. pastoris*. Das rot dargestellte Gene of Interest ist in diesem Fall NK-2 in der Variante C7A-M1L-D21K. Quelle: Abgeändert in Anlehnung an Invitrogen 2010. 21
- Abb. 13 Der Bioreaktor Biostat<sup>®</sup> ED5 mit Fermenter (1), DCU (2), Glycerinvorlage (3), Methanolvorlage (4), Säure-, Base- und Antischaumvorlage (5) und Abgasanalytik (6). 22
- Abb. 14 Auftragung der wichtigsten Prozessgrößen bei der Expression von AMPs in *Pichia pastoris*. Dargestellt sind die Wachstumsrate  $\mu$  in  $\text{h}^{-1}$ , die relative Pumpgeschwindigkeit der Glycerinpumpe  $F_{R1\text{rel}}$  in %, die Methanolkonzentration im Medium  $c_{S2M}$  in g/l, die Zellmassekonzentration  $c_{XL}$  in g/l, der bei Luftbegasung auf 100 % kalibrierte Sauerstoffpartialdruck im Medium  $pO_2$  in % und die Temperatur des Mediums  $\vartheta_L$  in °C. 24
- Abb. 15 Übersicht der gewählten Parameter für die Fermentation JDJB2015. Dargestellt ist der  $pO_2$ -Wert, die Temperatur  $\vartheta_L$ , die aus den BTM-Werten ermittelte Zellmasse  $m_{XL\_BTM}$ , die Methanolkonzentration  $c_{S2M}$ , und die volumetrische Glycerineintragsrate  $Q_{S1in}$ . Der Zugabezeitpunkt von Antischaummittel (AF) ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. 33
- Abb. 16 Darstellung der Abgasanalysewerte der Fermentation JDJB2015. Dargestellt sind der Stoffmengenanteil von Sauerstoff in der Abluft  $xO_2$ , Stoffmengenanteil von Kohlendioxid in der Abluft  $xCO_2$ ,  $pO_2$ -Wert und Rührerdrehzahl NSt. 35
- Abb. 17 Auftragung der aus den Abgasanalytikwerten abgeleiteten respiratorischen Größen. 37
- Abb. 18 Auftragung der Größen der Substratbilanzierung. Dargestellt sind die spezifische Glycerinaufnahmerate  $q_{S1/X}$ , die spezifische Stickstoffaufnahmerate  $q_{N/X}$ , die spezifische Methanolaufnahmerate  $q_{S2/X}$ , die Methanolkonzentration im Medium  $c_{S2M}$  und die Zellkonzentration  $c_{XL}$ . 38

- Abb. 19 Abbildung des 15 %igen Trenngels der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung zur Fermentation JDJB2015. In Spalte M ist der Marker, in Spalte 1 und 2 die synthetische Form des Peptides ALK-OH in unterschiedlichen Konzentrationen, in Spalte 3 ist der Kulturüberstand vor Methanolinduktion und in Spalte 4 bis 9 der Kulturüberstand zu verschiedenen Zeitpunkten nach Methanolinduktion aufgetragen. Die Lage des synthetischen Referenzpeptides ALK-OH und die der in Frage kommende Bande im Überstand ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. 40
- Abb. 20 Auswertung des Agarosediffusionstest zu Proben aus der Fermentation JDJB2015. In Grau ist das Referenzpeptid ALK-OH und in Rot die Positivkontrolle Melittin dargestellt. In Dunkelblau sind die Negativkontrollen und in Dunkelgrün die Fermentationsproben mit und ohne Etherextraktion dargestellt. In Hellgrün ist die Etherphase mit dazugehöriger Negativkontrolle dargestellt. Braun dargestellt sind die Fermentationsproben kurz vor und kurz nach Antischaummittelzugabe, die mit ALK-OH versetzt wurden. 42
- Abb. 21 Agarosediffusionstest mit Standardaddition von 50 µg/ml ALK-OH zu den einzelnen Medienbestandteilen des FM-22-Mediums. In Grau bzw. Rot dargestellt sind synthetisches ALK-OH und Melittin. In Dunkelblau sind PTM4 und Probe 44 dargestellt. Diese repräsentieren die Negativkontrolle. PTM4 und Probe 44 mit ALK-OH in einer Konzentration von 50 µg/ml sind in Hellblau dargestellt. Die Bestandteile des FM-22-Mediums wurden ebenfalls mit ALK-OH versetzt und sind in Braun dargestellt. Die mit ALK-OH versetzten Bestandteile des PTM4 sind in Dunkelgrün dargestellt. 44
- Abb. 22 Agarosediffusionstest zum Zellaufschluss von Proben aus der Fermentation JDJB1515. In Grau bzw. Rot dargestellt sind synthetisches ALK-OH und Melittin. In Braun dargestellt ist ein Zellaufschluss mit unterschiedlichen Reagenzien. In Dunkelgrün dargestellt ist dieser Zellaufschluss, zu dem ALK-OH hinzugefügt wurde. 45

# 12 Anhang

## 12.1 Medien und Ansätze

### 12.1.1 Medien und Vorlagen der Fermentation

#### Korrekturmittel Säure

433 ml VE-Wasser

67 ml 85 %ige  $\text{H}_3\text{PO}_4$

#### Korrekturmittel Base

500 ml VE-Wasser

500 ml 25%igen  $\text{NH}_3$

#### Korrekturmittel Antischaum

100 ml Struktol

#### Schüttelkolbenmedium (abgeändertes FM22)

24.12 g Glycerin

20.56 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

4.0 g  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$

6.88 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$

1.12 g  $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

13.12 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

4.71 g Trinatriumcitrat  $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

In 700 ml VE-Wasser lösen

Mit  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NH}_3$  auf pH = 4.72 einstellen

Mit VE-Wasser auf 800 ml auffüllen

Autoklavieren

6.4 ml Biotin-Stammlösung (sterilfiltrieren)

3.2 ml PTM4-Stammlösung (sterilfiltrieren)

#### Fermentationsmedium (abgeändertes FM22)

111.6 g Glycerin

95.1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

18.5 g  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$

31.8 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$

5.2 g  $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

60.7 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   
21.8 g Trinatriumcitrat  $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$   
In 2.6 l VE-Wasser lösen  
Mit  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NH}_3$  auf pH = 5.0 einstellen  
Mit VE-Wasser auf 2.7 l auffüllen  
Im Reaktor sterilisieren  
29.6 ml Biotin-Stammlösung (sterilfiltrieren)  
14.8 ml PTM4-Stammlösung (sterilfiltrieren)  
Mit Inokulum und VE-Wasser auf 3.7 l auffüllen

### **Methanolvorlage**

1.5 l Methanol

### **Glycerinvorlage**

125.6 g Glycerin  
401 ml VE-Wasser

### **Biotin-Stammlösung**

0.2 g  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$  (Biotin)  
Mit VE-Wasser auf 1000 ml auffüllen

### **PTM4-Stammlösung**

2.00 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$   
0.08 g NaI  
3.00 g  $\text{MnSO}_4$   
0.20 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$   
0.02 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
0.50 g  $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$   
0.50 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$   
7.00 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   
22.00 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   
1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$   
Mit VE-Wasser auf 1000 ml auffüllen

## 12.1.2 Ansätze für den Agarosediffusionstest

### TSB-Gemisch

8.5 g Tryptone  
1.5 g Peptone  
1.25 g Glucose  
2.5 g NaCl  
1.25 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (NaPB)

0.575 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
Mit VE-Wasser auf 400 ml auffüllen  
Mit HCl/NaOH auf pH = 7.4 titrieren  
Mit VE-Wasser auf 500 ml auffüllen

### TSB-Medium für SK

3.6 g TSB-Gemisch  
Mit VE-Wasser auf 100 ml auffüllen  
Mit HCl/NaOH auf pH = 7.4 titrieren  
Mit VE-Wasser auf 120 ml auffüllen

### Agarose für untere Schicht

0.03 g TSB-Gemisch  
1.0 g Agarose (niedriger EEO-Wert von 0.09 bis 0.13!)  
20 µl Tween 20  
Mit VE-Wasser auf 100 ml auffüllen

### Agarose für obere Schicht

6.0 g TSB-Gemisch  
1.0 g Agarose (niedriger EEO-Wert von 0.09 bis 0.13!)  
Mit VE-Wasser auf 100 ml auffüllen

## 12.2 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Chargen-/Lot.- Nummer	Hersteller
<b>pH-Kalibrierlösungen</b>			
Pufferlösung pH = 4.00 +/- 0.02 (bei 20 °C)		1509405	Carl Roth
Pufferlösung pH = 7.00 +/- 0.02 (bei 20 °C)		1509868	Carl Roth
Pufferlösung pH = 9.18 +/- 0.01 (bei 20 °C)		HI7009	Hanna Instruments
<b>FM22 Medium (<i>P. pastoris</i>)</b>			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3904.1		Carl Roth
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3746.4		Carl Roth
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	P022.3		Carl Roth
CaSO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	P741.2		Carl Roth
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	T888.3		Carl Roth
Trinatriumcitrat Dihydrat	3580.2		Carl Roth
<b>Abgewandeltes TSB-Gemisch</b>			
Tryptone	8952.2	263201131	Carl Roth
Peptone	9886.1	512194813	Carl Roth
Glucose			
NaCl	3957.2	400162007	Carl Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	P030.1	43788120	Carl Roth

**ADT**

Methanol	7342.1	911721	Carl Roth
Agar Agar, Kobe I	5210.3	152182069	Carl Roth
Agarose	840004	00280710C185396L	Biozym
Tween 20	8,170,721,000	K43133972207	Merck

**Proben für ADT**

Trifluoressigsäure	P088.1	420163308	Carl Roth
Diethlyether	1.00929.1000	K28567629 105	Merck
Melittin			
CMD-OH			FZ Borstel

**Vorlagen für die  
Fermentation**

NH <sub>3</sub>	5460.3	205228370	Carl Roth
Phosphorsäure	6366.2	115224571	Carl Roth
Methanol	7342.1	911721	Carl Roth
Glycerin	3783.5	135226728	Carl Roth

## 12.3 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Typ	Gerätenr.
Waage	Sartorius	BA110S	nicht lesbar
Waage	Precisa	300M	50895
		Sonorex Super	
Wasserbad	Bandelin	RK514BH	263083032
Schüttelinkubator	GFL	3032	
		Centrifuge	
Zentrifuge	Eppendorf	5417R	540708745
Zentrifuge	Sigma	3K10E	46839
Photometer	Thermo Scientific	Genesys 20	3SGL275005
pH Meter	Sartorius	PB20	11443020
Rührer	IKA	Combimag REO	1121
Pipette	Eppendorf	100-1000 µl	
Pipette	Eppendorf	10-100 µl	
Pipette	Eppendorf	0.5-10 µl	
Brutschrank	Binder		
Trockenschrank	Heraeus Instruments	Vacutherm	
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments	Hera Safe	
Autoklave	Systemec	V-150	2055
<b>Bioreaktor</b>			
pO <sub>2</sub> -Sonde	Mettler Toledo		52200168
AF-Disc / AS-Scheibe	B. Braun	BB-8844465	
Biostat	Sartorius	ES 5 K	119
Trübungssonde	optek-Danulat GmbH	AS16	29211
Leitfähigkeitssonde	optek-Danulat GmbH	CS60-35-60	4399

Pumpe	Watson Marlow	101 U/R	H051794
Pumpe	Watson Marlow	101 U	128673
Pumpe	Watson Marlow	sciQ 323	
Abgassensor O <sub>2</sub>	BlueSens		10ATAE5D3100009C
Abgassensor CO <sub>2</sub>	BlueSens		10AD3634310000FA
Methanolsonden- messverstärker	Biotechnologie Kempe GmbH	FMC-MINI	
Trübungsmess- verstärker	optek-Danulat GmbH	Control 4000	
Leitfähigkeitsmess- verstärker	optek-Danulat GmbH	Control 200	

## 12.4 Standardarbeitsanweisung zum Agarosediffusionstest

Titel:		<b>Agarosediffusionstest zur Wirksamkeitsprüfung von toxischen Substanzen; speziell antimikrobiellen Peptiden</b>
Gültig ab:		
Geltungsbereich:	Unternehmen:	<b>Hochschule für Angewandte Wissenschaften</b>
	Abteilung:	<b>Fakultät Life Sciences</b>
	Standort:	<b>Hamburg/ Campus Bergedorf</b>
	Gebäude:	<b>Laborgebäude Biotechnologie</b>
	Abteilung:	<b>Bioprocess- und Analysetechnik</b>

	Name:	Abteilung:	Datum:	Unterschrift:
Verfasst:	Jakob Brandt Jan Demmer	BPA	31.03.2015	
Geprüft:	Dipl.-Ing. Ulrich Scheffler	BPA		
Freigegeben:	Prof. Dr. Gesine Cornelissen	BPA		

Grund der Änderung:	
Änderungen:	

## 1. Einleitung und Zielsetzung

Diese Standardarbeitsanweisung beschreibt die Durchführung eines Agarosediffusionstestes in Anlehnung an Lehrer et al. (Lehrer et al. 1991). Hierbei wird die Wirksamkeit von Antimikrobiellen Peptiden gegen Testkeime geprüft.

Zunächst werden Testkeime wie z. B. *E. coli* im Schüttelkolben in die exponentielle Phase gebracht. Diese werden dann in eine Agarose, die sich nach dem Autoklavieren noch im flüssigen Zustand befindet, in Platten gegossen. Um genauer feststellen zu können, wie viele koloniebildende Einheiten eingegossen wurden, wird ein Verdünnungsausstrich durchgeführt.

Nachdem die Agarose mit den Bakterien ausgehärtet ist, werden Löcher in die gelartige Schicht gestanzt und mit Proben des antimikrobiellen Peptides gefüllt. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird die erste Schicht Agar mit einer zweiten Schicht Agar, die eine höhere Nährstoffkonzentration enthält, übergossen. Anschließend werden die Platten über Nacht inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet. Hierbei zeigen sich Höfe im ansonsten durchgehenden Bakterienrasen, die durch die diffundierten toxischen Substanzen hervorgerufen wurden.

## 2. Abkürzungen und Definitionen

ADT	Agarosediffusionstest
AMP	Antimikrobielles Peptid
$\Delta$ OD	Differenz der optischen Dichte und dem Nullwert derselben Probe
NaPB	Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer
TFA	Trifluoressigsäure
EEO	Elektroendosmose
SK	Schüttelkolben
CFU	Colony Forming Unit
TSB	Tryptic Soy Broth

### **3. Material und Geräte**

#### **3.1 Geräte**

- Photometer mit Einstellmöglichkeit für 620 nm
- Kolbenhubpipette 100 – 1000 µl
- Kolbenhubpipette 10 – 200 µl
- Kolbenhubpipette 0.5 – 10 µl
- Analysenwaage
- Vortexer
- Autoklav
- Schüttelinkubator
- Brutschrank
- Wasserbad
- Thermometer

#### **3.2 Chemikalien**

- Tryptone
- Peptone
- Glucose
- NaCl
- HCl
- NaOH
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- Agar-Agar, Kobe I
- Methanol
- Agarose (EEO-Wert: 0.09 – 0.13)!!!
- Tween 20
- Melittin
- TFA

#### **3.3 Materialien**

- Petrischalen
- 50 ml Falcons
- 100 ml Schott-Flaschen
- 250 ml Schott-Flaschen
- 500 ml Schott-Flaschen
- 250 ml Schikanenkolben
- Drigalskispatel

- Standzylinder (10 ml, 25 ml und 50 ml)
- Bechergläser
- 1.5 ml Eppendorfreaktionsgefäße

### **3.4 Stämme**

- z. B. *E. coli* K12 M15

### **4. Zusätzliche Standardarbeitsanweisungen**

- Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (SOP-Nr.: 320101-01 (Laborgruppe Sanders))

## 5. Durchführung

### 5.1 Medienansätze

Der gesamte Agarosediffusionstest inklusive Vorbereitung und Auswertung nimmt drei Tage in Anspruch. Am ersten Tag sollten alle Medien, die in Abschnitt 5.1 aufgeführt sind, eingewogen bzw. angesetzt werden.

#### 5.1.1 TSB-Gemisch

Zunächst wird ein trockenes Gemisch aus Tryptone, Peptone, Glucose, NaCl und Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> hergestellt, das in seiner Zusammensetzung ähnlich des kommerziell erhältlichen TSB-Mediums ist.

Substanz	Einwaage [g]
Tryptone	8.50
Peptone	1.50
Glucose	1.25
NaCl	2.50
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.25

Die 15 g Trockengewicht des TSB-Gemisches reichen bei Normalkonzentration (3 % w/v) für 500 ml flüssiges Medium. Da aber für den Versuch verschiedene Konzentrationen an TSB-Gemisch im Medium benötigt werden, wird dieses Trockengemisch angesetzt aus dem später die Medien angesetzt werden können.

#### 5.1.2 Dinatriumhydrogenphosphatpuffer (NaPB)

Es werden 500 ml eines 10 mM NaPB mit VE-Wasser angesetzt und mit NaOH / HCl auf pH = 7.4 eingestellt. Dieser wird am ersten Tag angesetzt und autoklaviert und muss dann in den Kühlschrank gestellt werden.

Substanz	Einwaage [g]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.58

### 5.1.3 TSB-Medium für Schüttelkolben

Für die Schüttelkolben werden 120 ml TSB-Medium (3 % w/v) benötigt. Hierfür werden 3.6 g des TSB-Gemisches in VE-Wasser gelöst. Das TSB-Medium für die Schüttelkolben muss am ersten Tag angesetzt, mit HCl / NaOH auf pH = 7.4 eingestellt und autoklaviert werden.

Substanz	Einwaage [g]
TSB-Gemisch	3.60

### 5.1.4 Agar für Verdünnungsausstrich

Für die drei Platten mit dem Verdünnungsausstrich werden 75 ml Medium angesetzt. Die Komponenten werden am ersten Tag eingewogen und in eine Schottflasche gegeben. Das VE-Wasser wird erst am zweiten Tag hinzugegeben und dann autoklaviert. ACHTUNG! Das Medium direkt aus dem Autoklaven in Platten gießen, da der Agar sonst fest wird.

Substanz	Einwaage [g]
TSB-Gemisch	2.25
Agar-Agar, Kobe I	1.13

### 5.1.5 Agarose für untere Schicht

Für die untere Schicht Agarose-Gel werden 100 ml Medium benötigt. Die Agarose sollte einen Elektroendosmosewert (EEO) von 0.09 – 0.13 haben.

Substanz	Einwaage
TSB-Gemisch	0.030 g
Agarose	1.00 g
Tween 20	20.0 µl

### 5.1.6 Agarose für obere Schicht

Für die obere Schicht Agarose-Gel werden 100 ml Medium benötigt. Es ist ebenfalls die Agarose mit einem EEO-Wert von 009 – 0.13 zu verwenden.

<b>Substanz</b>	<b>Einwaage [g]</b>
TSB-Gemisch	6.00
Agarose	1.00

## 5.2 Zeitliche Übersicht

Zur besseren Übersicht der Abläufe, die in Abschnitt 5.3 beschrieben werden, sind hier schematisch die Arbeitsgänge an den verschiedenen Tagen dargestellt.

Uhrzeit	Tag 1	Tag 2	Tag 3
<b>08:00</b>	- Medien einwiegen und ansetzen	- Agar und Materialien autoklavieren - SK überimpfen	
<b>10:00</b>	- 250 ml Schüttelkolben autoklavieren - TSB-Med. für SK autoklavieren - NaPB autoklavieren - VE-Wasser	- Agar für Verdünnungsausstrich gießen - Agarose temperieren	
<b>12:00</b>		- Bakterien ernten	
<b>13:00</b>		- Bakterien in flüssige Agarose geben und in Platten gießen	
<b>14:00</b>	- SK mit 50 ml Medium befüllen und in den Schüttelschrank stellen	- Löcher in die Agarose stanzen und mit Probe befüllen - Platten anschließend in den Brutschrank	- ADT-Platten einscannen und auswerten
<b>15:00</b>			- Auswertung der Verdünnungsausstriche
<b>17:00</b>	- SK mit Testbakterien animpfen	- Platten mit zweiter Schicht Agarose übergießen - Platten in den Brutschrank	

## **5.3 Beschreibung der genauen Durchführung**

### **5.3.1 Tag 1**

Zu Beginn des ersten Tages werden alle Medien angesetzt. Das TSB-Gemisch (5.1.1) wird eingewogen und in einem 50 ml Falcon durch mehrmaliges Schütteln gut durchmischt. Aus diesem Falcon können dann später die Portionen für die entsprechenden Medien entnommen werden.

Der NaPB (5.1.2) wird mit VE-Wasser angesetzt und mit NaOH / HCl auf einen pH-Wert von 7.4 eingestellt. Anschließend wird der Puffer autoklaviert und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Das TSB-Medium für die Schüttelkolben (5.1.3) wird wie beschrieben angesetzt und autoklaviert.

Wie bereits in Abschnitt 5.1.4 beschrieben wurde, werden die Komponenten für den Verdünnungsausstrich lediglich eingewogen und im trockenen Zustand in eine 100 ml Schottflasche gegeben. Hierdurch wird das Hochwachsen durch Mikroorganismen vor dem Autoklavieren verhindert. An Tag 2 wird die Schottflasche dann mit 75 ml VE-Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Teilweise lösen sich einige Bestandteile auch erst beim Autoklavieren. Auch die Bestandteile der Agarose-Gele werden zunächst nur „trocken“ eingewogen und in die Schottflaschen gegeben. Am 2. Tag wird dann 100 ml des NaPB hinzugefügt. Bei der Agarose für die untere Schicht (5.1.5) wird an Tag 2 das flüssige Tween 20 hinzugegeben. 100 ml Agarose „untere Schicht“ und 100 ml Agarose „obere Schicht“ reichen zusammen für ca. 6 Petrischalen.

Nachdem alles vorbereitet wurde, müssen folgende Dinge am Vormittag des ersten Tages autoklaviert werden:

2 x 250 ml Schikanenkolben

500 ml des 10 mM NaPB

120 ml TSB-Medium für die die Schüttelkolben

50 ml und 250 ml Standzylinder

250 ml VE-Wasser

Ca. 20 x 15 ml Eppendorfreaktionsgefäße (im Autoklavierbeutel)

Nach dem Autoklavieren muss das Medium bzw. der Puffer auf Raumtemperatur abkühlen. Danach wird der Puffer bei 4 °C in den Kühlschrank gestellt werden.

Jeweils 50 ml des autoklavierten TSB-Mediums werden dann unter der Sterilwerkbank in die sterilen Schüttelkolben gegeben. Anschließend werden die beiden Schüttelkolben bei 30°C und 170 rpm in den Schüttelinkubator gestellt, um die zum Animpfen passende Temperatur anzunehmen.

Am Abend des ersten Tages wird dann einer der beiden Schüttelkolben mit 50 µl der Kryokultur angeimpft.

Vorbereitungen für das Autoklavieren am Morgen des zweiten Tages:

Ca. 8 x 1000 µl Pipettenspitzen, bei denen die vorderen 13 mm abgeschnitten wurden, um so einen Innendurchmesser von 3.0 mm zu erhalten. (im Autoklavierbeutel)

4 x Drigalskispatel (mit einem Tropfen Wasser einzeln in Alufolie eingewickelt und dann zusammen in einen Autoklavierbeutel)

Außerdem werden am Abend des ersten Tages die Verdünnungen für Positiv- und Negativkontrollen mit sterilem VE in sterilen Eppis unter der Sterilwerkbank angefertigt.

### 5.3.2 Tag 2

Möglichst früh am Morgen des zweiten Tages sollten die Agar komplettiert werden. Damit der NaPB steril bleibt, müssen die 200 ml unter der Sterilwerkbank entnommen werden.

Agarose (untere Schicht) mit 100 ml des NaPB auffüllen und mit 20 µl Tween 20 versetzen.

Agarose (obere Schicht) mit 100 ml des NaPB auffüllen.

Agar für Verdünnungsausstriche mit 75 ml VE-Wasser auffüllen.

Anschließend müssen folgende Gegenstände autoklaviert werden:

Flasche mit Agarose (untere Schicht)

Flasche mit Agarose (obere Schicht)

Flasche mit Agar für Verdünnungsausstrich

Drigalskispatel (mind. drei Stück)

Eppendorfreaktionsgefäße

Abgeschnittene Pipettenspitzen

Bei Bedarf: 1000 µl, 200 µl und 10 µl Pipettenspitzen

10 ml und 25 ml Standzylinder

100 ml Schottflasche mit 100 ml VE-Wasser als Temperaturreferenz im Wasserbad

Direkt nachdem der Autoklav angeschaltet wurde, wird der Schüttelkolben #2 mit 200 µl Zellsuspension des Schüttelkolbens #1 angeimpft. Der Schüttelkolben #2 wird dann bei 30°C und 170 rpm für weitere 2.5 h inkubiert. So wird sichergestellt, dass sich die Bakterien in der exponentiellen Phase befinden.

Sobald der Autoklavivorgang abgeschlossen ist, werden die Agar-Medien im noch heißen Zustand in ein Wasserbad, das neben die Sterilwerkbank gestellt wird und auf ca. 48°C vorgeheizt ist, gestellt. Vorher werden die Medien durch mehrmaliges Schwenken gut durch-

mischt. Die Schottflasche mit den 100 ml VE-Wasser wird ebenfalls ins Wasserbad gestellt. Ab und zu kann mit einem Einstichthermometer die Temperatur des VE-Wassers kontrolliert werden und so Rückschlüsse auf die Temperatur der Agar gezogen werden.

Der Agar für die Verdünnungsausstriche kann direkt aus dem Autoklaven unter der Sterilwerkbank in Petrischalen gegossen werden. Zum Abkühlen bleiben die Platten mit halb geöffnetem Deckel unter der Sterilwerkbank stehen.

Nachdem die Testbakterien die 2.5 h im Schüttelkolben #2 gewachsen sind, werden diese geerntet. Hierfür werden die 50 ml aus dem Schüttelkolben unter der Sterilwerkbank gleichmäßig auf zwei sterile (roter Deckel) 50 ml Falcons verteilt. Anschließend werden die Falcons bei 4 °C und 900 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Unter der Sterilwerkbank wird der Überstand dekantiert und es werden je Falcon 25 ml des kalten NaPB (gerade aus dem Kühlschrank genommen) hinzugegeben. Mit Hilfe des Vortexers werden die Zellen anschließend resuspendiert und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach der zweiten Zentrifugation wird der Überstand erneut unter der Sterilwerkbank dekantiert und mit 5 ml des kaltem NaPB resuspendiert. Unter der Sterilwerkbank wird 1 ml Probe entnommen und bei 620 nm im Photometer gemessen.

Mittels Gleichung (1) soll abgeschätzt werden, welches Volumen an Testbakteriensuspension in die flüssige unter Schicht Agarose gegeben werden soll, damit ein gleichmäßiger Bakterienrasen hochwachsen kann.

$$\Delta OD_{620} 0.20 = 5 \cdot 10^7 \text{ CFU/ml} \quad (1)$$

Da das reine Medium eine  $OD_{620} = 0,07$  aufweist und 0 CFU/ml beinhaltet, kann eine lineare Interpolation vorgenommen werden und zur gemessene OD die CFU/ml abgeschätzt werden (Gleichung (2)).

$$\text{CFU/ml} = 4 \cdot 10^8 \cdot \Delta OD_{620} - 3 \cdot 10^7 \quad (2)$$

Es sollte ein Volumen der Bakteriensuspension in den flüssigen Agar gegeben werden, das ca. 1 bis  $4 \times 10^6$  CFU enthält.

Wenn das Volumen berechnet ist, das in die Agarose gegeben werden muss, wird die Flasche mit der unteren Schicht Agarose aus dem Wasserbad genommen und leicht geschwenkt. Die Flüssigkeit in der Flasche darf nicht zu stark abkühlen (unter 38 °C), da die Agarose sonst aushärtet. Allerdings darf die Agarose auch nicht zu heiß sein (über 45 °C), da sonst die Testkeime nicht überleben. Unter der Sterilwerkbank wird nun das Aliquot in die Agarose gegeben und schnell durchmischt. Anschließend werden sechs Petrischalen mit der flüssigen Agarose ca.  $(1 \pm 0.5)$  mm hoch befüllt. Die Dicke der unteren Schicht Agarose ist maßgeblich für die Sensitivität des Tests verantwortlich. Je dünner die Schicht, desto

sensitiver ist der Test. Auch hier lässt man die Platten bei halb geöffnetem Deckel unter der Sterilwerkbank abkühlen.

In der Zwischenzeit können aus der überschüssigen Bakteriensuspension, die nicht in den Agar gegossen wurde, Verdünnungen angefertigt werden. Es bieten sich hierbei die Stufen  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  an, die folgendermaßen erstellt werden können.

<b>Verdünnung</b>	<b>1. Eppi</b>	<b>2. Eppi</b>	<b>3. Eppi</b>	<b>4. Eppi</b>	<b>5. Eppi</b>
$10^{-5}$	1:100	1:100	1:10		
$10^{-6}$				1:100 aus Eppi #2	
$10^{-7}$					1:100 aus Eppi #3

Hierbei ist es sinnvoll, jeweils 10 µl bzw. 100 µl Probe auf 990 µl bzw. 900 µl Wasser zu verdünnen. Das VE-Wasser und die fünf Eppis, in denen verdünnt wird, müssen autoklaviert sein. Die Verdünnungen werden unter der Sterilwerkbank vorgenommen. Für die  $10^{-6}$  Verdünnung werden 10 µl aus der  $10^{-4}$  Verdünnung entnommen. Für die  $10^{-7}$  Verdünnung wiederum werden 10 µl aus der  $10^{-5}$  Verdünnung entnommen. Auf die drei Platten für den Verdünnungsausstrich werden nun 900 µl der jeweiligen Verdünnungsstufe gegeben und mit jeweils wieder einem frischen Drigalskispatel verteilt. Nach kurzer Trocknungszeit unter der Sterilwerkbank können die drei Platten für den Verdünnungsausstrich für 24 h bei 30°C kopfüber in den Brutschrank.

In der Zeit, in der die Verdünnungsausstiche angefertigt wurden, ist die untere Schicht Agarose festgeworden. In die gelartige Schicht werden nun mit Hilfe der abgeschnittenen Pipettenspitzen Löcher gestanzt. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Agarose nicht einreißt. Sollten sich die ausgestanzten Zylinder nicht aus der Agarose lösen, kann mit einer kleinen Pipettenspitze der Stanzling herausgedrückt werden.

In diese ausgestanzten Löcher wird nun 5 µl Probe hineinpipettiert. Folgende Kontrollen sollten zusätzlich zur eigentlichen Probe aufgetragen werden:

- Methanol (0.5 % v/v)
- Melittin (10 µg/ml)
- Melittin (50 µg/ml)
- H<sub>2</sub>O
- Trifluoressigsäure (0.01 % v/v)

Alle nötigen Verdünnungen für die Positiv- und Negativkontrollen werden mit sterilem VE-Wasser unter der Sterilwerkbank vorgenommen.

Nachdem alle Proben in die Vertiefungen hineinpipettiert wurden, werden die Petrischalen mit dem Deckel nach oben im Brutschrank bei 30 °C für 2.5 h bis 3 h inkubiert.

Nach den 3 h Inkubationszeit der ersten Schicht Agarose, werden die Platten mit der oberen Schicht Agarose ca.  $(1 \pm 0.5)$  mm dick überschichtet. Bis zu diesem Zeitpunkt stand die obere Agarose bei 48 °C im Wasserbad. Auch hier bleiben die Platten mit halb geöffnetem Deckel unter der Sterilwerkbank stehen, bis die zweite Schicht Agarose ausgehärtet ist. Danach kommen die Platten für 18 h bei 30°C mit dem Deckel nach unten in den Brutschrank.

### **5.3.3 Tag 3**

Nach einer Inkubation von 18 h im Brutschrank können die Platten herausgenommen und eingescannt werden. Der Bakterienrasen sollte vollständig hochgewachsen sein und bei den Positivkontrollen sollten helle Höfe zu erkennen sein, bei denen das Wachstum gehemmt wurde. Zur Veranschaulichung soll die Abbildung 1 dienen.

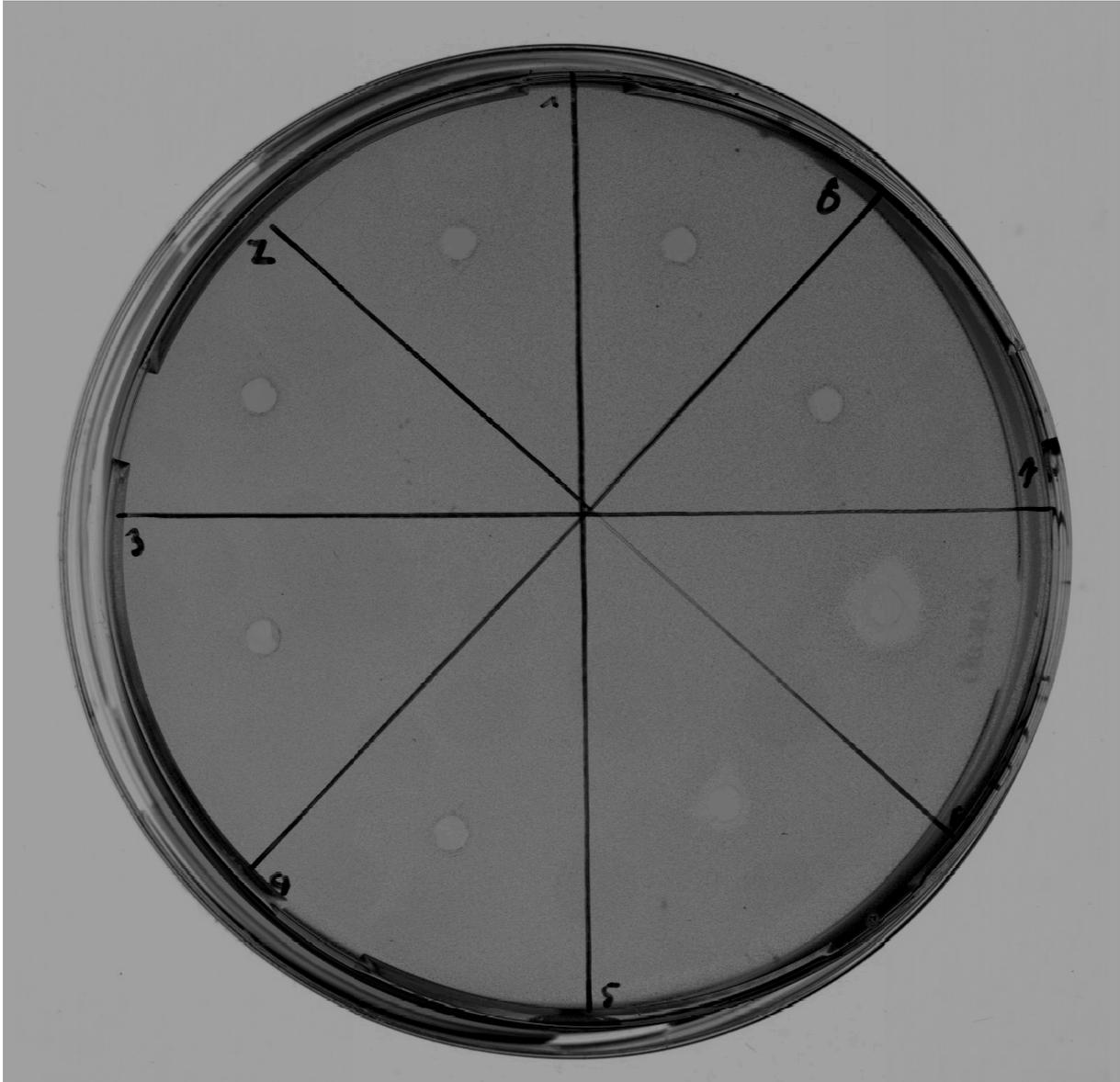


Abbildung 1: Agarosediffusionstest mit acht Proben auf einer Petrischale. In der Sektion 5 und 6 ist die Positivkontrolle in verschiedenen Konzentrationen gut zu erkennen.

Nachdem die Agaroseplatten ausgewertet wurden, werden die Verdünnungsausstriche ausgezählt. Die Anzahl der Kolonien wird auf 1 ml hochgerechnet und ein Durchschnittswert der drei Platten gebildet. Hieraus lässt sich abschätzen, ob die Annahme aus Gleichung (2) korrekt war, oder angepasst werden sollte.

## 6. Auswertung mittels ImageJ

Nach erfolgter Inkubation über Nacht werden die Platten zusammen mit einem Lineal im Modus „Film“ und mit einer Auflösung von 600 bis 1200 dpi eingescannt (siehe Abbildung 2).

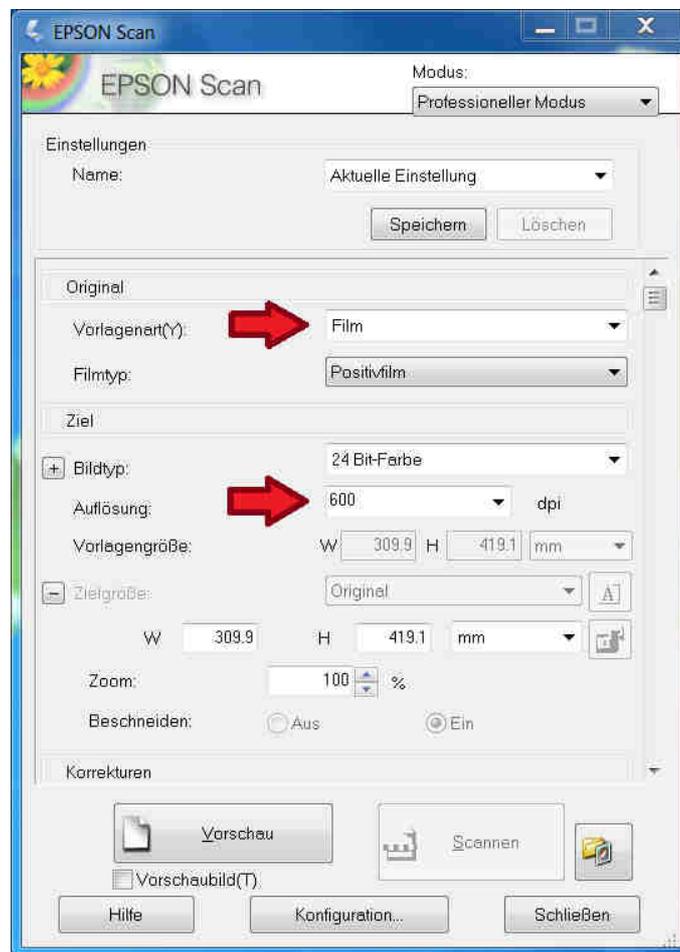


Abbildung 2: Screenshot der Benutzeroberfläche des Scanprogrammes EPSON Scan mit den für den ADT zu wählenden Einstellungen.

Durch die Einstellung „Film“ arbeitet der Scanner im Durchlichtmodus und die Höfe zeichnen sich gut vom übrigen Bakterienrasen ab.

Die Auswertung, also die Vermessung der Höfe, erfolgt mit dem kostenfrei herunterladbaren Programm ImageJ. Unter dem Reiter „File“ wird mit dem Befehl „Open“ die vom Scanner erzeugte Bilddatei eingelesen. Um den Maßstab des Bildes zu kalibrieren, werden zunächst falsche Maßstäbe gelöscht. Dazu wird unter dem Reiter „Analyze“ die Option „Set Scale“ ausgewählt. Durch den Button „Click to Remove Scale“ werden alte Maßstäbe gelöscht (siehe Abbildung 3).

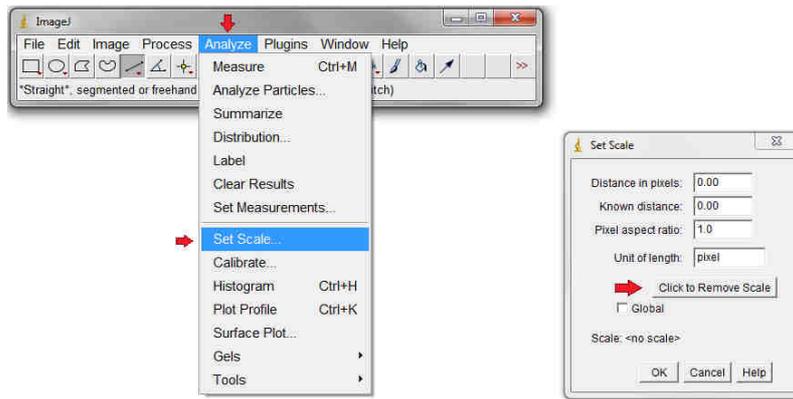


Abbildung 3: Screenshot der Benutzeroberfläche von ImageJ mit Anweisungen zur Entfernung eines Maßstabes.

Um den neuen Maßstab einzustellen, wird eine bekannte Strecke auf dem eingescannten Lineal mit der Funktion „Straight“ nachgezeichnet (siehe Abbildung 4).

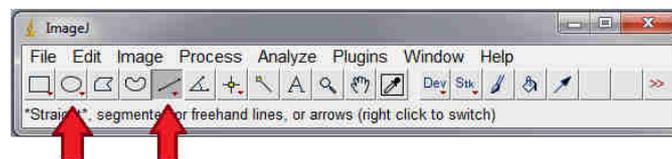


Abbildung 4: Screenshot der Benutzeroberfläche von ImageJ mit ausgewählter „Straight“-Funktion und später zu wählender „Oval“-Funktion.

Anschließend wird die Länge der bekannten Strecke unter „Analyze“ – „Set Scale“ – „Known distance“ eingegeben. Die Einheit, z. B. mm, wird im selben Fenster unter „Unit of length“ eingegeben. Durch Bestätigung mit „OK“ ist das Bild kalibriert (siehe Abbildung 5).

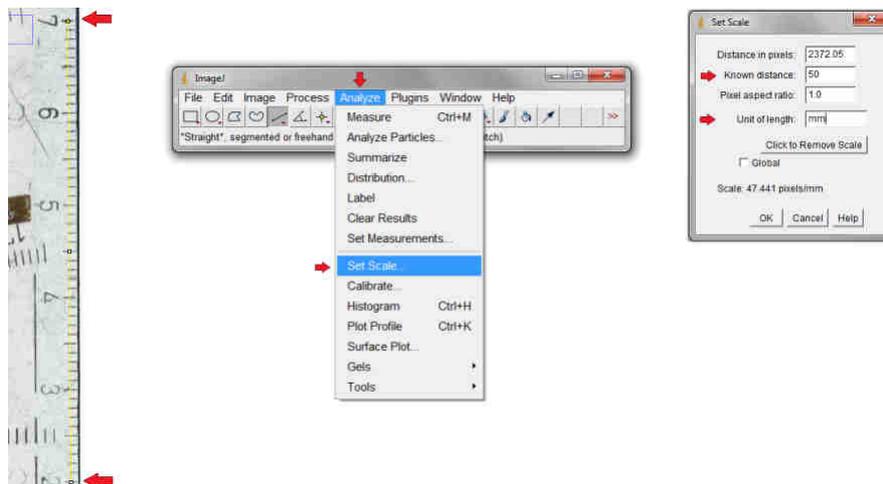


Abbildung 5: Screenshot der Benutzeroberfläche von ImageJ mit nachgezeichneter Strecke auf dem Lineal und Einstellungen zur Kalibrierung des Maßstabes.

Die eigentliche Vermessung der Höfe erfolgt mit Hilfe der „Oval“-Funktion, die sich drei Symbole links von der „Straight“-Funktion befindet (siehe Abbildung 4).

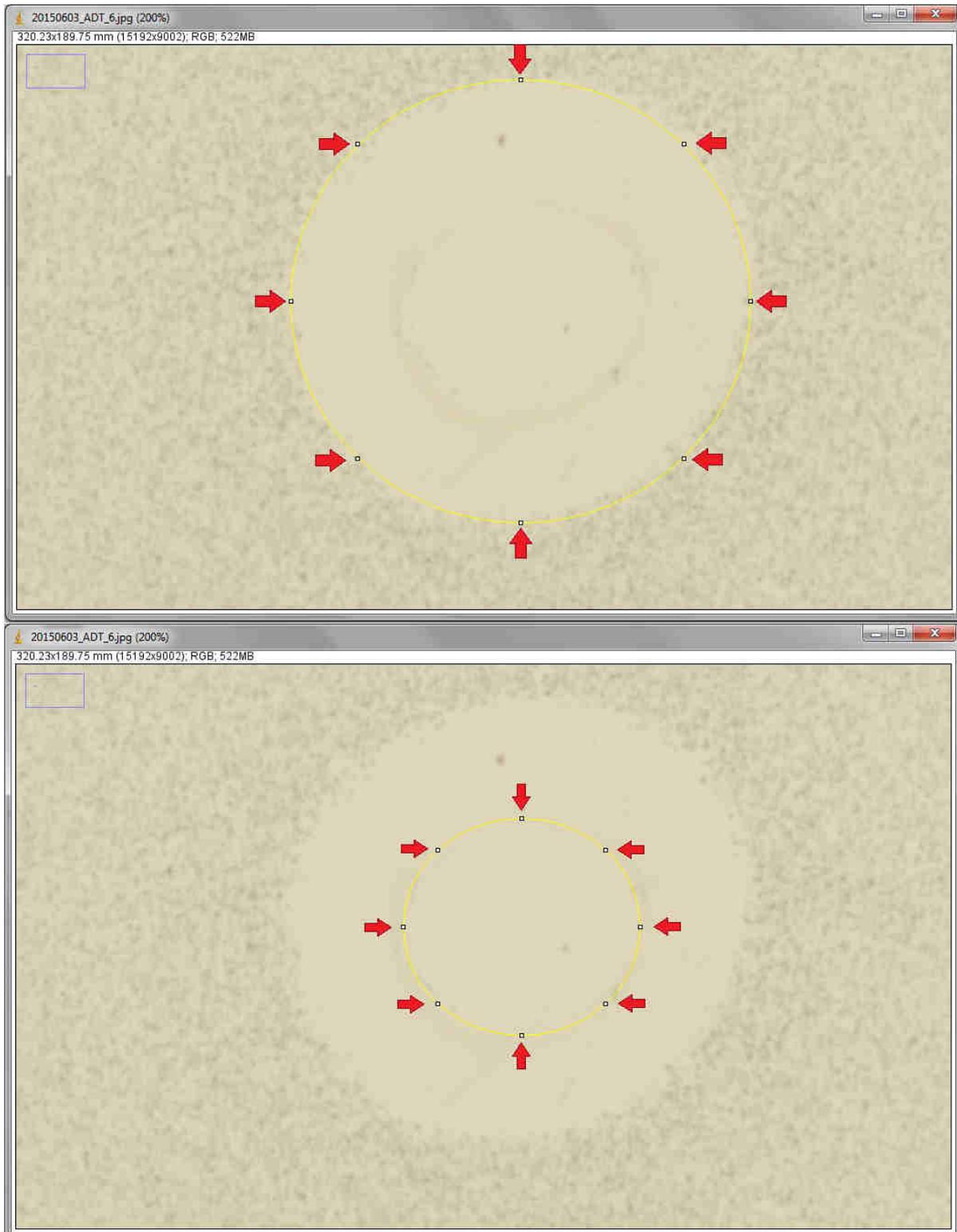


Abbildung 6: Screenshot einer eingescannten Platte mit nachgezeichnetem Hof bzw. nachgezeichnetem Stanzling.

Die Form des Hofes wird mit einer Ellipse möglichst genau nachgezeichnet (siehe Abbildung 6). Anschließend wird unter „Analyze“ – „Measure“ die Fläche der Ellipse vermessen (siehe Abbildung 7).

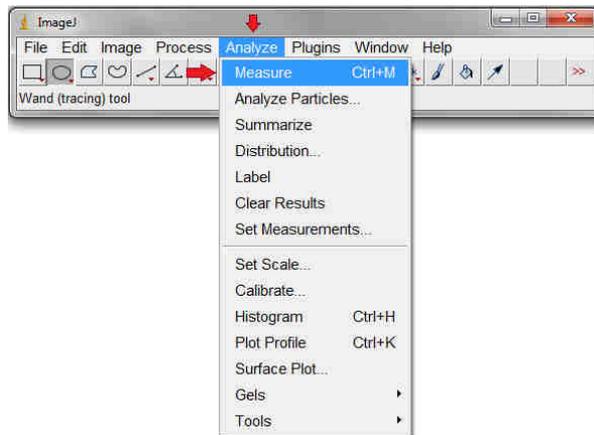


Abbildung 7: Screenshot der Benutzeroberfläche von ImageJ mit Anweisungen zur Vermessung der markierten Flächen.

Die Ergebnisse der Messung werden im neuen Fenster „Results“ angezeigt. Auf dieselbe Weise wie der Hof vermessen wurde, wird auch die ausgestanzte Fläche vermessen. Das „Results“-Fenster ist in Abbildung 8 dargestellt. Durch die Kalibrierung werden die Flächen in der zweiten Spalte in der Einheit mm<sup>2</sup> angegeben.

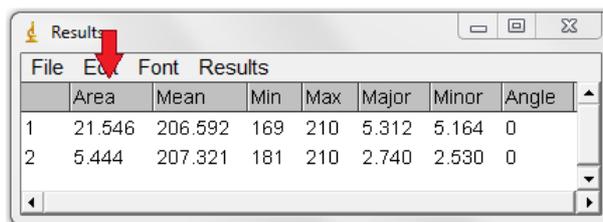


Abbildung 8: Screenshot des „Results“-Fensters mit den Ergebnissen einer Messung von Hof und Stanzling. Durch die Kalibrierung wird das Ergebnis in mm<sup>2</sup> angegeben.

Nach Vermessung aller Höfe und Stanzlinge können die Ergebnisse unter „File“ – „Save As“ in einer Excel-Tabelle abgespeichert werden (siehe Abbildung 9).

Um die wirkliche Fläche des Hofes zu erhalten, wird in Excel von der Gesamtfläche die Fläche des Stanzlings abgezogen. Die so errechnete Nettofläche des Hofes lässt sich dann mit anderen Messungen vergleichen.

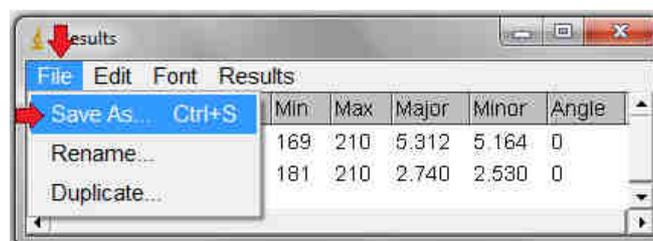


Abbildung 9: Screenshot des „Results“-Fensters mit den Anweisungen zum Abspeichern der Ergebnisse in einer Excel-Tabelle.

## **7. Literatur**

Lehrer, R.I. et al., 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides.  
*Journal of immunological methods*, 137, pp.167–173.

## **8. Checklisten**

### **Medien**

TSB-Gemisch

TSB-Medium für Schüttelkolben

10 mM NaPB

Agar-Agar für Verdünnungsausstrich

Agarose (untere Schicht)

Agarose (obere Schicht)

### **Materialien**

250 ml Schüttelkolben (steril)

Standzylinder (steril)

Bechergläser (steril)

Pipettenspitzen (steril)

1.5 ml Eppendorfreaktionsgefäße (steril)

Abgeschnittene Pipettenspitzen (steril)

Drigalskispatel (steril)

Petrischalen (steril)

50 ml Falcon (steril)

### **Ablauf Tag 1**

Medien ansetzen

Medien und SK autoklavieren

Animpfen

## **Ablauf Tag 2**

Agar und Agarose komplettieren

Agar usw. autoklavieren

Agarose im Wasserbad temperieren

Platten für den Verdünnungsausstrich gießen

Bakterien waschen und in die untere Agarose geben

Untere Schicht Agarose gießen

Löcher stanzen und Proben einfüllen

Inkubationszeit von 3 h

Obere Schicht Agar gießen

Inkubationszeit 18 h

## **Ablauf Tag 3**

Auswertung ADT-Platten

Auswertung Verdünnungsausstrich