



Aktivitäts- und SDS-PAGE-Analysen von Fermentationsüberständen und Chromatographiefraktionen eines antimikrobiellen Peptids

Bachelorarbeit von

Martin Hinz

Matrikelnummer [REDACTED]

vorgelegt am 17.03.2017

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Department Biotechnologie

Gutachter: Prof. Dr.

Gesine Cornelissen

(HAW Hamburg)

Gutachter: Prof. Dr.

Jörg Andrä

(HAW Hamburg)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Antimikrobielle Peptide.....	2
1.2 Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden	3
1.3 Konzept des Projektes Pharmcycle.....	3
2 Zielsetzung	5
2.1 Aufreinigung	5
2.2 Aktivitätsbestimmung	5
3 Methoden.....	6
3.1 ADT	6
3.2 SDS-PAGE.....	7
4 Ergebnisse.....	9
4.1 Analyse des Überstandes und Fraktionierung mit der IEXC	9
4.2 SDS-PAGE.....	10
4.3 ADT	13
4.3.1 Messung der Aktivität gegen das Expressionssystem	14
4.3.2 Weitere ADTs	16
4.4 Untersuchung von HPLC-Fractionen mittels ADT	18
5 Diskussion	18
6 Literaturverzeichnis.....	23

7	Anhang	I
7.1	Verwendete Geräte	I
7.2	Verwendete Chemikalien	II
7.2.1	SDS-PAGE	II
7.2.2	ADT	III

Abkürzungsverzeichnis

a. dem	aqua d emineralisata (dt. demineralisiertes Wasser)
ADT	A gar D iffusionstest
AMP	A ntimikrobielles P eptid
AS	A minosäure
E.coli	E scherichia c oli
HPLC	H igh P ressure L iquid C hromatography
IEXC	I on e xchange C hromatography
OD	O ptische D ichte
P. pastoris	P ichia p astoris
SDS-PAGE	S odium D odecyl S ulfat P oly A crylamid G el E lektrophorese
SOP	S tandard O perating P rocedure

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auftragsschema der SDS-PAGE der Fraktionen 18, 20, 21, 22, 23 und 24 der Kultivierung JDJB2015.....	11
Tabelle 2: Auftragsschema der SDS-PAGE der Fraktionen 25, 26, 28, 29, 30 und 31 der Kultivierung JDJB2015.....	11

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verlauf der Ionenaustauschchromatographie mit einem Injektionsvolumen von 200 ml der Kultivierung JDJB2015.....	9
Abbildung 2: Gel der SDS-PAGE angefärbt mit Coomassie-Färbung. Von links nach rechts wurde aufgetragen: Marker, 250 ng Standard, 350 ng Standard, 500 ng Standard, sowie die Fraktionen 18, 20, 21, 22, 23 und 24 der Kultivierung JDJB2015.	10
Abbildung 3: Gel der SDS-PAGE angefärbt mit Coomassie-Färbung. Von links nach rechts wurde aufgetragen: Marker, 250 ng Standard, 350 ng Standard, 500 ng Standard, sowie die Fraktionen 25, 26, 28, 29, 30 und 31 der Kultivierung JDJB2015.	11
Abbildung 4: Darstellung des Verlaufs der Banden der SDS-PAGE's der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015.	12
Abbildung 5: Darstellung der Standardkurve des ALK-OH.....	13
Abbildung 6: Darstellung des Verlaufs der ALK-OH-Konzentration der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015	14
Abbildung 7: Darstellung der Aktivität von verschiedenen ALK-OH- und Melittin-Konzentrationen gegen <i>P. pastoris</i>	15
Abbildung 8: Darstellung der Aktivität von verschiedenen ALK-OH- und Melittin-Konzentrationen gegen <i>E.coli</i>	15
Abbildung 9 Verlauf der ALK-OH-Aktivität der Fraktionen 6-23 bei pH 9 der Kultivierung JDJB1515	16
Abbildung 10 Verlauf der ALK-OH-Aktivität jeder zweiten Fraktionen von 1-35 der Kultivierung JDJB1515 bei pH 7.....	17
Abbildung 12: Vergleich des Verlaufs der Bande 1 der SDS-PAGE und der ADT-Untersuchungen der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015.	19
Abbildung 13: Vergleich des Verlaufs der Bande 2 der SDS-PAGE und der ADT-Untersuchungen der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015.	19
Abbildung 14: Vergleich des Verlaufs der Bande 3 der SDS-PAGE und der ADT-Untersuchungen der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015.	20

Abbildung 15: Vergleich des Verlaufs der Bande 4 der SDS-PAGE und der ADT-
Untersuchungen der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015.20

Zusammenfassung

Weltweit nimmt die Zahl der entdeckten, antibiotikaresistenten Mikroorganismen stetig zu. (Thomas, 2014) Bei humanpathogenen Mikroorganismen stellt dies besonders in der Medizin ein großes Problem dar. Durch den oft leichtfertigen Umgang mit Antibiotika und dem unzureichenden Abbau dieser, gelangen immer mehr Antibiotikarückstände in die Umwelt. Um diesem Trend entgegen zu wirken, wird die Entwicklung neuer Alternativen zu herkömmlichen Antibiotika untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wird das antimikrobielle Peptid (AMP) NK-2-ALK-OH auf seine antimikrobielle Aktivität untersucht. Dieses hatte sich in ersten Tests als vielversprechend herausgestellt. In vorangegangenen Arbeiten wurde das Gen, welches das NK-2-ALK-OH codiert, in das Genom der rekombinanten Hefeart *P. pastoris* eingebaut und kultiviert. Mit der *P. pastoris* als Expressionssystem lässt sich über Methanolinduktion die Produktion des antimikrobiellen Peptids regulieren. Aus den so durchgeführten Kultivierungen wurden diverse Proben genommen.

In dieser Arbeit wird der Verlauf der Konzentration des fermentativ hergestellten NK-2-ALK-OH dargestellt. Mittels Agardiffusionstest wird das Peptid nachgewiesen und seine antimikrobielle Aktivität bestimmt. Zudem kann gezeigt werden, dass der pH-Wert einen Einfluss auf die Aufreinigung des Peptids hat.

In der vorangegangenen Bachelorarbeit von Jakob Brandt konnten für die Fermentationsüberstände keine Aktivität des NK-2-ALK-OH nachgewiesen werden. Dafür konnte gezeigt werden, dass die Medienbestandteile die Wirkung des NK-2-ALK-OH hemmen. (Brandt, 2015) Daher wurden zusätzliche Aufreinigungsmaßnahmen getroffen, um die Medienbestandteile abzutrennen.

In dieser Arbeit werden daher Fraktionen der Kulturüberstände verwendet, die zuvor mittels Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt wurden. In diesen Proben wird die Aktivität des Peptids nachgewiesen. Außerdem werden die Proben mit der SDS-PAGE untersucht.

1 Einleitung

1.1 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide sind 20 bis 40 Aminosäuren (AS) lange Peptide mit einer antimikrobiellen Wirkung. Sie besitzen einen amphipatischen Charakter und weisen eine positive Nettoladung auf. Dadurch können AMPs gut an die negativ geladene Membran von Bakterien binden, in diese Eindringen und ihre Struktur zerstören. (Veerman et al., 2001)

Es gibt 2619 entdeckte AMPs, die in Datenbanken dokumentiert sind. Davon stammt ein Großteil der AMPs aus Tieren. Doch auch in Bakterien, Pflanzen und Pilzen konnten AMPs nachgewiesen werden. (G. Wang, 2015)

Antimikrobielle Peptide tauchen als natürlicher Teil des Immunsystems in nahezu jedem Lebewesen auf. So konnten in nur einem Tier mehr als 24 verschiedene AMPs nachgewiesen werden. Außerdem besitzen sie ein weites Wirkungsspektrum. So können AMPs gegen Viren, Bakterien Pilze, Protozoen oder Infektionen wirken. (Hancock, 2000)

Dabei lassen sich die AMPs in 3 Hauptstrukturgruppen einteilen. Zu diesen zählen die α -helikalen Peptide, β -Faltblatt Peptide und die ausgedehnten Peptide. (Nguyen et al., 2011) Das in dieser Arbeit untersuchte NK-2 zählt zu den α -helikalen Peptiden. Neben diesen drei Hauptgruppen gibt es noch weitere Untergruppen.

Auch im Menschen lassen sich diverse AMPs nachweisen. So kommen beim Menschen AMPs aus den Strukturfamilien der Defensine, Cathelicidine und der Histatine vor. Aufgrund ihrer zuverlässigen Wirkung und ihrer natürlichen Herkunft wird die Verwendung von AMPs als Medikament untersucht. (Bals, 2000)

In dieser Arbeit wird mit einer Variante des Peptids NK-2 gearbeitet. Dabei ist dieses Peptid von dem NK-Lysin abgeleitet, welches ursprünglich aus Schweinen stammt und isoliert wurde. Bei der Untersuchung des NK-Lysin wurde eine starke antibakterielle Wirkung gegen *E.coli*, sowie die Wirksamkeit gegen Tumorzellen in

Mäusen festgestellt. Gleichzeitig wurden jedoch die roten Blutkörperchen der Maus nicht angegriffen. (Andersson et al., 1995) Das NK in NK-Lysin steht dabei für natürliche Killerzellen.

Diese Entdeckung führte zu einer Weiterentwicklung des Peptids. Dabei wird das ursprüngliche Peptid auf einen 27 AS langen Abschnitt gekürzt und AS an drei Stellen im Peptid ausgetauscht. (J. Andrä, 1999) Durch diese Abwandlung entsteht das NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K. Im folgenden wird für das Peptid die Bezeichnung ALK-OH verwendet.

1.2 Wirkungsweise von antimikrobiellen Peptiden

Grundsätzlich wirken AMPs aufgrund ihrer amphiphilen Struktur und ihrer positiven Ladung, mit der sie sich an die negative Zellmembran von Bakterien anlagern. Amphiphil bedeutet, dass das Molekül sowohl aus einem hydrophilen als auch aus einem hydrophoben Teil besteht. Diese Eigenschaft ermöglicht es den Peptiden in die Zellmembran einzudringen und dort die Struktur zu stören. Ab einer Grenzkonzentration wird die Struktur der Membran so stark gestört, dass diese ihre Funktion nicht aufrecht erhalten kann und die Zelle lysiert. (Shai Y., 2001)

Zu der Wirkungsweise von AMPs bestehen verschiedene Modelle.

1.3 Konzept des Projektes Pharmcycle

Das Projekt Pharmcycle befasst sich mit dem Problem zunehmender Antibiotikaresistenzen. Diese entstehen, da nach der Einnahme von Antibiotika ein Großteil des Wirkstoffs unverändert wieder ausgeschieden wird und so in die Umwelt gelangt. In dem Projekt werden verschiedene Wege untersucht den Einfluss von Antibiotika auf die Umwelt zu verringern. Unter Anderem wird an der Zulassung neuer Arzneimittel, sowie die Reinigung des Abwassers angesetzt. Ebenso könnte die Entwicklung alternativer Medikamente die Lösung sein, um der Zunahme von Antibiotikaresistenzen entgegen zu wirken. (Floeter, 2017) Im Rahmen dieser Arbeit wurde, in dem Projekt, an der Untersuchung eines antimikrobiellen Peptids

mitgewirkt. Das Peptid soll einerseits die Wirkung eines herkömmlichen Antibiotikums aufweisen und andererseits leichter abbaubar sein. Bei diesem Peptid handelt es sich um das in der Einleitung beschriebene NK-2 ALK-OH.

In vorangegangenen Kultivierungen wurde das antimikrobielle Peptid unter Verwendung der rekombinanten Hefeart *Pichia pastoris* SMD1168H, als Expressionssystem, fermentativ produziert.

Diese Bachelorarbeit befasst sich mit der Aufreinigung, dem Nachweis und der Aktivitätsbestimmung des antimikrobiellen Peptids nach der Produktion. Dazu werden die Kulturüberstände, die bereits mittels Ionenaustauschchromatographie (IEXC) aufbereitet und fraktioniert wurden, verwendet. Über Sodium Dodecyl Sulfat Poly Acrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) -Analysen kann das NK-2 daraufhin identifiziert werden. Die einzelnen Fraktionen werden so auf das Vorhandensein und die Menge des enthaltenen NK-2 untersucht. Anschließend wird mit Hilfe des Agardiffusionstests (ADT) die Wirksamkeit des Peptids untersucht.

2 Zielsetzung

2.1 Aufreinigung

Mit diesem Projekt soll eine Aufreinigungsstrategie entwickelt werden, mit der das NK-2-ALK-OH direkt aus der Kulturbrühe der Fermentation isoliert und aufkonzentriert werden kann. Dazu werden die IEXC und die SDS-PAGE verwendet. Mit der IEXC wird die Kulturbrühe in ihre Bestandteile nach Ladung aufgetrennt und in einem Chromatogramm aufgezeichnet. Dabei werden Peaks von Interesse aufgefangen und fraktioniert. So können Medienbestandteile und andere störende Stoffe abgetrennt werden. Mit der SDS-PAGE werden daraufhin die Fraktionen auf ihre Reinheit untersucht. Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Peptid schrittweise aufzureinigen und für jeden Aufreinigungsschritt den Aufreinigungsfaktor und die Aktivität zu bestimmen.

2.2 Aktivitätsbestimmung

Ebenso soll anschließend die Aktivität des AMP bestimmt werden. Dafür wird der ADT verwendet. Der ADT ist ein typischer Test, der auch zur Bestimmung der Aktivität von klassischen Antibiotika genutzt wird. Bei dem Test wird die Aktivität der Proben gegen einen Mikroorganismus getestet. Dazu werden Agarplatten mit z.B. *E.coli* beimpft. Dann werden die Proben auf die Agarplatte aufgetragen. Bildet sich an dem Ort an dem die Probe aufgetragen wurde nach einer Inkubationszeit ein Hemmhof, so weist die Probe eine wirksame Aktivität gegen den Testorganismus auf. Über die Größe des Hemmhofs lässt sich dann die Stärke der Wirksamkeit bestimmen.

3 Methoden

3.1 ADT

Um die Wirksamkeit antimikrobieller Hemmstoffe gegenüber Mikroorganismen zu testen, wird der sogenannte Agardiffusionstest (ADT oder auch Lochtest) verwendet. Hierbei wird der ADT nach der im Bioprozess- und Analysetechniklabor etablierten Standard Operating Procedure (SOP) (Brandt, 2015) durchgeführt. Dafür wird ein Agarosemedium angesetzt, welches mit Testkeimen angeimpft wird. Dabei handelt es sich in dieser Arbeit um *E.coli* K12 M15. Diese Testorganismen liegen als Kryokultur vor und werden zunächst aufgetaut und anschließend im Schüttelkolben vorkultiviert. Dazu werden 200 µl der Kultur in 50 ml TSB-Medium im Schüttelinkubator bei 30 °C und 170 rpm über Nacht inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden 200 µl aus dem Schüttelkolben entnommen und zum Animpfen eines weiteren Schüttelkolbens mit 50 ml TSB-Medium genutzt. Dieser wird dann für weitere zweieinhalb Stunden bei 30 °C und 170 rpm inkubiert. Durch diesen Arbeitsschritt befinden sich die Testorganismen zum Zeitpunkt der Ernte in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Zellen werden geerntet, indem sie bei 4 °C und 900 x g für 10 min zentrifugiert, in 4 °C kaltem Natriumphosphatpuffer (NaPB) gewaschen und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert werden. Der Überstand wird verworfen. Das Zellpellet hingegen wird in NaPB resuspendiert und dann bei 620 nm im Photometer vermessen. Über die OD-Messung kann die Zelldichte abgeschätzt und eine entsprechende Menge zum Animpfen des Agars entnommen werden. Die Mikroorganismen liegen zu diesem Zeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase vor und werden in den Agar gegeben, solange dieser noch warm und flüssig ist. Die Temperatur des Agars sollte bei ca. 48°C liegen. Das spielt eine wichtige Rolle, da einerseits die Keime durch die Temperatur nicht abgetötet und der Agar andererseits nicht vorzeitig aushärten darf. Anschließend werden mit dem Agar Platten gegossen und zum Aushärten ruhen gelassen.

Nachdem die Platten ausgehärtet sind, werden Löcher in den Agar gestanzt. Sie dienen der Probenaufgabe. Dann werden die Löcher mit einem definierten Probenvolumen der zu testenden Substanzen befüllt. Durch Diffusion breiten sich die Proben im Agar aus. Daraufhin werden die Platten mit einer weiteren Agarschicht überschichtet und im Brutschrank bei 30 °C inkubiert, bis die Mikroorganismen einen gleichmäßigen Rasen auf der Platte bilden. Die zweite Agarschicht enthält einen höheren Nährstoffanteil, um das Wachstum der Mikroorganismen zu fördern. Um die ausgestanzten Probenlöcher herum bilden sich bei den wirksamen Substanzen Hemmhöfe, da dort die Substanz in den Agar diffundiert ist und das Wachstum der Mikroorganismen gehemmt hat. Da das aufgetragene Probenvolumen stets gleich bleibt, lässt sich über die Größe des Hemmhofes auf die Konzentration der Probe zurückschließen. Dazu müssen jedoch Positivkontrollen mit bekannter Konzentration mit aufgetragen werden und zu den unbekanntenen Proben ins Verhältnis gesetzt werden. Die Platten werden dafür eingescannt und am Computer ausgewertet. Das Ausmessen der Höfe erfolgt mittels des Programms ImageJ (National Institutes of Health).

3.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zur Trennung von Stoffgemischen. Dabei werden die Bestandteile in der Probenvorbereitung denaturiert und negativ geladen. Dies geschieht, indem die Probe mit SDS-haltigem Probenpuffer versetzt und erhitzt wird. Nach der Probenvorbereitung werden die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proben in eine Richtung und trennen sich dabei nach ihrer Größe auf.

Die Auftrennung erfolgt in einem Polyacrylamidgel, welches aus drei Schichten besteht. Die Schichten werden als Sammelgel, Abstandsgel und Trenngel bezeichnet.

Das Sammelgel enthält dabei den geringsten Acrylamidanteil der Gelschichten. Dadurch bietet sie der Probe wenig Widerstand. Am Übergang zur nächsten Gelschicht trifft die Probe auf einen Widerstand und sammelt sich dort. Durch diese

Konzentrierung am Übergang der Gelschichten wird die Auflösung der Banden deutlich verbessert.

Das Abstandsgel bildet eine dünne Schicht zwischen Sammel- und Trenngel.

Die größte Schicht des Gels bildet das Trenngel. Es besitzt von den drei Schichten den größten Acrylamidanteil. Je größer der Acrylamidanteil, desto höher ist der Vernetzungsgrad des Gels und desto stärker werden die Proben retendiert. Dementsprechend werden im Trenngel die einzelnen Probenbestandteile der Größe nach aufgetrennt. Die in dieser Arbeit verwendeten Gele wurden so angesetzt, dass der Acrylamidanteil im Trenngel bei 20%, im Abstandsgel bei 12% und im Sammelgel bei 5% liegt.

Zur weiteren Auswertung werden die Gele anschließend eingefärbt. Dabei werden in dieser Arbeit zwei Färbemethoden verwendet. Zum einen die Silberfärbung, die hoch sensitiv ist und zum anderen die Coomassie-Färbung, die eine Quantifizierung der Proben ermöglicht.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse des Überstandes und Fraktionierung mit der IEXC

Aus der Kulturbrühe der Kultivierung JDJB2015 wurden 200 ml entnommen und mit der IEXC auf 15 ml aufkonzentriert. Dies entspricht einer 13,3-fachen Aufkonzentrierung. Bei der Elution von der IEXC ergibt sich folgendes Chromatogramm.

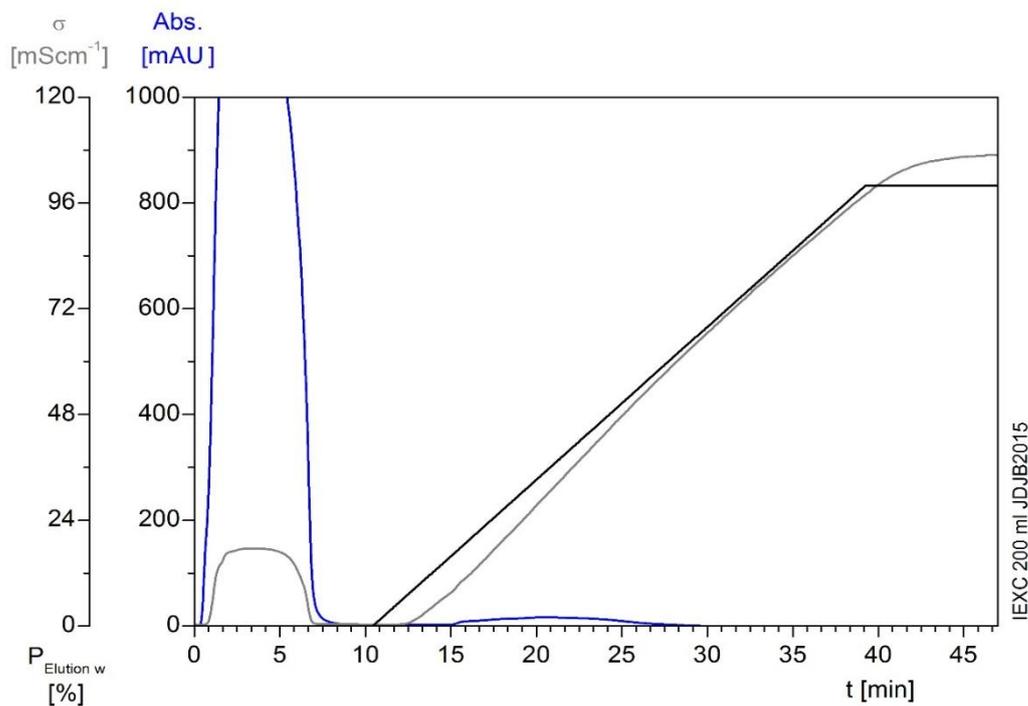


Abbildung 1: Verlauf der Ionenaustauschchromatographie mit einem Injektionsvolumen von 200 ml der Kultivierung JDJB2015.

Dabei wurde das aufgefangene Volumen fraktioniert. Eine Fraktion entspricht einer Minute bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1} . Wie in der Grafik erkennbar ist, weist das Chromatogramm zwei Peaks auf. Der erste Peak, von Minute 0 bis 8, beschreibt Medienbestandteile, die bei diesem Arbeitsschritt abgetrennt wurden. Der zweite

Peak ist wesentlich flacher und wird im Folgenden näher untersucht. Die verwendeten Proben beziehen sich somit auf die Fraktionen von Minute 15 bis 30. Die einzelnen Fraktionen werden mit der SDS-PAGE und dem ADT untersucht. Dabei kann der Konzentrationsverlauf des ALK-OH über die gesamten Fraktionen gemessen und dargestellt werden.

4.2 SDS-PAGE

Wie bereits im Kapitel 3.2 beschrieben dient die SDS-PAGE der Trennung von Stoffgemischen und dem Nachweis von einzelnen Bestandteilen. Bei der durchgeführten SDS-PAGE wurden die Fraktionen 18 bis 23 der Kultivierung JDJB2015 auf einem Gel und die Fraktionen 25 bis 31 der Kultivierung JDJB2015 auf einem weiteren Gel untersucht. Die Gele wurden dabei mit der Coomassie-Färbung angefärbt und anschließend quantitativ ausgewertet. Nachfolgend sind die Gele, sowie das jeweilige Auftragsschema dargestellt.

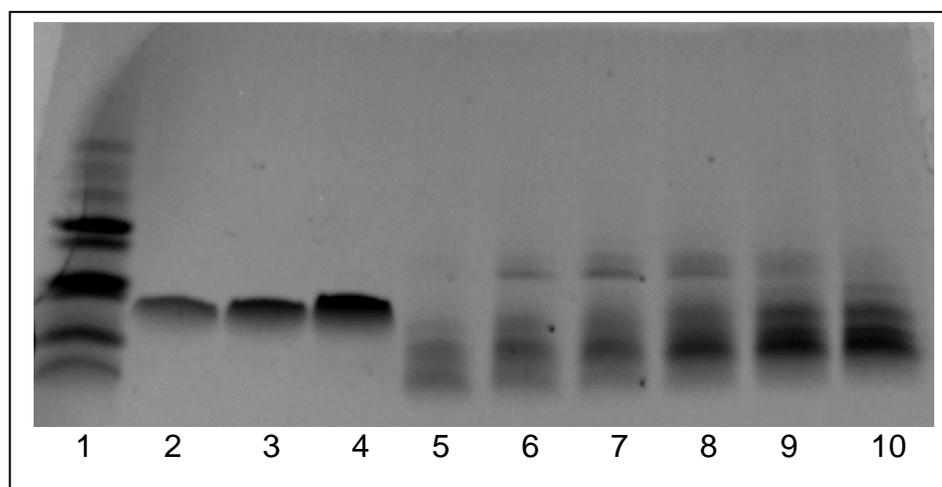


Abbildung 2: Gel der SDS-PAGE angefärbt mit Coomassie-Färbung. Von links nach rechts wurde aufgetragen: Marker, 250 ng Standard, 350 ng Standard, 500 ng Standard, sowie die Fraktionen 18, 20, 21, 22, 23 und 24 der Kultivierung JDJB2015.

Bei dem aufgetragenen Standard handelt es sich um eine synthetisch hergestellte Version des ALK-OH. Diese Referenz ist selbst in der aufgetragenen Konzentration von 250 ng sehr deutlich zu erkennen (Bahn 2).

Tabelle 1: Auftragsschema der SDS-PAGE der Fraktionen 18, 20, 21, 22, 23 und 24 der Kultivierung JDJB2015

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	Marker	ALK	ALK	ALK	F18	F20	F21	F22	F23	F24
Probenvolumen bzw. Masse	2,5 µg	0,25 µg	0,35 µg	0,50 µg	7.5 µl					
Probenpuffer	12,5 µl	14.95 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl
Auftragevolumen	Jeweils 15 µL									

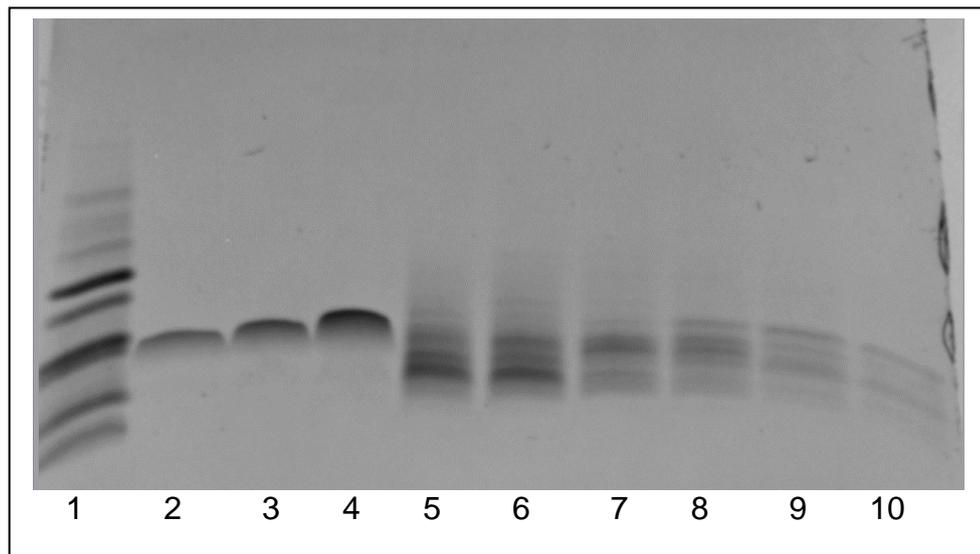


Abbildung 3: Gel der SDS-PAGE angefärbt mit Coomassie-Färbung. Von links nach rechts wurde aufgetragen: Marker, 250 ng Standard, 350 ng Standard, 500 ng Standard, sowie die Fraktionen 25, 26, 28, 29, 30 und 31 der Kultivierung JDJB2015.

In Abbildung 3 in den Bahnen 7 bis 10 lassen sich Banden erkennen, deren Intensität geringer als die des niedrigsten Standards (Bahn 2) ist.

Tabelle 2: Auftragsschema der SDS-PAGE der Fraktionen 25, 26, 28, 29, 30 und 31 der Kultivierung JDJB2015

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Probe	Marker	ALK	ALK	ALK	F25	F26	F28	F29	F30	F31
Probenvolumen bzw. Masse	2,5 µg	0,25 µg	0,35 µg	0,50 µg	7.5 µl					
Probenpuffer	12,5 µl	14.95 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl
Auftragevolumen	Jeweils 15 µL									

Nach dem Einscannen der Gele werden diese mit dem Programm ImageLab (Bio-Rad) weiter ausgewertet. Mit dem Programm lassen sich die einzelnen Banden für

jede der aufgetragenen Fraktionen bestimmen. Außerdem wird die Intensität der Banden gemessen und mit den aufgetragenen Standards ins Verhältnis gesetzt. Das Programm nutzt dafür eine Zweipunkt-Kalibrierung. Dabei bilden die aufgetragenen Standards die untere und die obere Grenzkonzentration für die Auswertung (250 ng - 500 ng). Dabei lassen sich für die aufgetragenen Fraktionen je vier signifikante Banden bestimmen. Dabei ist davon auszugehen, dass eine der vier Banden das NK2-ALK-OH darstellt.

Durch die quantitative Auswertung der Coomassie-Färbung ergibt sich nach dem Umrechnen folgender Konzentrationsverlauf für die vier gemessenen Banden.

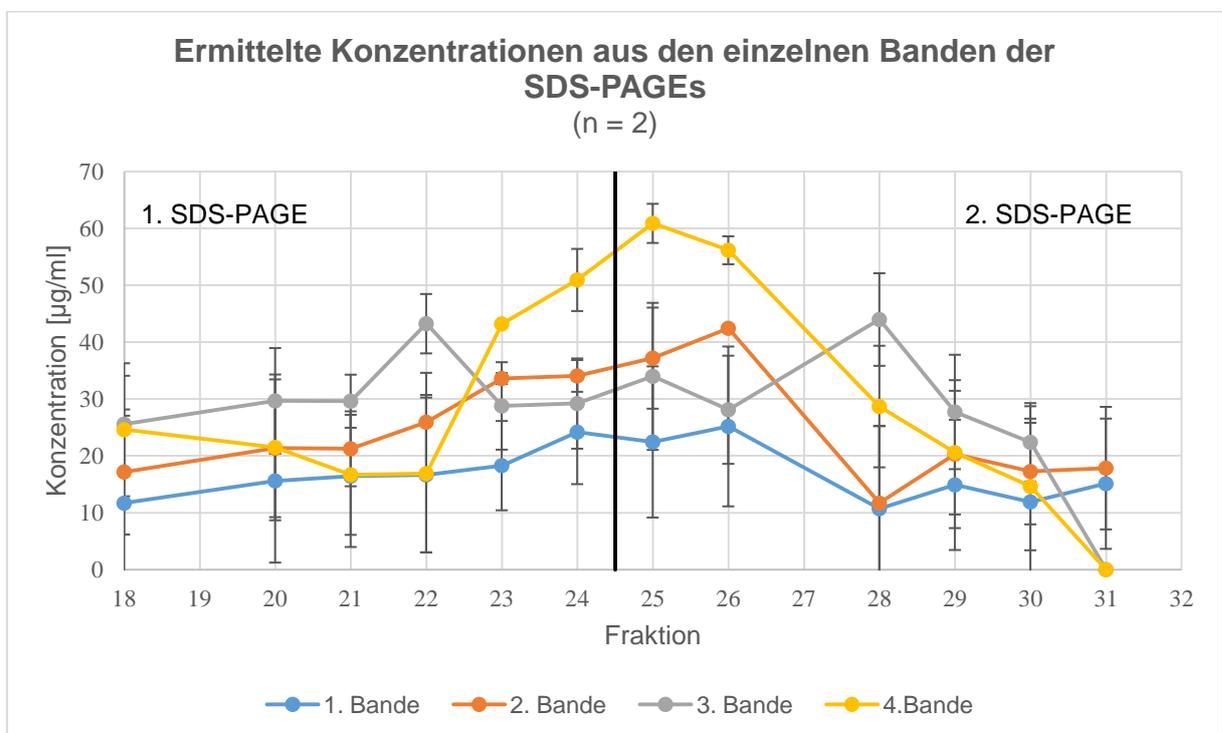


Abbildung 4: Darstellung des Verlaufs der Banden der SDS-PAGE's der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015.

Es lässt sich erkennen, dass sich in den Fraktionen jeweils vier verschiedene Substanzen befinden. Dabei steht jede Bande für eine Substanz. Ebenso lässt sich die maximal erreichte Konzentration für die jeweilige Substanz ablesen. Bande eins erreicht eine Konzentration von ca. 25 µg/ml, während die Banden zwei und drei eine Maximalkonzentration von ca. 43 µg/ml erreichen. Die höchste Konzentration erreicht

Bande vier mit ca. 60µg/ml. Zudem fällt die Konzentration für die Banden drei und vier in der Fraktion 31 auf 0 µg/ml.

4.3 ADT

Nachfolgend werden die Ergebnisse der durchgeführten ADTs dargestellt. Dabei wird der ADT wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben durchgeführt. Es handelt sich bei allen Messungen um eine Doppelbestimmung der Proben.

Zunächst wird die Standardkurve des ALK-OH vermessen. Dafür werden verschiedene Konzentrationen der synthetischen Variante verwendet. Je höher die aufgetragene Konzentration, desto größer wird auch die Fläche des gebildeten Hofes. Über die Software ImageJ (National Institutes of Health) lässt sich die Fläche des Hofes ausmessen. Dann werden die eingesetzten Konzentrationen gegen die gemessenen Hofgrößen aufgetragen. Die so erstellte Standardkurve ist nachfolgend dargestellt.

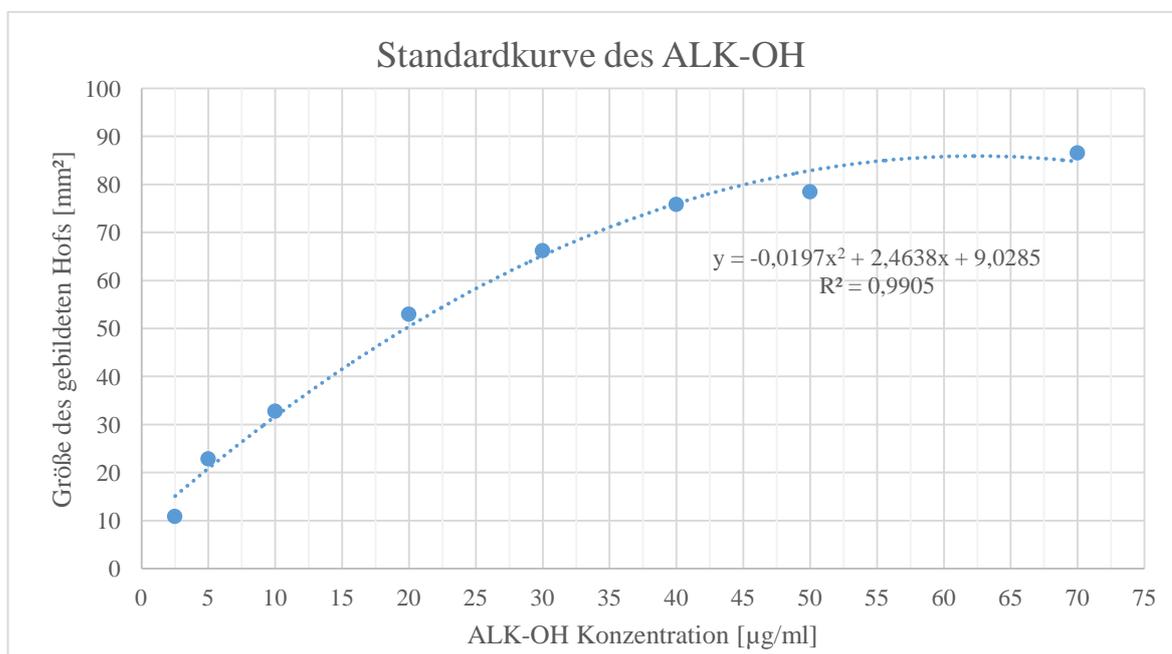


Abbildung 5: Darstellung der Standardkurve des ALK-OH

Die Standardgerade weist einen polynomischen Verlauf auf. Zudem beträgt das Bestimmtheitsmaß 0,99 und ist damit sehr genau. Es lässt sich außerdem erkennen, dass die Steigung mit zunehmender Konzentration abflacht.

Mit Hilfe der Standardkurve lassen sich die Konzentrationen von unbekanntem Proben bestimmen, indem die gemessenen Hofgrößen in die Kurvengleichung der Standardkurve eingesetzt und nach der Konzentration umgestellt werden.

Die im Abschnitt 4.2 verwendeten Fraktionen der Kultivierung JDJB2015 wurden bereits mit der SDS-PAGE untersucht. Nun werden diese ebenfalls mit dem ADT untersucht. Mit der in Abbildung 5 gezeigten Standardkurve werden die gemessenen Hofgrößen in Konzentrationen umgerechnet. Nachfolgend ist der Konzentrationsverlauf der Fraktionen dargestellt.

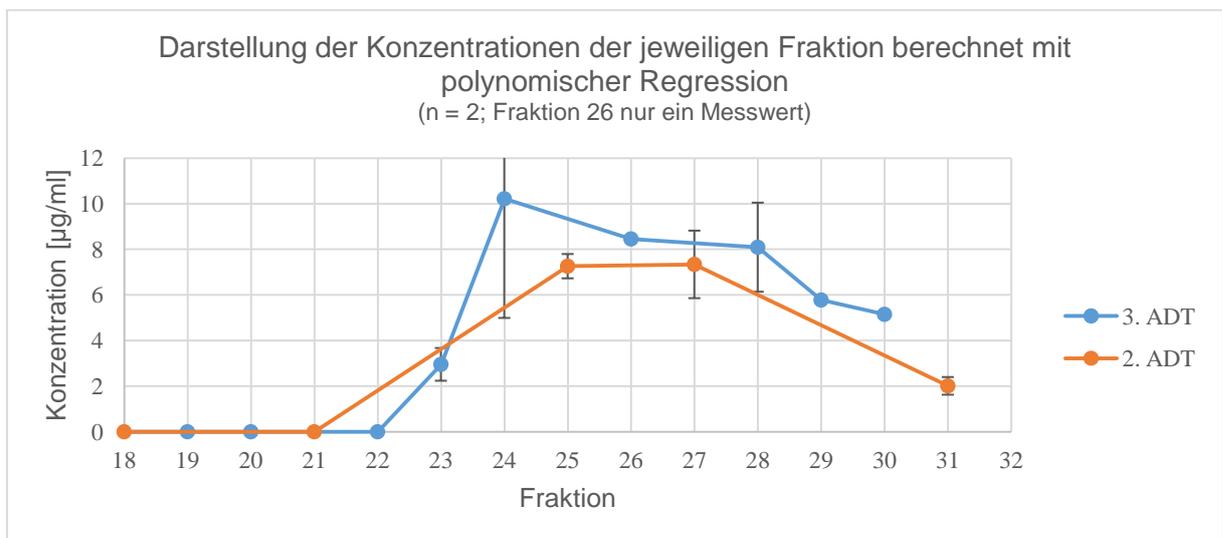


Abbildung 6: Darstellung des Verlaufs der ALK-OH-Konzentration der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015

Aufgrund der Anzahl der Proben musste dieser Versuch auf zwei ADTs durchgeführt werden. Dies führt, wie sich erkennen lässt, zu leichten Abweichungen der Ergebnisse. So weisen die im zweiten ADT gemessenen Proben nach der Umrechnung eine geringere Konzentration, als die aus dem Ersten, auf.

4.3.1 Messung der Aktivität gegen das Expressionssystem

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, reagieren AMPs spezifisch mit der Membran von Mikroorganismen. Hierbei sollen die Wirkungen des ALK-OH und des AMPs Melittin, gegen das Expressionssystem *P. pastoris* und das Darmbakterium *E. coli* miteinander verglichen werden. Melittin ist ein antimikrobielles Peptid, welches als natürlicher Bestandteil des Bienengiftes vorkommt. Es wird bei den ADTs als Positivkontrolle verwendet. Für den Versuch wurden zwei ADTs durchgeführt. Bei

einem wurde der Agar mit *P. pastoris* angeimpft, bei dem Anderen wurde *E.coli* verwendet. Dabei ist die Wachstumsrate der Hefe deutlich geringer, weshalb die Inkubationszeit des Versuchs von 18 auf 40 Stunden erhöht wurde. Nachfolgend sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt.

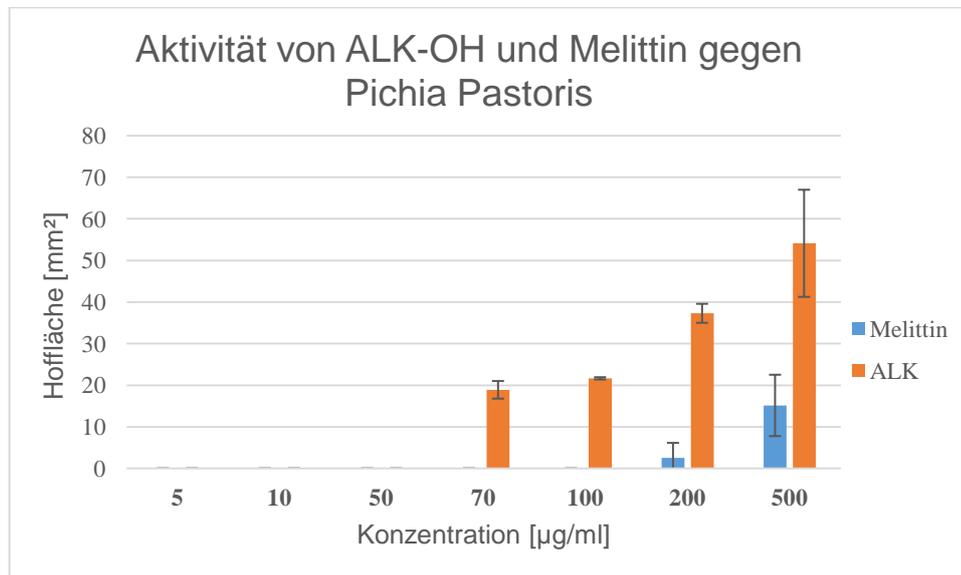


Abbildung 7: Darstellung der Aktivität von verschiedenen ALK-OH- und Melittin-Konzentrationen gegen *P. pastoris*

Auf den ADT mit *P. pastoris* wurden die Konzentrationen 70, 100, 200 und 500 µg/ml vom ALK-OH, sowie 200 und 500 µg/ml vom Melittin aufgetragen. Dabei lässt sich erkennen, dass das Melittin wesentlich kleinere Hemmhöfe als das ALK-OH gebildet hat und somit eine geringere Aktivität gegen *P. pastoris* aufweist.

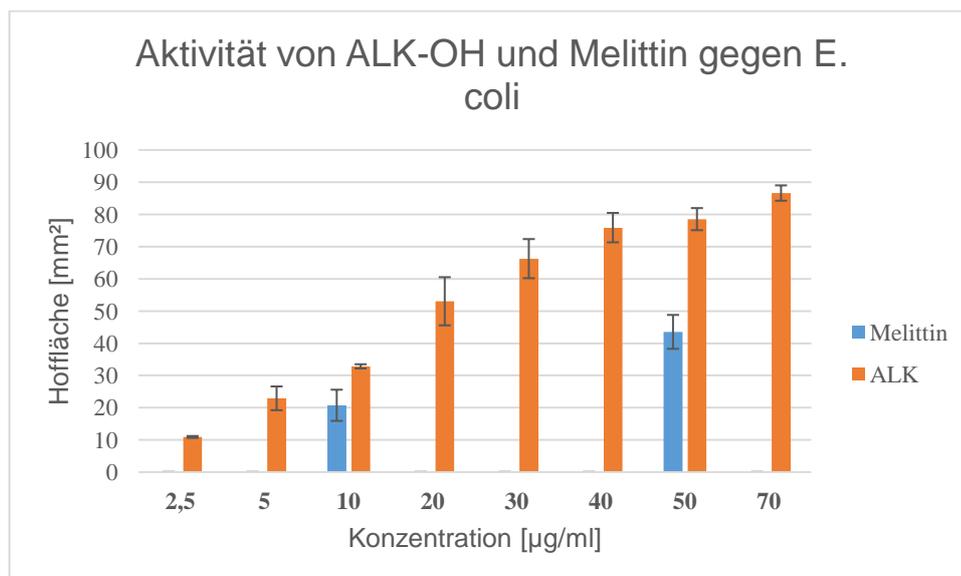


Abbildung 8: Darstellung der Aktivität von verschiedenen ALK-OH- und Melittin-Konzentrationen gegen *E.coli*

Auf den ADT mit *E.coli* wurden die Konzentrationen 2,5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 und 70 µg/ml des ALK-OH sowie 10 und 50 µg/ml des Melittin aufgetragen. Anhand der dargestellten Ergebnisse lässt sich erkennen, dass die Peptide gegen *E.coli* wesentlich sensitiver reagieren als sie es gegen *P. pastoris* tun. So bildet sich eine mittlere Hofgröße von 18,9 mm² bei einer ALK-OH-Konzentration 70 µg/ml bei den mit *P. pastoris* beimpften Platten. Bei denen mit *E.coli* hingegen bildet sich bei gleicher ALK-OH-Konzentration eine mittlere Hofgröße von 86,6 mm².

4.3.2 Weitere ADTs

Weiterhin wurde die Auswirkung des pH-Wertes auf die Aufreinigung des Peptids untersucht. Dazu wurde die Kultivierung JDJB1515 verwendet. Auch bei diesen Proben wurde die Kulturbrühe zunächst über die IEXC aufgereinigt und fraktioniert. Dabei eluieren die Proben bei pH 9 von der IEXC. Zum Vergleich wurde ein Ansatz bei pH 9 vermessen und ein Ansatz nachträglich auf pH 7 eingestellt und ebenfalls im ADT vermessen. Nachfolgend wird in Abbildung 9 der Verlauf der ALK-OH-Aktivität bei pH 9 gezeigt.

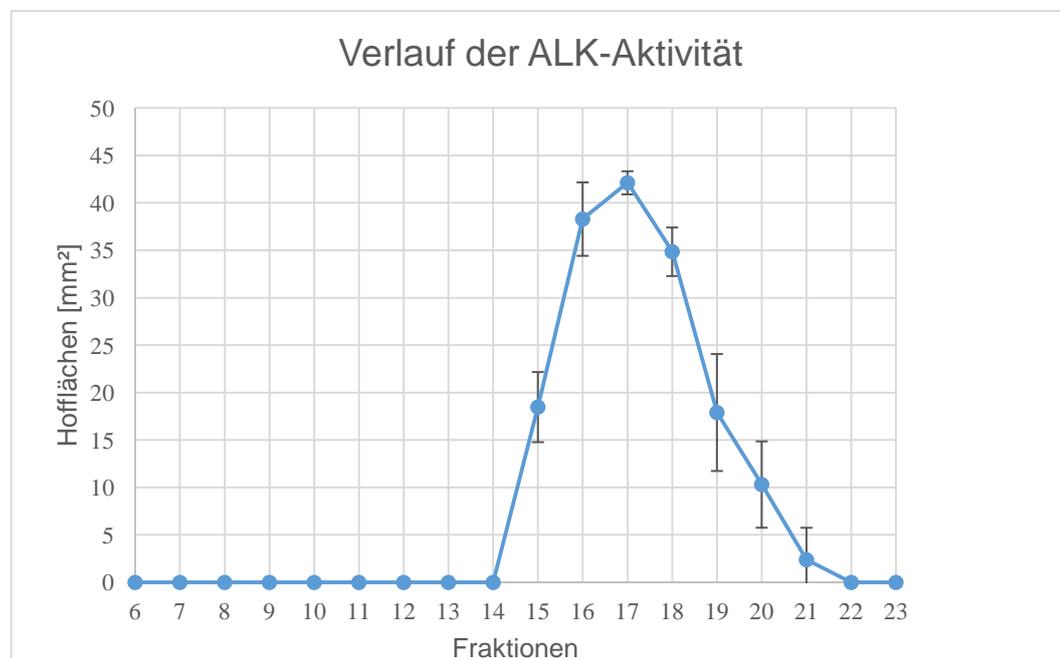


Abbildung 9 Verlauf der ALK-OH-Aktivität der Fraktionen 6-23 bei pH 9 der Kultivierung JDJB1515

Dargestellt ist der Verlauf der antimikrobiellen Aktivität der Fraktionen 6 bis 23 aus der Kultivierung JDJB1515 nach der Aufreinigung mit der IEXC. Dabei wurde 1 L der

Kulturbrühe auf den Ionentauscher aufgetragen. Die Untersuchung mit dem ADT erfolgt bei den Elutionsbedingungen des Ionentauschers (pH 9). Die maximal erreichte Aktivität befindet sich in Fraktion 17 und entspricht einer Hemmhofgröße von ca. 42 mm².

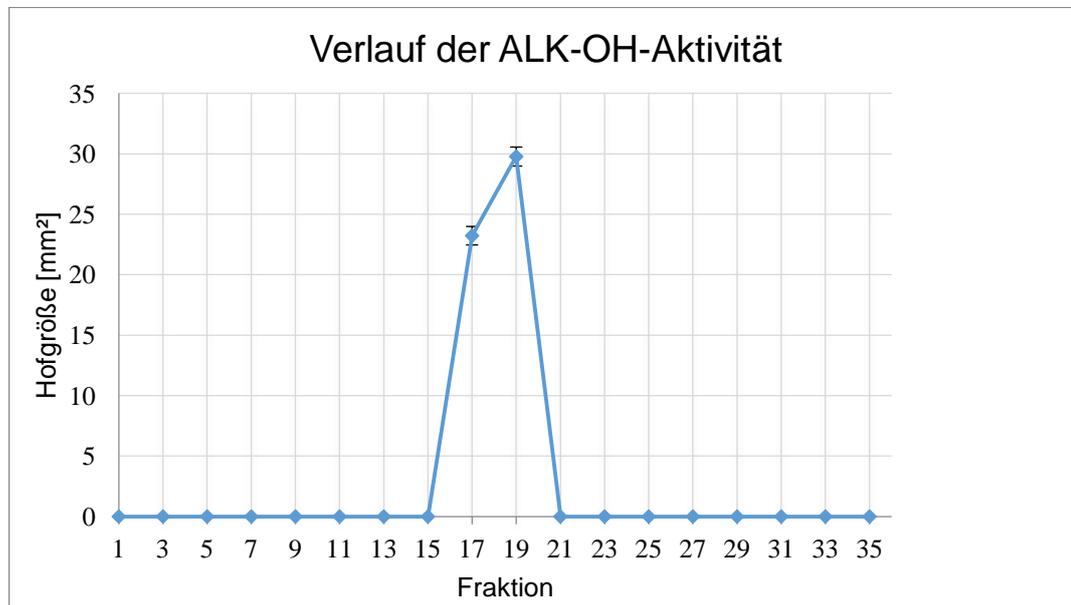


Abbildung 10 Verlauf der ALK-OH-Aktivität jeder zweiten Fraktionen von 1-35 der Kultivierung JDJB1515 bei pH 7

Im obigen Diagramm sind erneut die Fraktionen der Kultivierung JDJB1515 untersucht worden. Allerdings mit dem Unterschied, dass das aufgetragene Volumen auf den Ionentauscher 215 ml betrug und dass der pH-Wert nachträglich nach der Elution auf pH 7 eingestellt wurde. Neben den Fraktionen wurde auch der Flowthrough der IEXC für die Kultivierung JDJB1515 auf einem eigenen ADT untersucht. Dabei konnte keine Aktivität in den gemessenen Proben nachgewiesen werden, was für die Aufreinigung mit der IEXC spricht.

Betrachtet man Abbildung 10 so fällt auf, dass die gemessene, maximale Hemmhofgröße bei ca. 30 mm² liegt. Im Vergleich mit Abbildung 9 ist die Aktivität somit geringer. Außerdem liegt der bestimmte Maximalwert bei Fraktion 19 und nicht wie in Abbildung 9 bei Fraktion 17. Ebenso lässt sich erkennen, dass in den Fraktionen 15 und 21 in Abbildung 10 keine Aktivität, in Abbildung 9 jedoch deutliche Aktivität nachgewiesen wurde.

Da bei pH 7 nur jede zweite Fraktion vermessen wurde, ist es schwierig eine Aussage z.B. über die maximale Aktivität zu treffen. Jedoch lässt sich sagen, dass

der pH-Wert eine deutliche, positive Auswirkung auf die Aufreinigung des Peptids besitzt.

So ist der Peak deutlich schmaler und die Aktivität ist mit 71 % nur wenig geringer, obwohl nur 22 % des Volumens wie von pH 9 aufgetragen wurden. Dies entspricht einer 3,3-fachen Aufkonzentrierung.

4.4 Untersuchung von HPLC-Fractionen mittels ADT

Mit der HPLC werden die Bestandteile flüssiger Proben aufgetrennt und als Peaks aufgezeichnet. Proben, deren Chromatogramm signifikante Peaks aufweist, werden daraufhin fraktioniert und mit dem ADT auf antimikrobielle Aktivität untersucht. Die Untersuchung verschiedener Proben des HPLC-Überstandes einer weiteren Kultivierung ergab keine antimikrobielle Aktivität. Das bedeutet entweder, dass die HPLC als Aufreinigungsmethode für das Peptid ungeeignet ist und die Aufreinigung nicht funktioniert oder, dass während der Aufreinigung die Aktivität der Proben verloren geht.

5 Diskussion

Die in der SDS-PAGE ermittelten Ergebnisse haben für die Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015 vier Banden gezeigt. Allerdings konnte keine der Banden direkt der synthetischen Referenz zugeordnet werden. Da jedoch die Messung der gleichen Proben aus dem ADT eine antimikrobielle Aktivität ergeben hat, lässt sich vermuten, dass eine der Banden für das ALK-OH steht. Im Gel hat sich diese Bande allerdings verschoben. Um nun die passende Bande zu identifizieren wird nachfolgend der Verlauf jeder einzelnen Bande aus der SDS-PAGE mit dem Verlauf der gemessenen Aktivität aus dem ADT übereinander gelegt und verglichen. Zeigt sich dabei ein identischer Verlauf ist davon auszugehen, dass es sich um das ALK-OH handelt.

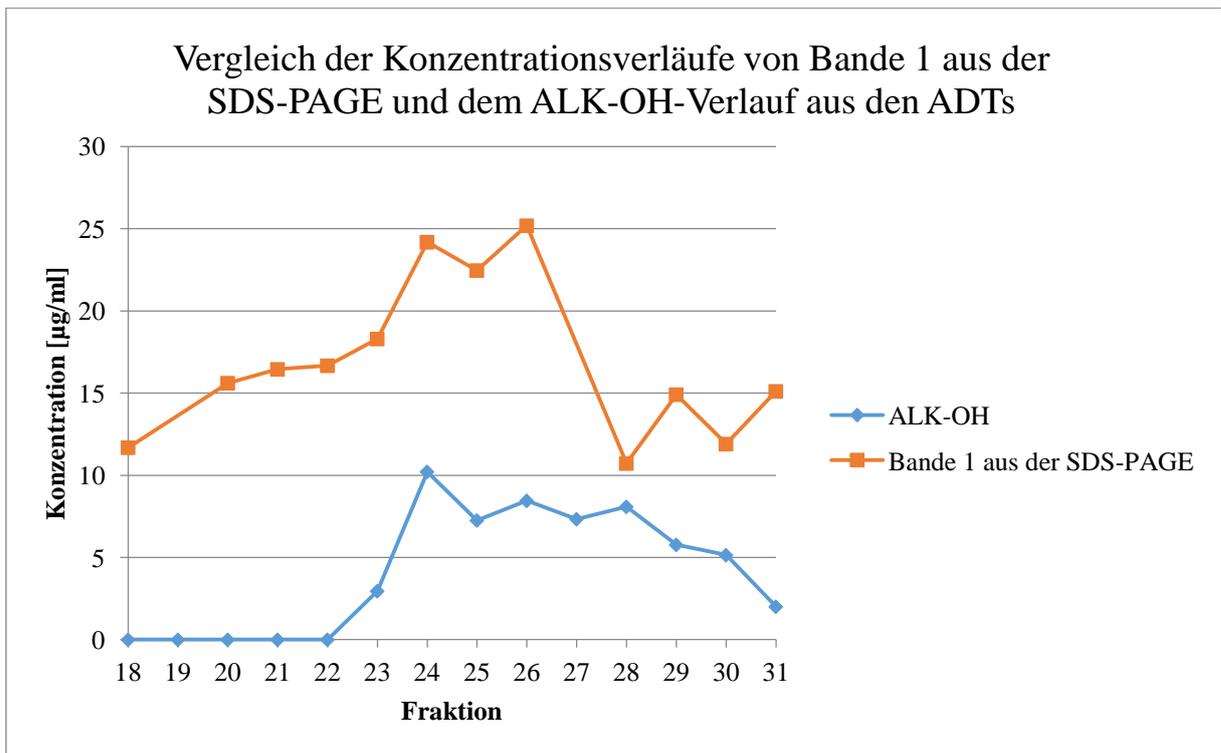


Abbildung 112: Vergleich des Verlaufs der Bande 1 der SDS-PAGE und der ADT-Untersuchungen der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015.

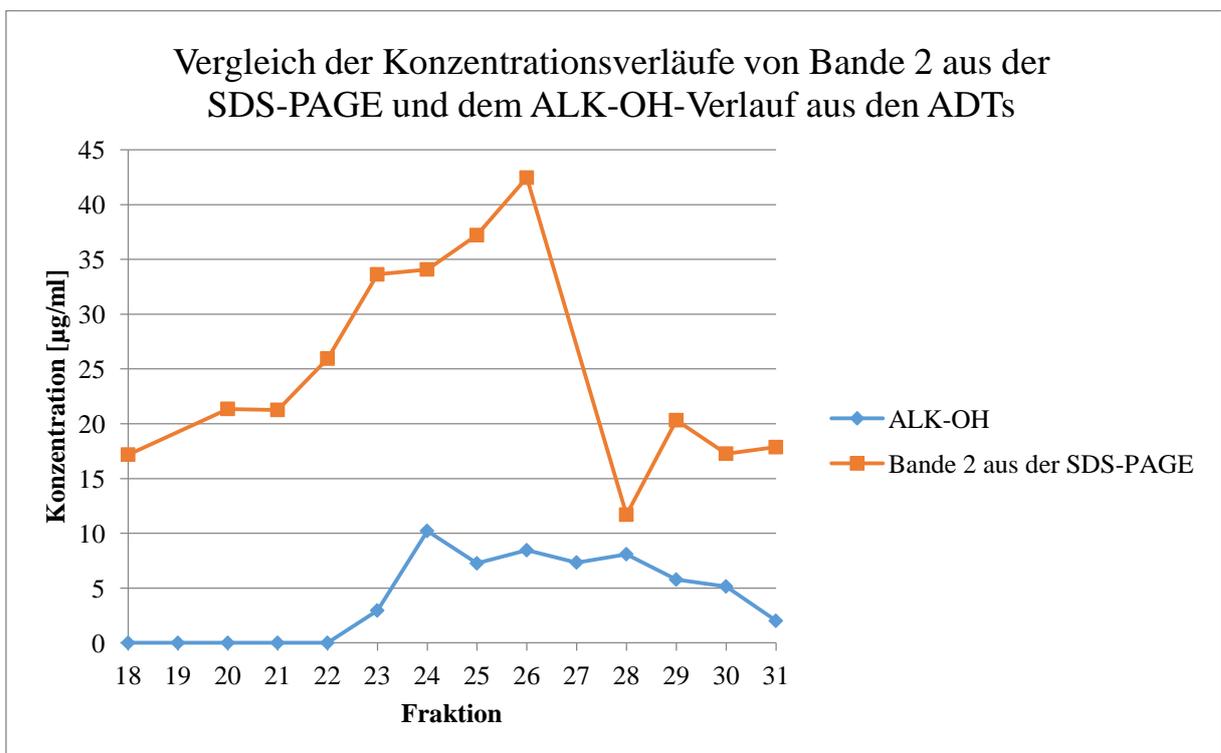


Abbildung 12: Vergleich des Verlaufs der Bande 2 der SDS-PAGE und der ADT-Untersuchungen der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015.

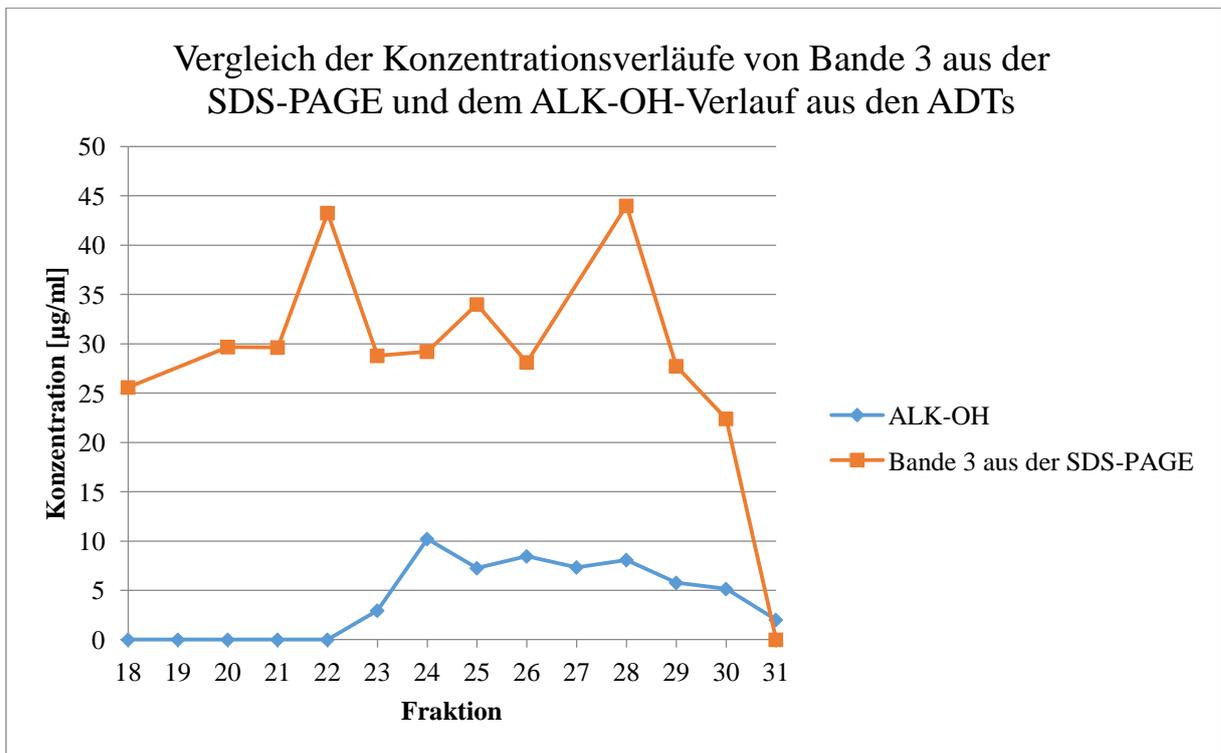


Abbildung 13: Vergleich des Verlaufs der Bande 3 der SDS-PAGE und der ADT-Untersuchungen der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015.

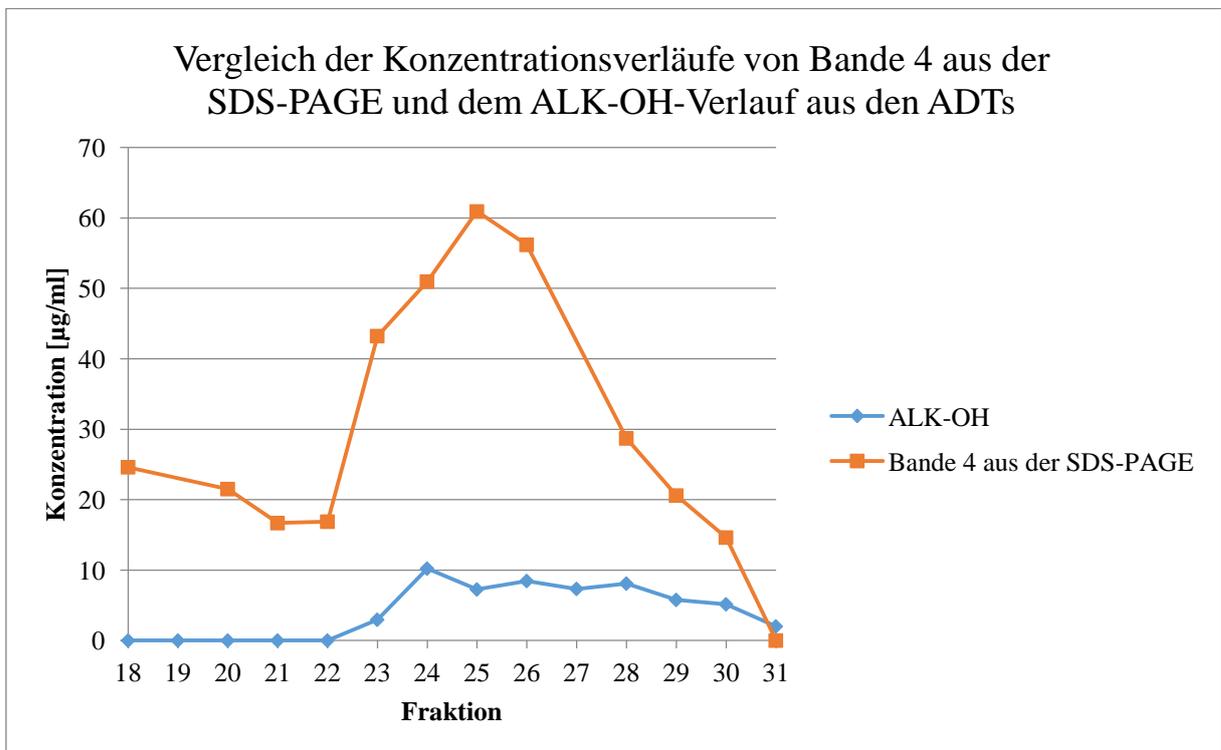


Abbildung 14: Vergleich des Verlaufs der Bande 4 der SDS-PAGE und der ADT-Untersuchungen der Fraktionen 18 bis 31 der Kultivierung JDJB2015.

Es lässt sich erkennen, dass die in der SDS-PAGE gemessene Konzentration in allen vier Banden deutlich höher ist, als die im ADT, für das ALK-OH bestimmte Konzentration. Außerdem wurden bei der SDS-PAGE die Fraktionen 19 und 27 nicht mitgemessen.

Wie bereits unter Abbildung 6 erwähnt, sind die Fraktionen 25 und 27 bei der ADT-Messung auf einem anderen ADT untersucht worden als die Nachbarfraktionen 24, 26 und 28. Dies kann zu Abweichungen der Messergebnisse geführt haben. Es lässt sich vermuten, dass die Messwerte der Fraktionen 25 und 27 somit etwas höher sein müssten (ca. bei 10 µg/ml). Zudem wurden für alle Fraktionen die Mittelwerte aus der Doppelbestimmung genutzt, außer bei Fraktion 26 wo nur ein Messwert mit dem ADT aufgenommen werden konnte.

Es lässt sich erkennen, dass der Verlauf der Banden aus der SDS-PAGE mit den Messwerten der gleichen Proben aus dem ADT nicht eins zu eins korreliert. Es fällt auf, dass die Messwerte der SDS-PAGE alle bei einer Startkonzentration beginnen, während in den ersten fünf Messwerten des ADT keine Konzentration gemessen werden konnte. Die Proben wurden dabei so gewählt, dass der Start der Produktion des Peptids dargestellt sein sollte und somit ein Startwert von 0 µg/ml erwartet wird. Zudem ist die in den Banden der SDS-PAGE dargestellte Konzentration sehr groß. Es ist davon auszugehen, dass die Messwerte der SDS-PAGE nicht den wahren Werten entsprechen. Die Messwerte der ADT-Messung sind dabei genauer und mit kleineren Abweichungen behaftet als die der SDS-PAGE.

Es ist zu vermuten, dass der Fehler bei der Auswertung der SDS-PAGE entstanden ist. Bei der Auswertung der SDS-PAGE werden die SDS-Gele eingescannt und mit dem Programm Image Lab (Bio-Rad) ausgewertet. Dabei werden die Grenzen der Banden gesetzt und die Absorption der Banden mit der Absorption des Markers ins Verhältnis gesetzt. Sind die Banden dabei leicht verschoben oder gehen ineinander über, fällt es schwer die Bandenbegrenzungen korrekt zu setzen. Bereits geringe Abweichungen erzeugen ein anderes Ergebnis.

Da das Gel nicht ganz gerade gelaufen ist und die Proben sich dadurch etwas verschoben haben, wurden vermutlich die Bandenbegrenzungen falsch gesetzt oder die Banden in Teilen falsch zugeordnet.

Von den dargestellten Banden ähnelt der Verlauf von Bande vier dem Verlauf der gemessenen Aktivität am meisten. Dies zeigt sich in der signifikanten Steigung, die in Fraktion 22 beginnt. Ebenso ist zu sagen, dass die Messwerte der ADTs ebenfalls fehlerbehaftet sind. So weist der Messwert für Fraktion 24 beim ADT einen sehr großen Fehler auf. Fraktion 25 wurde wiederum auf einem anderen ADT vermessen als die Nachbarfraktionen und für Fraktion 26 konnte nur ein Messwert aufgenommen werden. Somit könnte das tatsächliche Konzentrationsmaximum in der Fraktion 25 liegen, wie es in der SDS-PAGE der Bande vier der Fall ist. Jedoch fällt der Konzentrationsverlauf anschließend wesentlich stärker ab, als es bei dem ADTs der Fall ist. Somit kann das ALK-OH nicht eindeutig der Bande vier zugeordnet werden.

Was die Konzentration der Messungen der SDS-PAGE angeht, bleibt zu sagen, dass diese aus den gemessenen Absorptionen des eingescannten Gels bestimmt werden. Diese werden dann mit den Absorptionen der Standards ins Verhältnis gesetzt. Dabei wird aus zwei Standards eine Zweipunktkalibrierung zu Grunde gelegt. Das bedeutet, dass die Kalibrierung durch die aufgetragenen Konzentrationen der Standards begrenzt wird. Außerhalb dieser Grenzen werden die Messergebnisse sehr ungenau. Außerdem ist eine Kalibrierung mit nur zwei Messwerten recht anfällig für Messfehler.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktivität des ALK-OH mit dem ADT gemessen und über den Verlauf der Kultivierung dargestellt werden konnte. Mit der SDS-PAGE hingegen konnte das ALK-OH nicht eindeutig zugeordnet werden.

6 Literaturverzeichnis

Andersson et al., M. 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*. 1995, S. 1615-1625.

Bals, R. 2000. Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika. *Medizinische Klinik*. s.l. : Springer-Verlag, 2000, S. 496–502.

Brandt, J. C. 2015. Bachelorarbeit. *Expression des antimikrobiellen Peptides NK-2 in der Variante C7A-M11L-D21K in Pichia pastoris*. Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg : s.n., 2015.

Brandt, J. C. 2015. Standard Operating Procedure: Agarosediffusionstest zur Wirksamkeitsprüfung von toxischen Substanzen; speziell antimikrobiellen Peptiden. 2015.

Floeter, C. 2017. HAW-Hamburg.de. [Online] 01. Februar 2017. <https://www.haw-hamburg.de/forschung/projekte-uebersicht/projekt-news/projekt-news-detail/artikel/arzneimittelbelastung-in-gewaessern-projekt-pharmcycle-erforscht-loesungen.html>.

G. Wang, X. Li, Z. Wang. 2015. OXFORD ACADEMIC. [Online] 23. November 2015. <https://academic.oup.com/nar/article/44/D1/D1087/2503090/APD3-the-antimicrobial-peptide-database-as-a-tool>.

Hancock, R. E. W, Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*. 2000, S. 402–410.

J. Andrä, M. Leippe. 1999. Candidacidal activity of shortened synthetic analogs of amoebapores and NK-lysin. *Medical Microbiology and Immunology*. 1999, S. 117-124.

Nguyen et al., Leonard T. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*. 2011, S. 464–472.

Shai Y., Oren Z. 2001. From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*. 2001, S. 1629–1641.

Thomas, G. 2014. World Health Organization Media centre. [Online] 30. April 2014. <http://who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>.

Veerman et al., EC. 2001. Antimicrobial Peptides: Properties and Applicability. *Biological Chemistry*. 4, April 2001, Bd. 382, S. 597–619.

7 Anhang

7.1 Verwendete Geräte

ADT

Bezeichnung	Hersteller	Typ	Gerätenr.
Autoklav	Systemec	V-150	2055
Brutschrank	Binder	N/A	N/A
Pipette	Eppendorf	100-1000 µl	N/A
Pipette	Eppendorf	10-100 µl	N/A
Pipette	Eppendorf	0.5-10 µl	N/A
pH Meter	Sartorius	PB20	11443020
Photometer	Thermo Scientific	Genesys 20	3SGL275005
Rührer	IKA	Combimag REO	1121
Schüttelinkubator	GFL 3032		
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments	Hera Safe	N/A
Trockenschrank	Heraeus Instruments	Vacutherm	N/A
Waage	Precisa	300M	50895
Waage	Sartorius	BA110S	nicht lesbar
Wasserbad	Bandelin	Sonorex Super RK514BH	263083032
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5417R	5417R 540708745
Zentrifuge	Sigma	3K10E	46839

SDS-PAGE

Bezeichnung	Hersteller	Typ	Gerätenr.
Gelkammer	Bio-Rad	Mini-Sub Cell GT	
Pipette	Eppendorf	100-1000 µl	
Pipette	Eppendorf	10-100 µl	
Pipette	Eppendorf	0.5-10 µl	
Rührer	Vortex		
Strom- /Spannungsquelle	Bio-Rad	Power Pac Basic	
Thermoblock	neoBlock 1	2-2503	

7.2 Verwendete Chemikalien

7.2.1 SDS-PAGE

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Chargennr.	Hersteller
Acryl/Bisacrylamid			
APS			
Borsäure			
EDTA			
Essigsäure			
Ethanol			
Formaldehyd			
Glutardialdehyd			
Glycerin			
Natriumacetat			
Natriumazid			
Natriumcarbonat			

Natriumthiosulfat
 Silbernitrat
 TEMED
 Tricine
 Tris Base

7.2.2 ADT

Bezeichnung	Artikel-Nr.	Chargennr.	Hersteller
Agar Agar, Kobe I	5210.3	152182069	Carl Roth
Agarose	840004	00280710C185396L	Biozym
Glucose	N/A	N/A	N/A
Methanol	7342.1	911721	Carl Roth
NaCl	3957.2	400162007	Carl Roth
Na ₂ HPO ₄	P030.1	43788120	Carl Roth
Peptone	9886.1	512194813	Carl Roth
Trifluoressigsäure	P088.1	420163308	Carl Roth
Tryptone	8952.2	263201131	Carl Roth
Tween 20	8.170.721,000	K43133972207	Merck

Standardanweisung

Erstellung von SDS-PAGEs für den Nachweis
antimikrobieller Peptide

Titel:

SDS-PAGE

Gültig ab:

Geltungsbereich:	Unternehmen:	Hochschule für Angewandte Wissenschaften
	Abteilung:	Fakultät Life Sciences
	Standort:	Hamburg/ Campus Bergedorf
	Gebäude:	Laborgebäude Biotechnologie
	Abteilung:	Bioprozess- und Analysetechnik

	Name:	Abteilung:	Datum:	Unterschrift:
Verfasst:	Martin Hinz	BPA	09.09. 2016	
Geprüft:	Jan Demmer	BPA		
Freigegeben:				

Grund der Änderung:

Änderungen:

Einleitung:

Die SDS-PAGE (SodiumDodecylSulfat PolyAcrylamid GelElektrophorese) ist ein Verfahren zur Trennung von Stoffgemischen.

Durch die Probenvorbereitung werden alle enthaltenen Probenbestandteile negativ geladen. Nach der Probenvorbereitung werden die Proben auf ein Gel aufgetragen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proben alle in eine Richtung und trennen sich dabei nach Größe auf.

In dieser Standardanweisung (engl. *Standard Operation Procedure* = SOP) werden sowohl die Silberfärbung, als auch die Coomassie-Färbung beschrieben. Dabei ist die Silberfärbung etwa 10-mal sensitiver als die Coomassie-Färbung. Jedoch lassen sich mit dieser Färbemethode die Proben nicht quantitativ auswerten. Dafür eignet sich wiederum die Coomassie-Färbung.

Chemikalien:

Acryl/Bisacrylamid (40%)

APS (40%)

Borsäure

EDTA

Essigsäure

Ethanol

Formaldehyd

Glutardialdehyd

Glycerin (87%)

Natriumacetat

Natriumazid

Natriumcarbonat

Natriumthiosulfat

Silbernitrat

TEMED (100%)

Tricine

Tris Base

Sicherheitshinweise:

Es sind die Sicherheitshinweise der verwendeten Chemikalien zu beachten. Es sei an dieser Stelle ausdrücklich erwähnt, dass Acrylamid eine stark karzinogene Chemikalie ist. Bei allen Arbeiten mit den Gelen (Gießen der Gele, Probenauftragung, Einscannen der Gele) sind Nitrilhandschuhe zu tragen. Um Verschleppungen zu vermeiden, sollten diese oft genug gewechselt werden.

Aufbau der Gelkammer:

Zunächst einen Kamm pro Gel, sowie je zwei Glasplatten mit Ethanol reinigen (eine dickwandige „Spacer Plate“ und eine dünne, kleinere „Short Plate“ pro Gel). Dann mit der grünen Klammer zusammenspannen (siehe Abbildung 1). Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Glasplatten plan am Boden abschließen, da diese sonst beim Befüllen auslaufen können. Dann werden die Platten mit der Klammer in der Plastikhalterung auf den grauen Gummimatten eingespannt (siehe Abbildung 2).



Abbildung 1: Zusammenspannen der Platten



Abbildung 2: Halterung zum Gießen der Gele

Ansetzen des Gels:

Bei den nachfolgenden Arbeiten wird in einer grauen Plastikschale unter einem Abzug gearbeitet. Es werden Trenngel, Abstandsgel und Sammelgel nach folgendem Schema angesetzt. Die Angaben gelten für zwei Gele.

7.2.2.1.1 Tabelle 1: Rezept der Gele

	Trenngel	Abstandsgel	Sammelgel
Acryl/Bisacrylamid (40%)	5,00 ml	3,00 ml	1,33 ml
Gelpuffer 3x	2,25 ml	3,30 ml	3,30 ml
Glycerin (87%)	2,00 ml	1,00 ml	-
Aqua Dem.	0,75 ml	2,70 ml	5,37 ml
TEMED (100%)	4,50 μ l	2,50 μ l	5,00 μ l
APS (40%)	6,00 μ l	4,50 μ l	9,00 μ l

Dabei werden das TEMED und das APS erst direkt vor dem Auftragen zugegeben, da nach der Zugabe die Polymerisation beginnt.

Das Trenngel wird mit der Pipette am Rand der Gießkammer vorsichtig eingefüllt, bis die Kammer ca. zu 2/3 gefüllt ist. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen im Gel entstehen. Daraufhin werden das Abstandsgel und dann das Sammelgel auf die gleiche Weise eingefüllt. Dann wird ein mit Ethanol gereinigter Kamm in das Gel gesteckt. Danach muss das Gel für mehrere Stunden (besser über Nacht) auspolymerisieren.

Ansetzen der Pufferlösungen:

Kathodenpuffer 10x

Für den Kathodenpuffer werden Tris Base (Achtung: „Tris Base“ wird manchmal auch nur als : „Tris“ beschrieben, um Verwechslungen zu vermeiden ggf. Molekulargewicht vergleichen), Ticine und SDS zusammengegeben, auf pH = 8,44 eingestellt und mit a. dem (engl. *Aqua demineralized*) auf 50 ml aufgefüllt.

7.2.2.1.2 Tabelle 2: Kathodenpuffer

Tris Base	6,06 g	1,00 M
Tricine	8,96 g	1,00 M
SDS	0,50 g	1,00%

Anodenpuffer 10x

Für den Anodenpuffer wird Tris Base auf pH 8,9 eingestellt und mit a. dem auf 100 ml aufgefüllt.

7.2.2.1.3 Tabelle 3: Anodenpuffer

Tris Base	24,20 g	2,00 M
-----------	---------	--------

Gelpuffer 3x

Es werden Tris Base, SDS und NaN_3 auf pH 8,44 eingestellt und mit a. dem auf 100 ml aufgefüllt.

7.2.2.1.4 Tabelle 4: Gelpuffer

Tris Base	36,30 g
SDS	0,30 g
Natriumazid (NaN_3)	1,00 ml aus 1%

Vorbereitung und Auftragung der Proben:

Es wird ein Heizblock auf 95 °C erhitzt. Währenddessen werden die Proben mit dem Probenpuffer 1:1 gemischt. Dann werden Probe und Probenpuffer für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Achtung die Deckel der Eppendorf Reaktionsgefäße müssen gut verschlossen sein da sich beim Erhitzen die Flüssigkeit ausdehnt und die Deckel aufspringen können. Außerdem sollte nicht weniger Flüssigkeit in den Gefäßen sein als 20 μl .

Dann wird der Kamm aus den Gelen entfernt und in die entstandenen Taschen werden die Proben vorsichtig pipettiert. Am besten nicht mehr als 15 μl Volumen pro Tasche auftragen, um ein Überlaufen zu verhindern.

Lauf der Gele:

Es werden die auspolymerisierten Gele mit den Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die kleineren Glasplatten nach innen zeigen. Dann wird der Innenraum zwischen den Gelen mit Kathodenpuffer befüllt bis die Gele mit dem Kathodenpuffer

überschichtet sind (wichtig für die elektrische Leitfähigkeit). Auch hier muss darauf geachtet werden, dass die Gele richtig eingespannt sind und der Kathodenpuffer nicht ausläuft. Achtung der zuvor angesetzten Kathodenpuffer, sowie auch

der Anodenpuffer ist 10-fach konzentriert und wird vor der Verwendung 1:10 verdünnt. Der Außenraum der Kammer wird mit Anodenpuffer je nach Anzahl

der Gele bis zur jeweiligen Markierung aufgefüllt. Dann wird die Elektrophoresekammer verschlossen und mit der Stromquelle verbunden. Über die Stromquelle wird ein konstanter Strom von 20 mA pro Gel eingestellt. Sobald die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht und beginnt aus dem Gel zu laufen, wird der Strom abgestellt (nach ca. 2 Stunden).



Abbildung 3: Innenraum

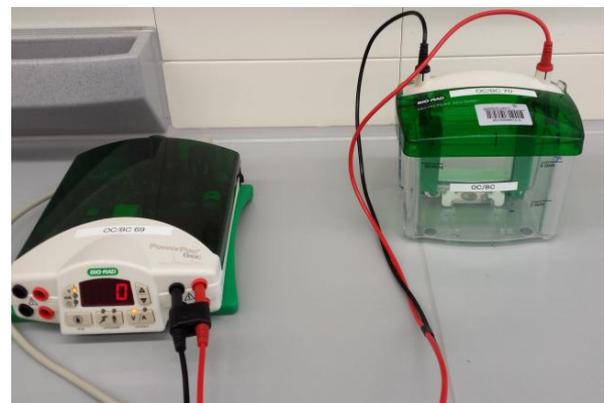


Abbildung 4: Anschluss der Elektrophoresekammer

Fixierung:

Es wird eine Fixierungslösung angesetzt. Dazu werden Borsäure und Glutardialdehyd auf pH = 8,5 eingestellt und mit demineralisiertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Die angesetzte Menge reicht für 2 Gele. Zu beachten ist, dass das Glutardialdehyd erst kurz vor dem Gebrauch dazugegeben wird und nicht lange in der Lösung steht.

7.2.2.1.5 Tabelle 5: Fixierungslösung

Borsäure	12,37 g
Glutardialdehyd	25 ml

Dann werden die Gele vorsichtig aus den Glasplatten befreit und in einer Schale für 30 Minuten mit der Fixierlösung auf dem Kippschüttler geschwenkt.

Daraufhin wird die Fixierungslösung gegen a. dem ausgetauscht, sodass nach der Fixierungslösung 3x für 5 Minuten mit demineralisiertem Wasser gewaschen wird. Die Fixierlösung muss dabei im Halogenfreien Gefahrstoffausguss unter dem Abzug entsorgt werden.

Färbung der Gele: (Silberfärbung)

Die verwendeten Mengen beziehen sich auf zwei Gele in zwei Schalen.

1. Fixierung

Es werden Ethanol und Essigsäure zusammengegeben und mit a. dem auf 250 ml aufgefüllt.

7.2.2.1.6 Tabelle 6: Fixierung

Ethanol	100,00 ml
Essigsäure	12,50 ml

Dann wird die Lösung zu den Gelen gegeben und für 30 Minuten auf dem Kippschüttler geschwenkt. Nach der Verwendung kann die Lösung im Ausguss entsorgt werden.

2. Sensibilisierung

Es werden Ethanol, Natriumthiosulfat und Natriumacetat zusammengegeben und mit a. dem auf 250 ml aufgefüllt. Dann wird anschließend kurz vor Gebrauch Glutardialdehyd dazugegeben.

7.2.2.1.7 Tabelle 7: Sensibilisierung

Ethanol	75,00 ml	
Natriumthiosulfat	10,00 ml	Alternativ: Natriumthiosulfat x 0,78 g 5H ₂ O
Natriumacetat	17,00 g	
Glutardialdehyd	1,25 ml	

In dieser Lösung müssen die Gele ebenfalls 30 Minuten geschwenkt werden. Nach der Verwendung muss die Lösung jedoch im Halogenfreien Gefahrstoffausguss unter dem Abzug entsorgt werden.

3. Waschen

Daraufhin müssen die Gele drei Mal für 10 Minuten in a. dem geschwenkt werden. Das Wasser kann nach Gebrauch in den Ausguss.

4. Silbernitrat

Es wird Silbernitrat mit a. dem auf 250 ml aufgefüllt und kurz vor Gebrauch wird Formaldehyd dazugegeben.

7.2.2.1.8 Tabelle 8: Silbernitrat

Formaldehyd	100,00 µl		
Silbernitrat	3,12 ml	Alternativ: Silbernitrat	0,62 g

Die Silberlösung muss nach dem Gebrauch aufgefangen und speziell entsorgt werden.

5. Waschen

Dann werden die Gele zweimal für je eine Minute mit a. dem gewaschen. Das Wasser kann nach Gebrauch im Ausguss entsorgt werden

6. Entwicklung

Es wird Natriumcarbonat mit a. dem auf 250 ml aufgefüllt und kurz vor Gebrauch wird Formaldehyd dazugegeben. Dann wird die Lösung zu den Gelen gegeben und auf dem Kippschüttler geschwenkt. Die Entwicklung kann zwischen 3 Minuten und 45 Minuten dauern je nach Reaktionsgeschwindigkeit und gewünschter Farbintensität. Ist die Reaktionsgeschwindigkeit sehr hoch muss die Stopplösung aus dem nächsten Schritt bereits angesetzt und rechtzeitig zugegeben werden. Ist die Reaktion langsam können die Lösungen nacheinander auf die Gele gegeben werden.

7.2.2.1.9 Tabelle 9: Entwicklung

Natriumcarbonat	6,26 g
Formaldehyd	100,00 µl

Die Entwicklungslösung muss nach der Verwendung im Halogenfeien Gefahrstoffausguss unter dem Abzug entsorgt werden.

7. Stoppen

Es wird EDTA auf pH = 7 eingestellt und dann mit a. dem auf 250 ml aufgefüllt. Die Stopplösung wird für 10 Minuten zu den Gelen gegeben.

7.2.2.1.10 Tabelle 10: Stoppen

EDTA	3,65 g
------	--------

Die Stopplösung kann nach Gebrauch im Ausguss entsorgt werden.

8. Waschen

Die Gele werden dreimal für 5 Minuten mit a. dem auf dem Kippschüttler gewaschen.

Daraufhin können die Gele in Folie eingeschweißt und eingescannt werden.

Färbung der Gele: (Coomassie-Färbung)

1. Anfärben

Für die Färbelösung wird Rothi-Blue mit Methanol gemischt und mit a. dem auf 250 ml aufgefüllt.

7.2.2.1.11 Tabelle 11: Anfärben

Rothi-Blue 5x	50,00 ml
Methanol oder Ethanol	50,00 ml

Es wird Rothi-Blue-Färbelösung zu den Gelen gegeben. Das Anfärben erfolgt bei 70 rpm auf dem Kippschüttler über Nacht. Bei dem Ansatz mit Methanol ist darauf zu achten, dass dieser nicht in den Ausguss entsorgt werden darf.

2. Entfärben

Das Entfärben erfolgt am nächsten Tag. Dafür wird Ethanol mit a. dem auf 250 ml aufgefüllt.

7.2.2.1.12 Tabelle 12: Entfärben

Ethanol	125,00 ml
Essigsäure	25,00 ml

Die Entfärbelösung wird zu den Gelen gegeben und solange mitgeschwenkt bis die gewünschte Färbung erreicht ist (ca. 30 Min).

Daraufhin können die Gele in Folie eingeschweißt und eingescannt werden.

Auswertung der Gele mit Image Lab:

Die Auswertung der Gele erfolgt mit dem Programm Image Lab (Bio-Rad). Dazu wird zunächst ein neues Protokoll über den Button „New Protocol“ angelegt.

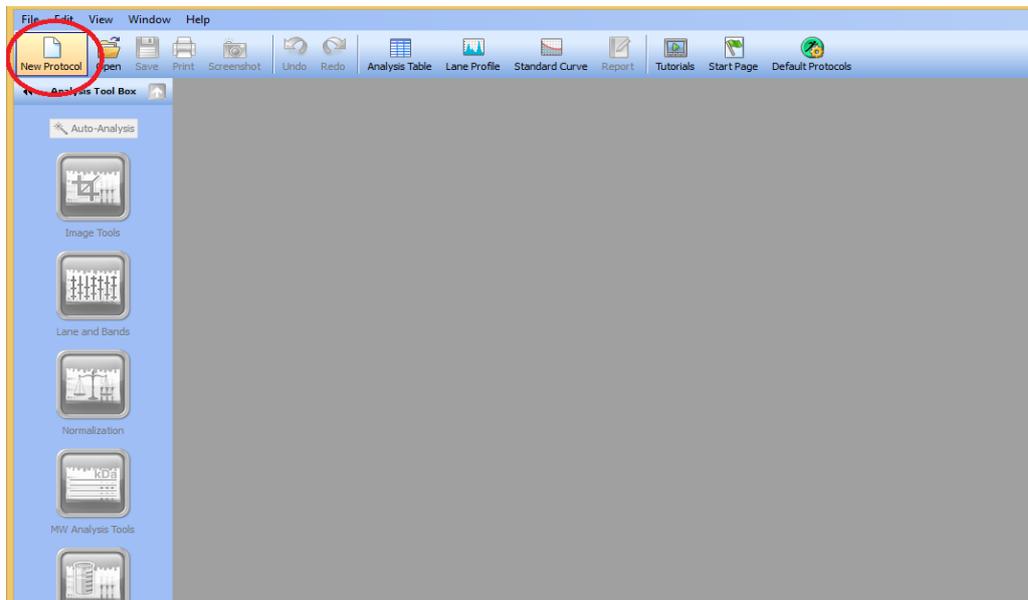


Abbildung 5: Anlegen eines neuen Protokolls mit Image Lab.

Daraufhin erscheint das Protokoll Setup (siehe Abbildung 6), in dem festgelegt wird mit welcher Probensorte und mit welcher Färbemethode gearbeitet wurde. Im folgenden Beispiel wurden Peptide aufgetrennt (1.) und mit der Silberfärbung eingefärbt (2.). Außerdem kann eingestellt werden, ob auf dem Gel starke oder eher schwache Banden erkennbar sind (3.). Dann kann über den Button Run Protocol (4.) das Einscannen des Gels gestartet werden.

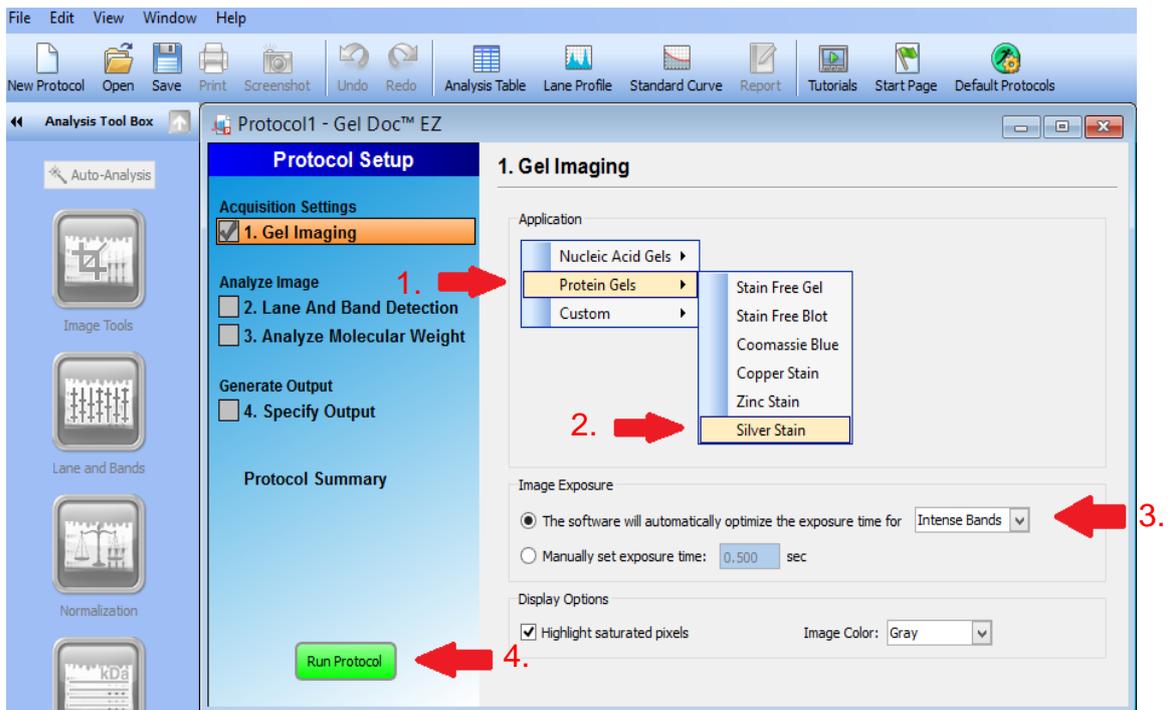


Abbildung 6: Die wichtigsten Einstellungen im Menü „Protocol Setup“.

Nachdem das Gel eingescannt wurde, wird über einen Klick auf den Button Image Tools ein Untermenü geöffnet. Dort kann der Bildausschnitt ausgewählt werden, der für die Auswertung interessant ist.



Abbildung 7: Das Untermenü „Image Tools“.

Dazu wird über den Button „Crop“ in der linken Leiste (siehe Abbildung 8 roter Kreis) das Schneidewerkzeug ausgewählt. Dann wird ein Rahmen um den entsprechenden Bildausschnitt gezogen. Ein Rechtsklick in den Bildausschnitt und einen Linksklick auf den obersten Menüpunkt „Crop“ führt zum Ausschneiden des gewünschten Bildausschnittes.

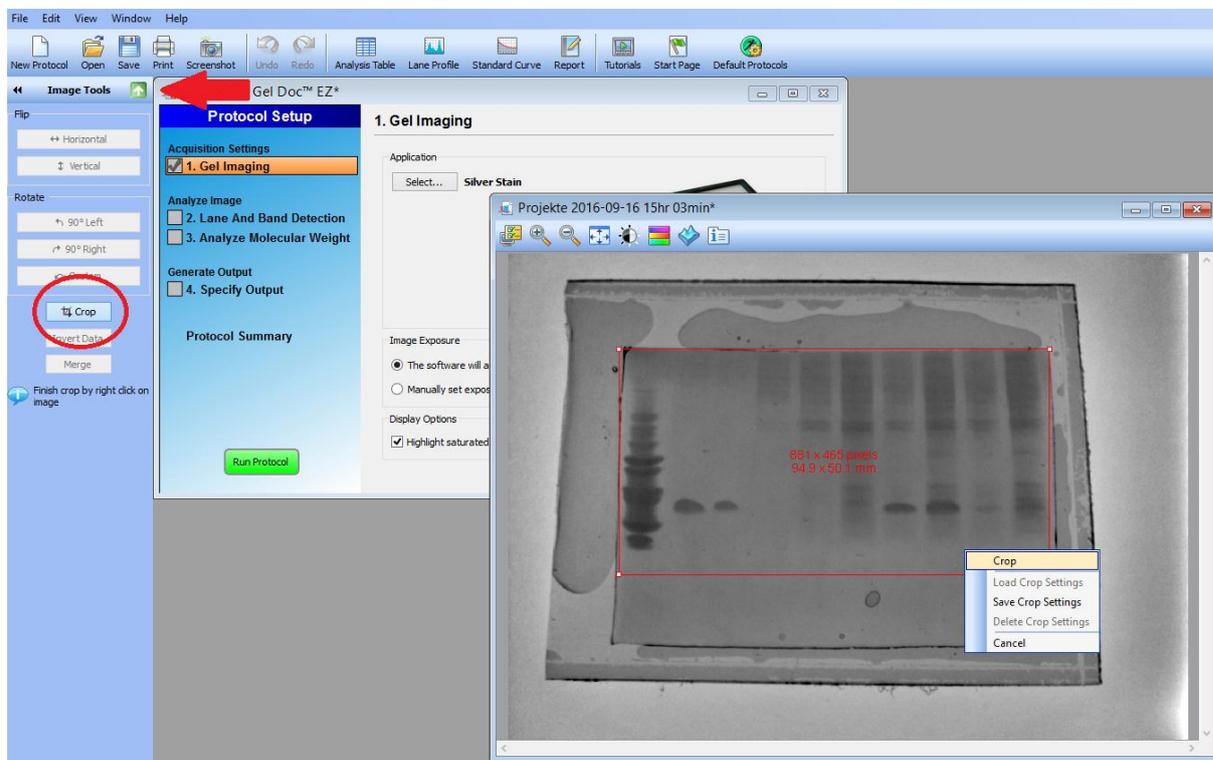


Abbildung 8: Ausschneiden des Bildbereiches.

Über das grüne Symbol mit dem weißen Pfeil gelangt man zurück zu der Hauptmenüleiste (siehe Abbildung 8 roter Pfeil).

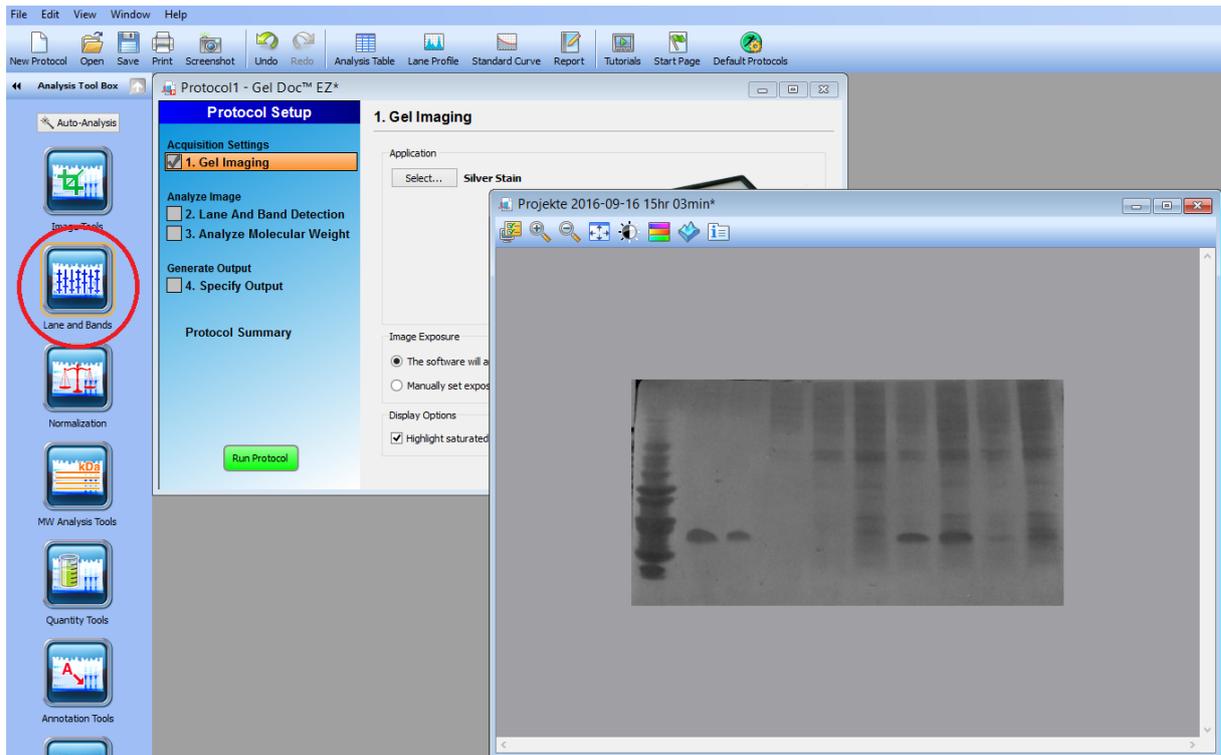


Abbildung 9: Das Untermenü „Lane and Bands“.

Dort gelangt man über den zweiten Menüpunkt „Lane and Bands“ in das nächste Untermenü.

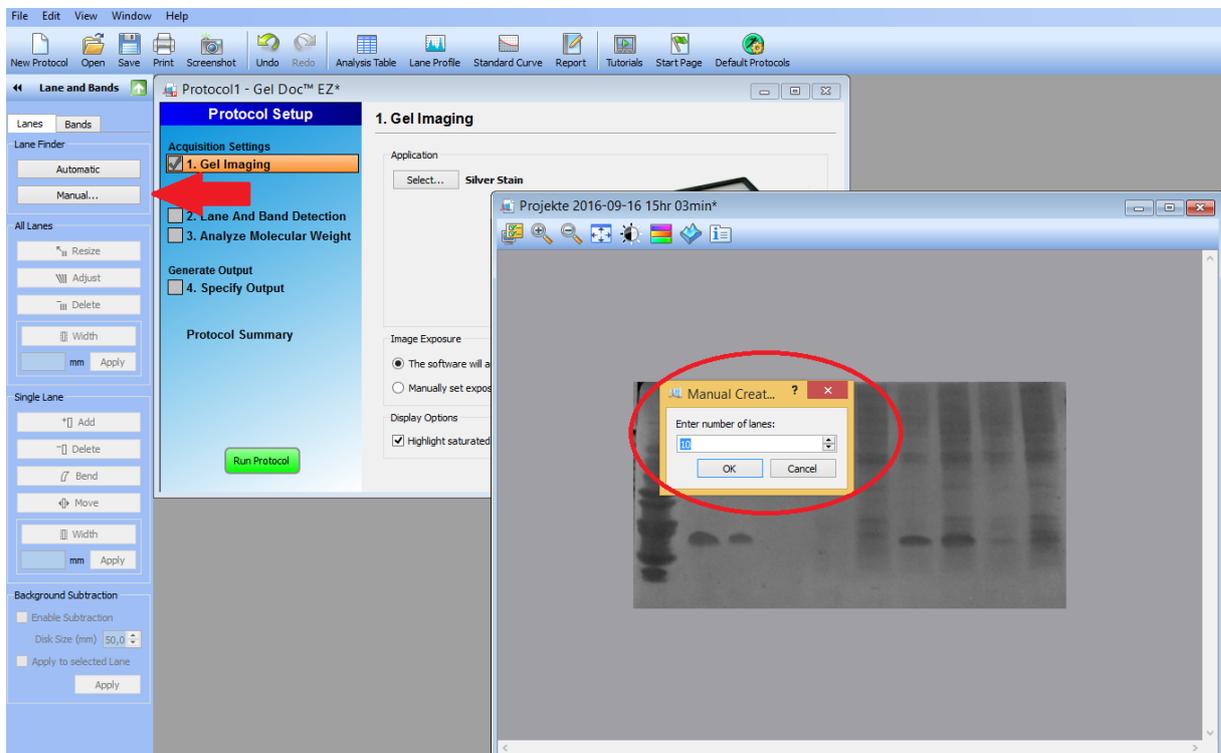


Abbildung 10: Auswahl der Bahnen.

Zunächst wird über einen Klick auf den Button „Manual ...“ ein weiteres Fenster mit dem Namen „Manual Creat...“ aufgerufen. Dort wird dann die Anzahl der Taschen des Gels eingetragen. Daraufhin erscheint für jede Probentasche eine Bahn. Diese Bahnen müssen an die tatsächlichen Laufbahnen der Proben angepasst werden. Grob lassen sich die Bahnen am Rahmen in die richtige Position ziehen.

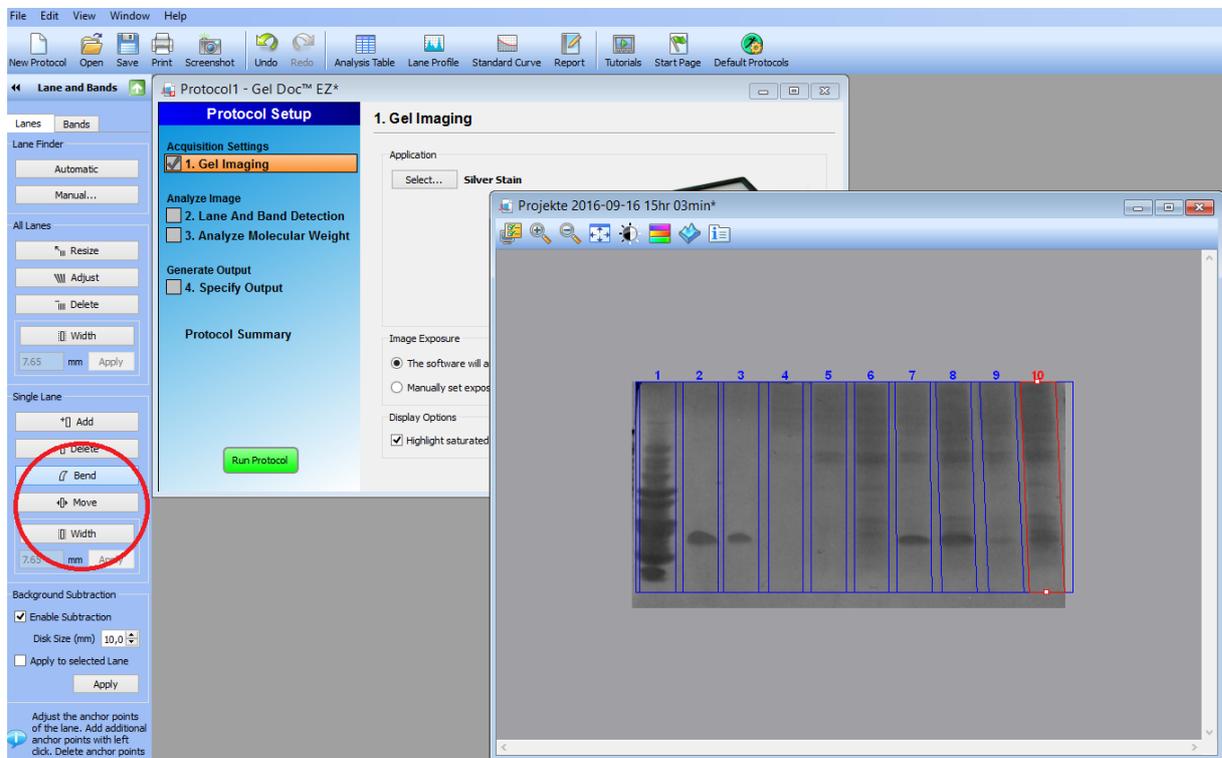


Abbildung 11: Anpassen der Bahnen.

Genauere Anpassungsmöglichkeiten bieten die Buttons „Bend“, „Move“ und „Width“ (siehe Abbildung 11 roter Kreis). Über das Anklicken einer einzelnen Bahn lässt sich diese auswählen. Über den Button „Bend“ lässt sich die Bahn biegen. Dazu muss der weiße Punkt oben oder unten an der ausgewählten Bahn verschoben werden. Über den Button „Move“ lassen sich Bahnen nach links oder rechts verschieben und über den Button „Width“ lässt sich die Breite der Bahn anpassen.

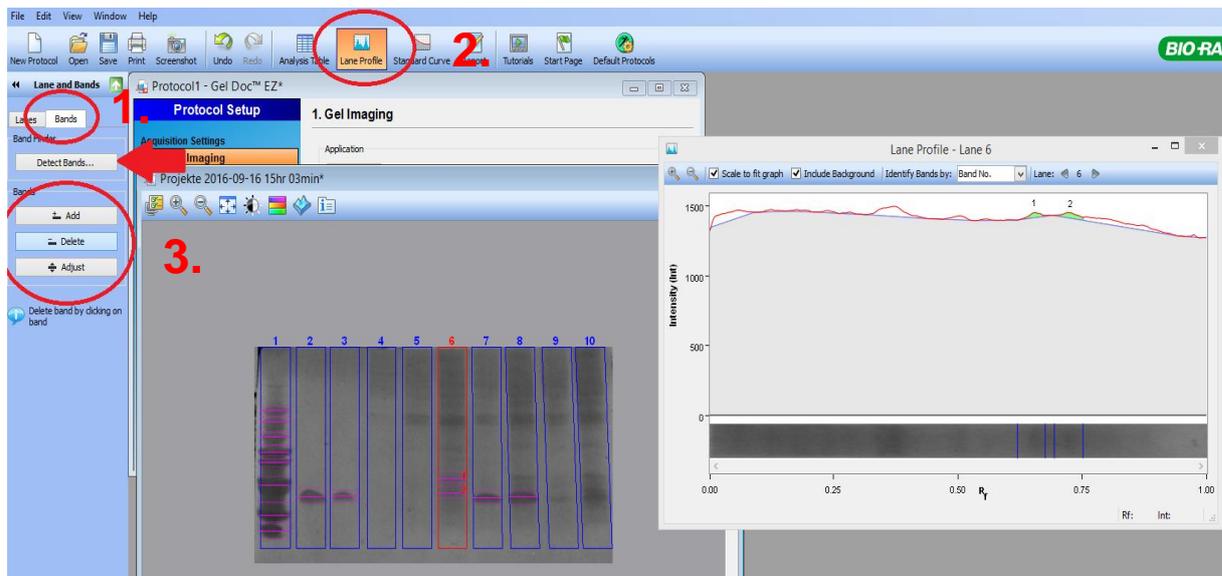


Abbildung 12: Auswahl der Banden.

Über einen Klick auf den Button „Bands“ (1.) gelangt man ins Bandenmenü. Dort lassen sich über den Button „Detect Bands...“ (siehe roter Pfeil) vom Programm automatisch Banden markieren. Allerdings sind diese nicht immer präzise. Daher lassen sich über die Buttons „Add“, „Delete“ und „Adjust“ (3.) die Feinabstimmungen manuell anpassen. Über „Add“ lassen sich weitere Banden platzieren und über „Delete“ lassen sich Banden löschen. Jede Bande wird durch gepunktete Linien begrenzt. Über den Button „Adjust“ lassen sich diese Grenzen verschieben. Eine weitere sehr nützliche Funktion zum Erkennen der Banden bietet das „Lane Profile“ (2.).

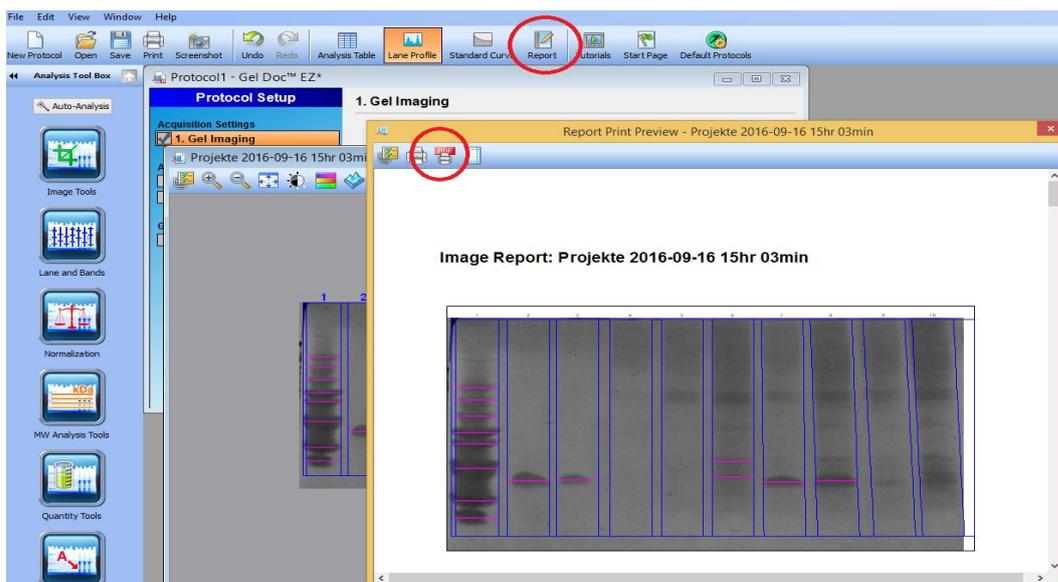


Abbildung 13: Zusammenstellen und speichern der Ergebnisse.

Sind die Banden markiert, so lässt sich über einen Klick auf den Button „Report“ (siehe Abbildung 13 oberer roter Kreis) eine Zusammenstellung der Ergebnisse für jede einzelne Bahn anzeigen. Über einen Klick auf das PDF-Drucker-Symbol lässt sich diese speichern (siehe Abbildung 13 unterer roter Kreis).

Quantitative Auswertung:

Wenn es sich bei der Färbemethode des Gels um die Coomassie-Färbung handelt, dann bietet das Programm im Hauptmenü über den Button „Quantity Tools“ die Möglichkeit das Gel quantitativ auszuwerten. Achtung: Die Silberfärbung ist hingegen nicht quantitativ auswertbar!

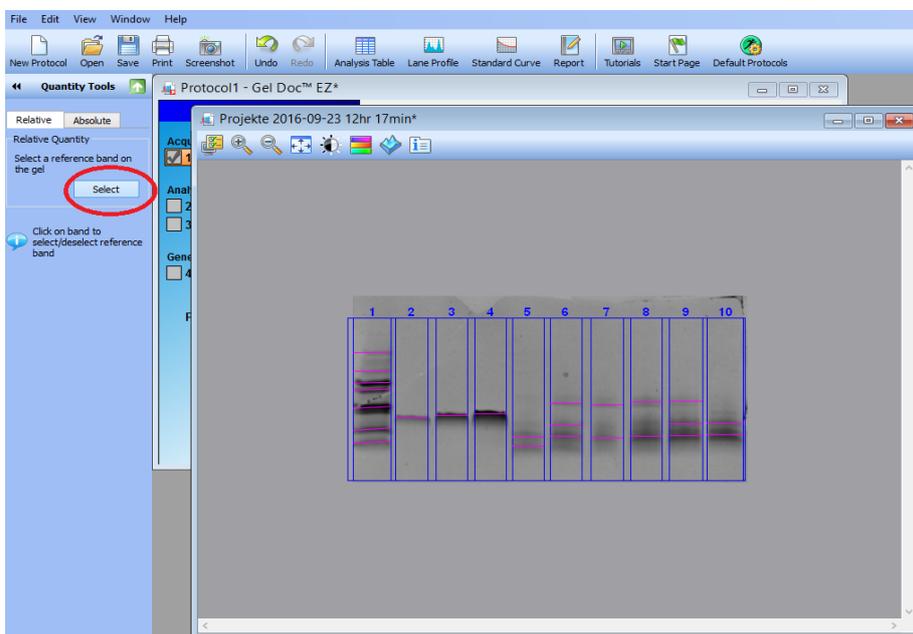


Abbildung 14: Relative Quantifizierung

Über einen Klick auf den Button „Select“ und einen weiteren Klick auf eine Bande der Standards wird die gemessene Farbintensität der ausgewählten Bande auf den Wert 1 gesetzt. Anhand dieser Bande wird die Farbintensität aller weiteren Banden gemessen.

Es empfiehlt sich hierbei eine Bande der aufgetragenen Standards zu wählen. Aus den so ermittelten Werten lässt sich die intern vom Programm ermittelte Kalibriergerade extern nachplotten um die Genauigkeit zu prüfen. Dafür werden die ermittelten Werte gegen die eingesetzten Massen aufgetragen.

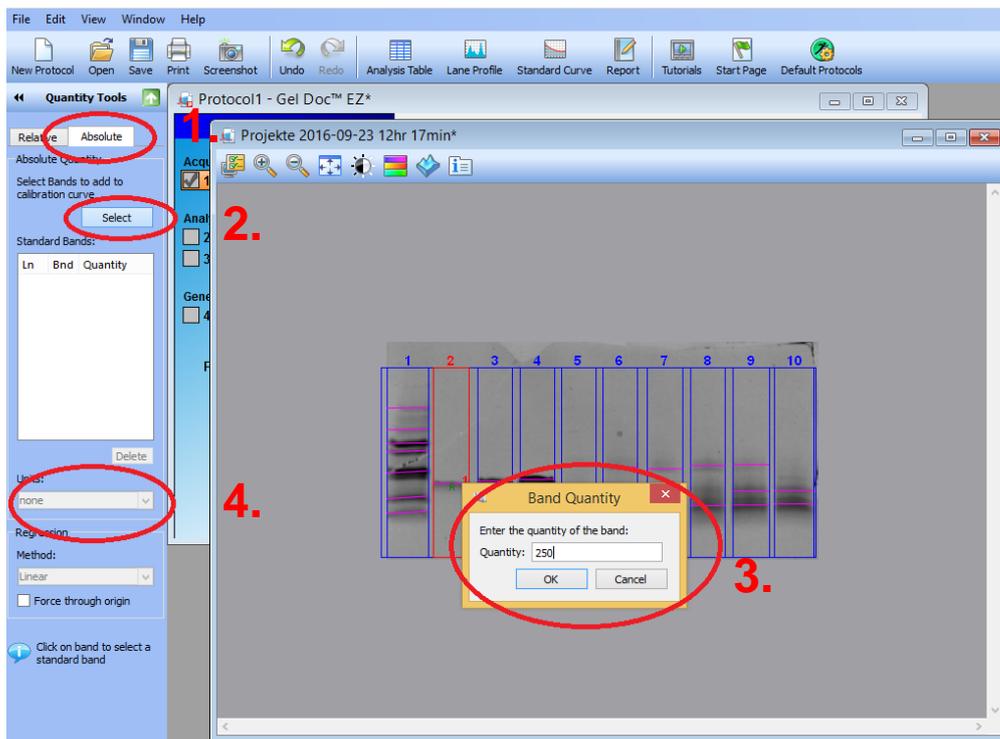


Abbildung 15: Absolute Quantifizierung

Durch einen Klick auf den Reiter „Absolute“ (siehe Abbildung 15 Kreis 1.) gelangt man in das Untermenü für die absolute Quantifizierung. Hier kann genau wie bei der relativen Quantifizierung über „Select“ (2.) die gewünschte Bande ausgewählt werden. Allerdings werden hierbei mindestens zwei Banden mit bekannten Massen benötigt. Nach der Auswahl der Bande erscheint das Fenster „Band Quantity“ (3.), in welches die Masse der Bande eingetragen wird. Wenn die 2 Standardbanden eingetragen sind lässt sich unter dem Stichpunkt „Units“ (siehe Abbildung 15 Kreis 4.) die Einheit der Massen wählen.

Nachdem die Quantifizierung durchgeführt wurde, lässt sich wie bereits zuvor beschrieben über die Reportfunktion eine Zusammenfassung aller Ergebnisse speichern.