

Herausforderungen in der Herstellung, Reinigung und Charakterisierung der humanen α -Defensine 5 und 6

Von der Fakultät für Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Mina Lalli

aus Lauffen a.N.

Hauptberichter: Prof. Dr. B. Hauer

Mitberichter: Prof. Dr. D. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2015

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Herausforderungen in der Herstellung, Reinigung und Charakterisierung der humanen α -Defensine 5 und 6“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach gedruckten oder im Internet verfügbaren Werken entnommen wurden, habe ich durch genaue Quellenangaben kenntlich gemacht.

Esslingen, den 21.08.2015

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit am Institut für Technische Biochemie durchzuführen und mich durch zahlreiche Anregungen und Ratschläge unterstützt hat.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Dieter Wolf für die Übernahme der Zweitkorrektur sowie Herrn Prof. Dr. Joris van Slageren für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Sandra Facey danke ich für die Unterstützung und Ratschläge sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich Sven Richter für sein großes Interesse an diesem Thema, seine Hilfsbereitschaft und die fruchtbaren Diskussionen, die ich in Zusammenarbeit mit ihm genießen durfte und die sehr wertvoll für diese Arbeit waren. Seine Unterstützung in der Durchführung der Fermentationen wie auch in der Proteinaufreinigung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke für die tolle Teamarbeit sowie für die Motivation, den Rückhalt und die schöne, wertvolle gemeinsame Zeit im Labor!

Der Firma Tosoh Bioscience GmbH danke ich sehr für die Bereitstellung der Chromatographiemedien ohne die meine Arbeit vermutlich nicht erfolgreich möglich gewesen wäre. Mein Dank gilt dabei dem gesamten Team des ehemaligen Standorts Stuttgart, heutiger Standort Griesheim. Ganz besonders danke ich Volker Nödinger, der mich sehr oft mit wertvollen Ratschlägen unterstützt hat.

Herrn Dr. Sebastian Leptihn aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim danke für die Unterstützung bei der Durchführung der CD-Spektroskopie.

Herrn Prof. Dr. Peschel und seinem Team des Interfakultären Instituts für Mikrobiologie und Infektionsmedizin Tübingen danke ich für die Unterstützung und Bereitstellung von Bakterienstämmen für die Durchführung der antimikrobiellen Tests.

Darüber hinaus danke ich den Studenten, Silke Bastian und Evdoxia Vargiami, die mich in diesem Projekt ebenfalls unterstützt haben.

Meiner besten Freundin Melanie Melcher, die mich sowohl durch mein gesamtes Chemie-Studium als auch als Kollegin während der Doktorarbeit begleitet hat, danke ich für die tolle Zusammenarbeit und für die schöne Zeit im Labor.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinem Mann Alexander Müller für den Rückhalt und die zahlreichen Ratschläge, die mich bis zum Ende dieser Doktorarbeit getragen haben.

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
µL	Mikroliter
µg	Mikrogramm
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Amp ^r	Ampicillinresistenz
AMP	Antimikrobielle Peptide
AOX	Alkoholoxidase aus <i>Pichia pastoris</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Asparaginsäure
AS	Aminosäure
BFM	Biofeuchtmasse
BMG	Minimalmedium mit Glycerol
BMM	Minimalmedium mit Methanol
BMGY	Komplexmedium mit Glycerol
BMMY	Komplexmedium mit Methanol
BTM	Biotrockenmasse
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CV	<i>Column volume</i>
Cys	Cystein
d	deionisiert
DO	<i>dissolved oxygen</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
f	<i>forward</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
Glu	Glutaminsäure
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HIC	<i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HD5	Humanes α-Defensin 5 (Pro-Form)
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
KPi	Kaliumphosphat-Puffer
konz.	Konzentriert
L	Liter
LDAO	Lauryldimethylamine N-oxide
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Lys	Lysin
M	Molar
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
mA	Milliampere
MBP	<i>Maltose-binding protein</i>
mDeg	Milligrad, <i>millidegrees</i>
mg	Milligramm
mHD5	Humanes α -Defensin 5 (<i>mature-Form</i>)
mHD6	Humanes α -Defensin 6 (<i>mature-Form</i>)
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaOAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerisation domain</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
o.g.	oben genannt
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
Pro-HD5	Unprozessierte Pro-Form des humanen α -Defensins 5
Pro-HD6	Unprozessierte Pro-Form des humanen α -Defensins 6
<i>pO</i> ₂	Sauerstoffpartialdruck
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F	Peptid-N-Glycosidase aus <i>Flavobacterium meningosepticum</i>
r	<i>Reverse</i>
rmHD5	rekombinantes mHD5
rmHD6	rekombinantes mHD6
RT	Raumtemperatur
RP	<i>Reversed Phase</i>
U/min	Umdrehung pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat

<i>S. carnosus</i>	<i>Staphylococcus carnosus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
TB	<i>Terrific broth</i>
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units
üN	Übernacht
vvm	<i>v</i> olume <i>a</i> ir <i>p</i> er <i>v</i> olume <i>m</i> edium <i>a</i> nd <i>m</i> inute
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
Zeo	Zeocin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Vorkommen antimikrobieller Peptide	1
1.2	Defensine	2
1.2.1	α -Defensine	3
1.2.2	β -Defensine	4
1.3	Posttranslationale Prozessierung.....	5
1.4	Biofunktionelle Aktivität von antimikrobiellen Peptiden.....	7
1.4.1	Wirkungsspektrum der humanen α -Defensine 5 und 6.....	8
1.5	Wirkmechanismus der Defensine.....	11
1.6	Biologische Bedeutung eines Defensinmangels.....	15
1.6.1	Defensine in gastrointestinalen Erkrankungen.....	15
1.7	Alternativen zu herkömmlichen Antibiotika – Das Potential von und der Bedarf an antimikrobiellen Peptiden.....	17
1.7.1	Herstellung rekombinanter Defensine.....	17
1.8	Ziel der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material.....	23

2.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	23
2.1.2	Kits.....	24
2.1.3	Plasmide	24
2.1.4	Bakterien- und Hefestämme.....	25
2.1.5	Oligonukleotide.....	26
2.1.6	Standards.....	27
2.1.7	Antikörper.....	28
2.1.8	Puffer.....	29
2.1.9	Medien zur Kultivierung	32
2.2	Methoden	35
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	35
2.2.2	Stammhaltung	42
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	43
2.2.4	Proteinbiochemische Charakterisierung.....	55
3	Ergebnisse	62
3.1	Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 in <i>E. coli</i>	62
3.1.1	Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 über Thioredoxin-Fusionsproteine.....	62
3.1.2	Klonierung der Thioredoxin-Konstrukte für die Expression in <i>E. coli</i>	63

3.1.3	Expression der Fusionsproteine.....	68
3.1.4	Proteolytischer Verdau des trxA-His-mHD5.....	74
3.1.5	Isolierung des P-W-mHD6.....	81
3.1.6	Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 in <i>E. coli</i> über Tandem-Proteine.....	82
3.1.7	Klonierung der Tandem-Konstrukte und Untersuchung der Expression in <i>E. coli</i>	82
3.1.8	Fermentation des mHD5-Tetramers in <i>E. coli</i>	85
3.1.9	Verdau des mHD5-Tetramers mit Ameisensäure.....	89
3.2	Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 in <i>P. pastoris</i>	95
3.2.1	Plasmidkonstrukte zur Herstellung der Defensine in <i>P. pastoris</i>	95
3.2.2	Untersuchung der Prozessparameter der Fed-Batch-Fermentation von mHD5 in <i>P. pastoris</i> im 5 L-Maßstab.....	97
3.2.2.3	<i>Produktion des rekombinanten humanen α-Defensins 5 im 25 L-Maßstab</i>	106
3.2.3	Untersuchung möglicher Strategien zur Vermeidung der Fehlprozessierung.....	122
3.2.4	Antimikrobielle Aktivität des rmHD5.....	138
3.2.5	Fed-Batch-Fermentation von mHD6 in <i>P. pastoris</i>	145
3.2.5.4	<i>Aufreinigung des rmHD6 über Kationenaustauschchromatographie</i>	152
3.2.5.5	<i>Charakterisierung des humanen α-Defensins 6</i>	155
4	Diskussion.....	158

4.1	Rekombinante Produktion der humanen α -Defensine 5 und 6 in <i>E. coli</i>	159
4.1.1	Herstellung von mHD5 und mHD6 über Fusionsproteine	160
4.1.2	Herstellung von mHD5 und mHD6 über Tandem-Proteine	171
4.2	Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 in <i>P. pastoris</i>	176
4.2.1	Herausforderungen in der Expression der humanen α -Defensine 5 und 6 unter Einsatz des Expressionswirts <i>P. pastoris</i>	176
4.2.2	Herausforderungen in der Reinigung und in der Isolierung der korrekt prozessierten Defensine rmHD5 und rmHD6	181
4.2.3	Herausforderungen in der Analytik.....	186
4.2.4	Antimikrobielle Aktivität des rmHD5 und fehlprozessierter Formen.....	187
4.3	Herausforderungen in der rekombinanten Herstellung von mHD5 und mHD6 und Einordnung der Ausbeuten	190
4.4	Ausblick.....	195
5	Zusammenfassung.....	197
	Summary.....	199
6	Appendix	201
6.1	Sequenzen.....	201
6.1.1	Nukleotidsequenz des Pro-Defensins 5 (HD5)	201
6.1.2	Nukleotidsequenz des humanen α -Defensins 5 (mHD5)	201
6.1.3	Nukleotidsequenz des humanen α -Defensins 6 (mHD6)	201

6.1.4	Nukleotidsequenz von Thioredoxin (trxA).....	202
6.2	Massenspektrogramme der Referenzen HD5 und HD6.....	203
7	Abbildungsverzeichnis	204
8	Literaturverzeichnis	211

1 Einleitung

Der Bedarf an neuen Antibiotika zur Bekämpfung bakterieller Infektionen wächst angesichts der stetigen Zunahme Antibiotika-resistenter Bakterien kontinuierlich. Bedingt durch den oft übermäßigen bzw. unsachgemäßen Gebrauch zeigen viele Antibiotika keine Wirkung mehr gegen pathogene Keime. Seit geraumer Zeit befassen sich viele Forschungsgruppen mit der gezielten Entwicklung neuer antibiotisch wirkender Stoffe. Die in der Natur vorkommenden antimikrobiellen Peptide rücken hierbei, aufgrund ihres multifunktionellen Wirkungsspektrums gegenüber Bakterien, Pilze und Viren, immer mehr in den Fokus der Entwicklung und werden als mögliche Alternative zu herkömmlichen Antibiotika untersucht. Im selben Maße interessant erscheinen die Zusammenhänge zwischen den identifizierten körpereigenen Antibiotika und einiger Krankheitsbilder, deren Ursache bis heute nicht vollständig geklärt ist.

Antimikrobielle Peptide wie z.B. humane Defensine werden vor allem in jenen Stellen im Körper produziert, die einer Vielzahl an Mikroorganismen ausgesetzt sind. Von solchen antimikrobiellen Peptiden ist bekannt, dass sie als Teil des angeborenen Immunsystems als schnelle und effektive Abwehrsubstanzen wirken und in der Abwehr gegen Bakterien einen entscheidenden Platz einnehmen. Eine effiziente und kostengünstige Herstellung solcher antimikrobieller Peptide in relevanten Maßstäben würde so ermöglichen diese Peptide für deren vollständige Untersuchung und Entwicklung zugänglich zu machen.

1.1 Vorkommen antimikrobieller Peptide

Antimikrobielle Peptide gehören zum angeborenen Immunsystem und haben als natürliche „körpereigene Antibiotika“^[1] eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen Pathogene.^[2] Sie sind in der Natur weit verbreitet und finden sich sowohl in Pflanzen, Bakterien und Insekten als auch in wirbellosen Tieren und Wirbeltieren.^[2-4] Als Teil des angeborenen Immunsystems sind antimikrobielle Peptide bei der schnellen und direkten Bekämpfung (Primärabwehr) von Mikroben und dem Schutz vor deren Invasion beteiligt.^[5, 6] Daher finden sich antimikrobielle Peptide besonders an jenen Stellen, die eine Kontaktfläche zur Umwelt darstellen und somit einer Vielzahl verschiedener Mikroben ausgesetzt sind, wieder.^[3] Im Gegensatz zu wirbellosen Tiere verfügen höhere Wirbeltiere über ein weiteres

Einleitung

Abwehrsystem, dem adaptiven Immunsystem.^[5] Hier haben diese Peptide neben ihren antimikrobiellen Eigenschaften ebenso essentielle immunregulatorische Aufgaben.^[5]

Die meisten antimikrobiellen Peptide weisen einen kationischen, amphiphatischen Charakter auf und bilden in einer membranähnlichen Umgebung eine α -helicale oder β -Faltblattstruktur.^[1, 5] Anhand ihrer dreidimensionalen Sekundärstruktur lassen sie sich in drei Klassen einteilen: (a) lineare α -helicale Peptide (Cathelicidine), (b) durch Ausbildung von Disulfidbrücken gebildete β -Faltblatt Peptide (Defensine) und cyclische Peptide (Bactenecine).^[6, 7] Die Synthese dieser antibiotisch wirkenden Peptide erfolgt in der Natur konstitutiv oder induziert und kann z.B. durch Zytokine oder bakterielle Stimulierung kontrolliert sein.^[3, 5]

1.2 **Defensine**

Eine der wichtigsten Untergruppen der antimikrobiellen Peptide sind die Defensine, die bei uns Menschen z.B. in der Haut, im Blut und in Schleimhautzellen der Atemwege, Harnwege und des Gastrointestinaltrakts vorkommen.^[8] Sie werden in verschiedenen Epithelzellen und Leukozyten gefunden wo sie, bedingt durch ihre multifunktionellen Aktivitäten (antimikrobielle, chemotaktische, regulatorische), eine essentielle Rolle für unser Immunsystem spielen.^[6]

Defensine sind kleine, kationische Peptide mit einem Molekulargewicht von 3,5 kDa bis 4,5 kDa.^[6, 7, 9] Sie zeigen eine β -Faltblattstruktur mit amphiphatischen Charakter und sind arginin- und cysteinreich.^[7, 10, 11] Über ihre sechs konservierten Cysteine bilden Defensine intramolekular drei charakteristische Disulfidbrücken aus, die für ihre antimikrobielle und zytotoxische Funktionen essentiell sind.^[1] Sie werden, abhängig von der räumlichen Anordnung ihrer Disulfidbrücken und ihrer Struktur, in drei Klassen eingeteilt: α -Defensine, β -Defensine und θ -Defensine.^[1, 7, 12, 13] Im Gegensatz zu den α - und β -Defensinen sind die θ -Defensine nur in nicht-menschlichen Primaten zu finden.^[6] Die beiden Hauptklassen der Defensine, die α -Defensine und β -Defensine, unterscheiden sich lediglich in der Anordnung der ausgebildeten Disulfidbrücken.^[6]

1.2.1 α -Defensine

Die humanen α -Defensine werden in die humanen neutrophilen Peptide (HNP-1-4) und die Panethzell-Defensine (HD5 und HD6) unterteilt. HNP-1-4 finden sich vor allem in den azurophilen Granulen der neutrophilen Granulozyten, wo sie 5-7% des Gesamtproteinanteils ausmachen.^[14] Die humanen α -Defensine 5 und 6 dagegen werden hauptsächlich durch die Paneth-Zellen am Grund der Lieberkühn-Krypten des Dünndarms sowie durch metaplastische Paneth-Zellen exprimiert.^[15-17] HD5 wurde darüber hinaus im weiblichen reproduktiven Genitaltrakt^[1, 18, 19] wie auch in nasalen und bronchialen Epithelzellen^[20] nachgewiesen.

Die humanen α -Defensine bestehen aus 29-35 Aminosäuren und zeigen eine charakteristische β -Faltblattstruktur, die durch drei Disulfidbrücken intramolekular stabilisiert wird.^[7] Die sechs konservierten Cysteine sind dabei über folgendes Verknüpfungsmuster miteinander verbunden: C1-C6, C2-C4, C3-C5 (Abbildung 1.1).^[7, 14]

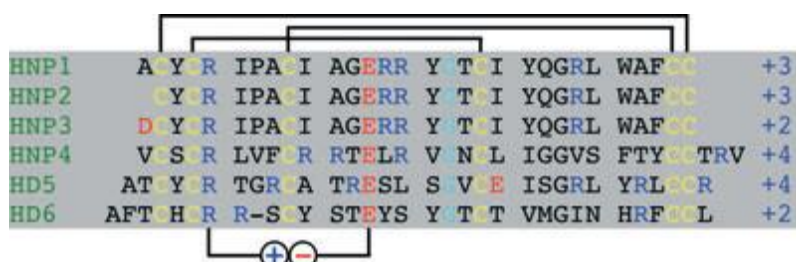


Abbildung 1.1 Aminosäuresequenz der humanen α -Defensine.

Die Cystein-Gruppen sind gelb dargestellt und die Verknüpfungen der einzelnen Cysteine sind gekennzeichnet (1-6, 2-4, 3-5). Die konservierte Salzbrücke zwischen Arg5 und Glu13 ist ebenfalls in der Abbildung dargestellt. Die Nummerierung erfolgt anhand der Aminosäuresequenz des HNP-1. Positiv geladene Aminosäure-Reste (Arginin) sind blau, anionische Aminosäuren (Asparagin- und Glutaminsäure) in rot und Glycin in türkis dargestellt. Abbildung übernommen aus Lehrer *et al.* (2012).^[13]

Darüber hinaus zeigen alle α -Defensine eine konservierte Salzbrücke zwischen den Aminosäuren Arg5 und Glu13, welche eine essentielle Bedeutung für die Stabilität des reifen Defensins während der Biosynthese hat.^[13, 21] Eine Destabilisierung der elektrostatischen Interaktion zwischen Arg5 und Glu13 führt zu einer Degradierung *in vitro*.^[22] α -Defensine kristallisieren außerdem in einer Dimer-Struktur, die durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird.^[23]

Einleitung

Strukturuntersuchungen an HD5 haben gezeigt, dass die Oligomerisierung von HD5 sowohl von der Konzentration als auch vom pH-Wert abhängig ist.^[24, 25] Während HD5 im sauren Bereich (pH 2,0) zur Dimerisierung neigt, multimerisiert es im neutralen Bereich (pH 7,0) zum Tetramer.^[24] Die Ausbildung von Oligomeren ist weiter durch die Hydrophobizität beeinflusst.^[26] Diese Multimerisierung ist eine wichtige Eigenschaft für die Aktivität von HD5 und auch HD6.^[13, 27]

In der Reihe der α -Defensine nimmt HD6 eine besondere Stellung ein. Die HD6-Dimere werden durch eine weitere Dimerisierung stabilisiert. Diese stabilisierten HD6-Tetramere bilden eine sich wiederholende Abfolge resultierend in einer verlängerten HD6-Struktur aus Tetrameren.^[28]

Sowohl Ladungseigenschaften, Hydrophobizität als auch das Vorhandensein konservierter Disulfid- und Salzbrücken spielen für die Stabilität, Bindungseigenschaften und Bioaktivität der Defensine eine wichtige und zum Teil gegenläufige Rolle. Während z.B. eine Reduktion der Disulfidbrücken von HNP-1 oder HD5 eine antibakterielle Aktivität schwächt führt sie im Fall von HD6 zur Ausbildung von antibakterieller Aktivität, die im oxidierten Zustand nicht vorhanden ist.^[13, 28-31]

1.2.2 β -Defensine

Die humanen β -Defensine sind zwischen 36-42 Aminosäuren lange, antimikrobielle Peptide und werden im Menschen überwiegend in den epithelialen Oberflächen wie Haut, Lunge, Intestinal- und Urogenital-Trakt exprimiert.^[6] Im Gegensatz zu α -Defensinen zeigen β -Defensine eine Verknüpfung der Cysteine an den Positionen C1-C5, C2-C4 und C3-C6. Sie besitzen ebenfalls ein breites antimikrobielles Spektrum gegen Mikroorganismen und können konstitutiv oder induziert exprimiert werden.^[32] So wird das humane β -Defensin-1 (hBD-1) z.B. in Epithelzellen des Pankreas, Urogenitaltrakts und des Dünndarms konstitutiv exprimiert^[14], während das humane Defensin hBD-2 in einer gesunden Dünndarmschleimhaut kaum beobachtet wird aber im Falle einer Entzündungsreaktion stark hochreguliert ist.^[33]

1.3 Posttranslationale Prozessierung

Defensine verfügen über ein weites antibiotisch wirkendes Spektrum und zeigen darüber hinaus ebenso zytotoxische Eigenschaften. Dazu hat die Natur zum Schutz des Wirts einen Mechanismus entwickelt, der über die Synthese eines zunächst relativ großen, inaktiven Precursor-Molekül verfügt.^[7] Dieses primäre Translationsprodukt, typischerweise bestehend aus 64-100 Aminosäuren (Prepro-Form), setzt sich aus drei Segmenten zusammen: (a) der N-terminalen Signal-Sequenz von 19 Aminosäuren (Signal-Peptid), (b) dem 40-45 Aminosäuren langen anionischen Prosegment (Pro-Peptid) und (c) einem Carboxyl-terminalen kationischen Peptid, dem sogenannten *mature*-Defensin (mHD5) (Abbildung 1.2).^[7, 34, 35] α -Defensine zeigen mit 40-45 Aminosäuren ein weit größeres Prosegment auf als β -Defensine. Zur Erlangung ihrer funktionellen Bioaktivität (*mature*-Peptid) muss die Pre- und Prosequenz abgespalten werden und die Ausbildung posttranslationaler Modifikationen erfolgen.^[6]

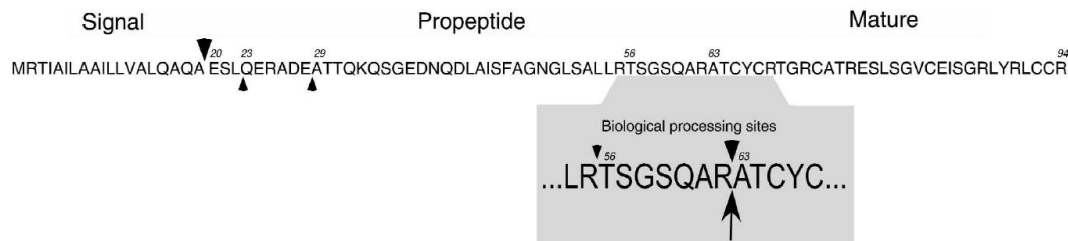


Abbildung 1.2 Aminosäuresequenz des HD5 (Prepro-Form).

Die cDNA-Sequenz codiert für die Prepro-Form des HD5 und beinhaltet eine Signalsequenz (19 AS), ein Pro-Peptid (43 AS) und das *mature*-Peptid (32 AS). Die Schnittstellen des Trypsins der Hauptisomere des Pro-Peptids HD5 und des *mature*-Peptids HD5 sind durch die vergrößerten Pfeile dargestellt. Die ebenfalls, aber weniger vorkommenden Isoformen werden durch die kleinen Pfeile gekennzeichnet. Das reife, stabile mHD5 (63-94) wird nach Proteolyse an der Schnittstelle 63 gebildet. Abbildung übernommen aus Ghosh *et al.* (2002).^[36]

Zunächst erfolgt die Abspaltung der hydrophoben Signalsequenz, die für den Transport in das endoplasmatische Retikulum notwendig ist.^[6, 7] Das am *mature*-Defensin verbleibende anionische Prosegment spielt eine kritische Rolle für die korrekte Faltung und Aktivität des Zilopeptids. Durch die Ausbildung eines Pro-Defensins wird durch das anionische Prosegment die Aktivität des kationischen Peptids unterbunden und das Peptid in einem

Einleitung

inaktiven Zustand gehalten. Das anionische Prosegment dient dabei als intramolekularer Inhibitor während des Transports oder der Lagerung.^[34]

Die Sequenz des Pro-Peptids hat außerdem einen entscheidenden Einfluss auf die Neutralisation, Prozessierung und Faltung des Peptids.^[35, 37] Erst nach weiterer posttranslationaler Prozessierung und Abspaltung des Prosegments erfolgt die Freisetzung des reifen, kationischen und bioaktiven Peptids.^[38]

Der Verlauf der Prozessierung ist innerhalb der Defensinklassen verschieden. Während die vier neutrophilen Defensine HNP-1-4 intrazellulär prozessiert und als reife kationische Peptide (*mature-Form*) in den Granulen der Neutrophilen gespeichert werden, werden die beiden intestinalen Panethzell-Defensine HD5 und HD6 ausschließlich als Precursor-Moleküle in den sekretorischen Granulen der Paneth-Zellen gespeichert.^[39] Die Prozessierung zum reifen, aktiven Peptid erfolgt während und/oder nach der Sekretion.^[34, 39-42] Nach bakterieller Stimulierung der Paneth-Zellen, werden die Granulen in das Dünndarmlumen freigesetzt und das proteolytisch gespaltene Pro-HD5 wird freigesetzt (Abbildung 1.3).^[43]

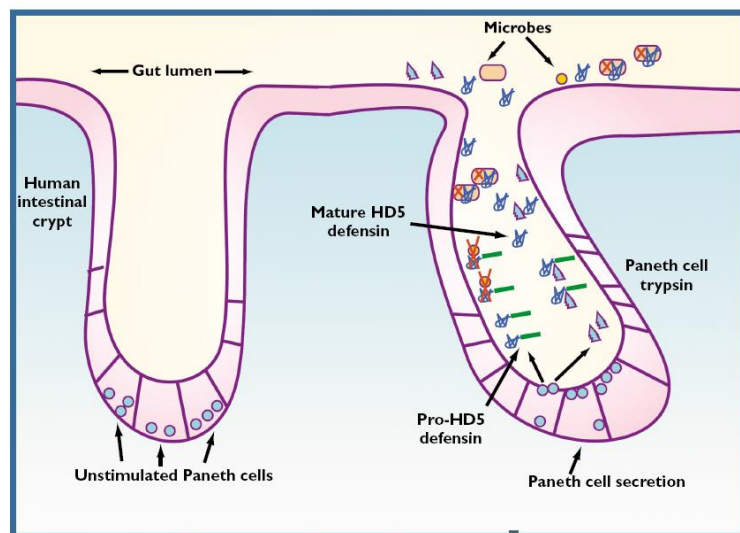


Abbildung 1.3 Prozessierung und Sekretion des humanen Panethzell-Defensins HD5.

Dargestellt sind zwei intestinale Krypten. Links ist die Lagerung des Pro-HD5 mit dem co-lokalisierten Trypsinogen in den Granulen der Lieberkühn Krypten dargestellt. Nach bakterieller Stimulierung erfolgt die Exozytose in das Lumen und Proteolyse des sekretierten Pro-HD5 zum *mature*-HD5 (mHD5) mittels Trypsin. Abbildung übernommen aus Zasloff *et al.* (2002).^[44]

Für die proteolytische Spaltung der intestinalen humanen Defensine dient die Serinprotease Trypsin. Diese wird als inaktives Trypsinogen in den Paneth-Zellen exprimiert und colokalisiert.^[36, 39] Die Aktivierung des Trypsins selbst erfolgt wie HD5 erst während oder nach der Sekretion. Dies unterstreicht den streng kontrollierten Prozess und die Ausbildung der Aktivität des Defensins.

Erst durch die bakterielle Stimulierung erfolgt die Freisetzung der Defensine aus den Granulen in das kryptische Lumen.^[36, 45] Dabei kommt es zur enzymatischen Abspaltung an Arg62 des HD5 innerhalb des 43 Aminosäuren langen Pro-Peptids, während im Falle des HD6 die Abspaltung an Arg68 erfolgt.^[36, 46] Für das Defensin HD5 konnten unterschiedlich N-terminal prozessierte Formen mit Hauptisomeren mit einer Länge von 32 und 39 Aminosäuren (3,6 und 4,2 kDa) nachgewiesen werden, während HD6 überwiegend aus 32 Aminosäuren besteht (3,6 kDa).^[33, 37, 39] Im Urin der künstlichen Harnblase wurde auch eine verkürzte Form des HD6 gefunden.^[39]

1.4 Biofunktionelle Aktivität von antimikrobiellen Peptiden

Antimikrobielle Peptide und Defensine weisen *in vitro* ein breites Aktivitätsspektrum auf und besitzen die Fähigkeit sowohl Gram-negative und Gram-positive Bakterien als auch Pilze und umhüllte Viren mit einer minimalen Inhibierungskonzentration von 0,1-100 µg/mL zu inaktivieren.^[2, 7, 47, 48] Abhängig vom jeweiligen Peptid können aber auch toxische Eigenschaften gegenüber Exo- und Endoparasiten beobachtet werden.^[2] So zeigen die humanen Defensine HD5, HNP-1 und hBD-3 eine Aktivität gegenüber z.B. *Toxoplasma gondii*.^[49] Antimikrobielle Peptide und Defensine zeigen gegenüber Gram-positiven Bakterien eine höhere Aktivität als gegenüber Gram-negative Bakterien^[5, 41], wobei dies für die β -Defensine 1-4 nicht beobachtet werden kann. Für diese konnte dagegen eine bessere Aktivität gegenüber Gram-negative Bakterien nachgewiesen werden.^[6, 9, 50]

Interessanterweise zeigen diese Peptide neben ihren antimikrobiellen Eigenschaften ebenfalls antikanzerogene, zytotoxische und chemotaktische Eigenschaften auf Immunzellen und beeinflussen somit sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem.^[2, 3, 6, 43, 51] Die Stärke der Aktivität antimikrobieller Peptide ist zeit- und konzentrationsabhängig und von Peptid zu Peptid durchaus verschieden.^[6] So zeigen z.B. die, in ihrer Sequenz sehr ähnlichen humanen α -Defensine 1-4 (HNP-1-4) gegenüber *Staphylococcus aureus*

Einleitung

unterschiedlich starke Aktivitäten: HNP-2 > HNP-1 > HNP-3 > HNP-4.^[6, 52] Gegenüber den Bakterien *Escherichia coli* und *Enterobacter aerogenes* wiederum zeigt sich HNP-4 als das stärkste Defensin.

Die Aktivität der α - und β -Defensine kann durch erhöhte Salzkonzentrationen oder divalente Kationen geschwächt oder sogar vollständig inhibiert werden.^[9] Das Ausmaß der Inaktivierung der Biofunktionalität ist dabei von Peptid und dem Pathogen abhängig. Antivirale Effekte werden im Gegensatz dazu durch Salzkonzentrationen nicht beeinflusst.^[9] Unter den β -Defensinen, die eine ausgeprägte antifungale Aktivität aufweisen^[6], zeigt sich z.B. hBD-3 in seiner Aktivität gegenüber *Candida albicans* weniger sensitiv gegenüber hohen Salzkonzentrationen als die Defensine hBD-1-2 und hBD-4.^[53] Für die antimikrobielle Aktivität scheinen neben der Nettoladung auch die Ladungsverteilung und die Eigenschaft zur Ausbildung von Oligomeren^[6, 54-56] eine Rolle zu spielen. Niedrige pH-Werte können die Aktivität von Defensinen ebenfalls beeinflussen.^[1, 6, 41, 57] Aufgrund der abgeschwächten Aktivität von α - und β -Defensinen *in vitro* unter physiologischen Salzbedingungen (150 mM) scheint der direkte antimikrobielle Angriff *in vivo* an der Oberfläche von Haut und Schleimhaut und in den Vakuolen der Phagozyten stattzufinden, hier ist die Ionenstärke entsprechend gering.^[58]

1.4.1 Wirkungsspektrum der humanen α -Defensine 5 und 6

Das humane α -Defensin 5 zeigt *in vitro* bereits bei niedrigen Konzentrationen ein weites antimikrobielles Spektrum gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien und Pilzen und konnte z.B. gegen *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, sowie gegen einige klinische Pathogene als aktiv getestet werden.^[23, 41, 59, 60] Die vollständige Inhibierung von Bakterien, abhängig vom Stamm, erfolgt bereits bei Konzentrationen von 1 $\mu\text{g/mL}$.^[23] Die Aktivität des HD5 kann ähnlich wie die der HNP-1 und HNP-3 durch Anwesenheit von Salz verringert bzw. inhibiert werden.^[41] Die Stärke des Einflusses ist dabei abhängig vom Stamm. Shimoda *et al.* konnten über Transmissionselektronen-Mikroskopie eine strukturelle Änderungen von *Staphylococcus aureus* beobachten, die für 2 h mit 600 $\mu\text{g/mL}$ HD5 behandelt wurden. In Anwesenheit von

Einleitung

140 mM NaCl konnten diese strukturelle Änderungen an *Staphylococcus aureus* sogar vollständig unterbunden werden.^[61]

Die Nettoladung des HD5 ändert sich in einem pH-Bereich von pH 5,5 bis 8,5 nicht und zeigt nur einen geringen Einfluss auf die Aktivität.^[41] HD5 zeigt wie die übrigen fünf humanen α -Defensine antivirale Aktivität gegen *Herpes Simplex Viren* (HSV).^[6, 62] Darüber hinaus konnten weitere antivirale Eigenschaften des Defensins, das ebenfalls im weiblichen Genitaltrakt exprimiert wird, gegenüber den sexuell übertragbaren *Humanen Papilloma Viren* (HPV) und *HI-Viren* (HIV) beobachtet werden.^[25, 63, 64] Neben des Schutzes vor Pathogenen, ist HD5 darüber hinaus für die Regulierung der Zusammensetzung der intestinalen Mikroben verantwortlich.^[65]

Während die Precursor-Moleküle der neutrophilen Defensine keine Aktivität zeigen, konnte für das Pro-HD5 *in vitro* eine antimikrobielle Aktivität v.a. gegenüber Gram-positiven Bakterien wie *Listeria monocytogenes* und schwache zytotoxische Eigenschaften gegenüber die humane embryonale intestinale Epithelzelllinie Int407 nachgewiesen werden.^[36, 38, 41] Cunliffe *et al.* konnten dagegen für Pro-HD5 keine antimikrobielle Aktivität nachweisen.^[19]

Im Gegensatz zu HD5 und den übrigen Defensinen zeigte das intestinale Defensin HD6 für eine lange Zeit keine antibakterielle Aktivität, so dass dieses Defensin innerhalb der α -Defensine eine Ausnahme bildete und dessen Rolle in den Paneth-Zellen, neben dem stark antibakteriell wirkenden HD5, fraglich erschien. Für HD6 konnten in *in vitro* Untersuchungen bisher nur sehr geringe Aktivitäten gegenüber *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecium* und *Escherichia coli* bei allen getesteten Konzentrationen beobachtet werden und wird daher als inaktiv bezeichnet.^[23, 52]

Erst kürzlich konnten Chu *et al.* erstmals einen Wirkmechanismus des HD6 beobachten, der im Vergleich zu HD5 und den übrigen Defensine sehr verschieden ist.^[65]

Strukturuntersuchungen an HD6 zeigen eine höher geordnete helikale Struktur.^[13] Nach Sekretion kann HD6 an bakterielle Oberflächen binden und aneinander assoziieren. HD6-Dimere erreichen durch weitere Assoziierung die Ausbildung stabiler Tetramere, die wiederum das Grundgerüst einer verlängerten HD6-Struktur bilden und durch die Dimer-Interaktion stabilisiert wird.^[28, 66] Die Bildung eines faserartigen Nanonetzes, das die pathogenen Bakterien umhüllt, führt zum Aggregieren der Bakterien.^[28] Für die Ausbildung dieses Grundbausteins und folglich auch für die Oligomerisierung und Ausbildung der Netzstruktur zeigte sich das Histidin an Position 27 relevant.

Einleitung

Chu *et al.* konnten zeigen, dass HD6 durch seine einzigartigen Bindungseigenschaften eine wichtige schützende Funktion gegen *Salmonella enterica* und *Salmonella typhimurium* besitzt.^[65]

Die molekulare Grundlage zur Ausbildung der faserartigen Nanonetze wurde kurz darauf durch eine weitere Forschungsgruppe untersucht. Dabei konnte die wichtige Rolle der Aminosäure Phenylalanin an Position 2 und 29 für die Oligomerisierung und netzartige Umhüllung von Bakterien gezeigt werden.^[67]

Erst kürzlich gelang es Schröder *et al.* eine antibakterielle Aktivität von HD6 gegen *Escherichia coli* nachzuweisen.^[31] Ähnlich wie hBD-1 und HNP-4 konnte erstmals eine antimikrobielle Aktivität des humanen α -Defensins 6 gegen verschiedene anaerobische, kommensale Bakterien (*Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* und *Streptococcus thermophilus*) unter reduzierenden Bedingungen nachgewiesen werden.^[31] Unter Standardbedingungen (pH 7,4 und nicht reduzierende Zusätze) konnte dagegen keine Aktivität beobachtet werden. *In vivo* erfolgt die Reduktion des HD6 durch das Thioredoxin-System, das ebenfalls HD5 und hBD-1 zu reduzieren vermag.^[31]

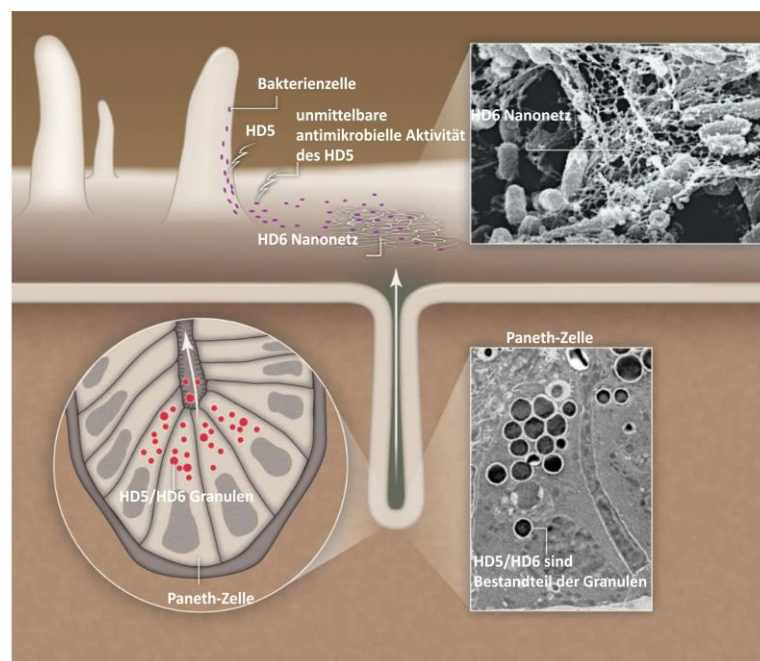


Abbildung 1.4 Wirkungsweise des humanen α -Defensins 6.

Auf dem Grund der Lieberkühn-Krypten sekretieren die Paneth-Zellen Granula, in denen HD5 und HD6 gespeichert sind, in das intestinale Lumen. Während HD5 das Wachstum von Mikroben durch direkte antimikrobielle Aktivität reduziert, bildet HD6 sogenannte Nanonetze aus, die die Mikroben umhüllen und deren Fortbewegung beeinflussen. Abbildung abgeändert nach Oulette *et al.* (2012).^[66]

1.5 Wirkmechanismus der Defensine

Defensine sind ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems, das für die unspezifische Abwehr gegen eine Vielzahl von Pathogenen verantwortlich ist. Zur schnellen Identifizierung dieser Mikroben werden sogenannte Toll-like-Rezeptoren genutzt, die pathogen-assoziierte Strukturmerkmale der Zellwand und DNA-Strukturmotive von Bakterien erkennen und die Aktivierung des angeborenen Immunsystems einleiten.^[58] In einem kaskadenartigen Signalweg antwortet das Immunsystem mit der Ausschüttung von z.B. Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Substanzen, wie unter anderem den Defensinen. Im engen Zusammenhang mit der Erkennung pathogener Mikroorganismen stehen die NOD-Rezeptoren, die als cytoplasmatische Sensoren Peptidoglykan-Motive in Bakterien erkennen. Die durch Toll-like- und NOD-Rezeptoren regulierte Expression von Defensinen nimmt dabei eine Schlüsselposition im angeborenen Abwehrsystem ein. Die vielfach antimikrobiell wirkenden Defensine ermöglichen die Inaktivierung des Wachstums bzw. das Abtöten der Mikroben.^[58] Diese toxisch wirkende Eigenschaft und die Anfälligkeit des Pathogenen den antimikrobiellen Peptiden gegenüber ist vermutlich sowohl durch die Größe, die Aminosäuresequenz, die Ladung und Hydrophobizität, sowie die Amphiphilie und Struktur des Peptids mitbedingt.^[68] Dennoch ist die molekulare Grundlage der unterschiedlichen Wirkungsweisen und Spezifität der Peptide bislang unklar und der Wirkungsmechanismus trotz zahlreicher Studien nicht vollständig geklärt. Dieser ist vermutlich Peptid-spezifisch.^[55]

Der Wirkmechanismus beinhaltet neben der gezielten Annäherung, die Peptidinsertion und Membranpermeabilisierung bis hin zur intrazellulären Interaktion.^[68] Daher können humane antimikrobielle Peptide vielfältig, nämlich über die Oberfläche und/oder auch intrazellulär, ihre Funktion ausüben.^[5]

Antimikrobielle Wirkung der Defensine über die bakterielle Zellwand

Für die antimikrobielle Aktivität des humanen β -Defensins 3 spielt, aufgrund der Lipid-spezifischen Interaktion, der Aufbau der Außenmembran eine wichtige Rolle. So ist für die Abwehr gegen Gram-negative Bakterien der erste essentielle Mechanismus die Permeation der äußeren Zellmembran der bakteriellen Zellwand.^[69] Für die Aktivität gegenüber *Staphylococccen* spielt die Inhibierung der Zellwandsynthese durch Interaktion mit dem Membrangebundenen Lipid II eine wichtige Rolle.^[70] Der Mechanismus des HNP-1 konnte ebenfalls auf eine Interaktion mit dem Precursor der Zellwandsynthese zurückgeführt werden.^[71] Das humane α -Defensin 6 bindet dagegen an bakterielle Proteine an der Oberfläche und bildet eine geordnete, faserartige Netzstruktur, ein sogenanntes Nanonetz, das das Bakterium flächenweise umhüllt.^[28]

Antimikrobielle Wirkung der Defensine über die bakterielle Innenmembran

Der Wirkmechanismus, der den Angriff der bakteriellen Innenmembran und die Inhibierung des Zellwachstums oder des Absterbens des Bakteriums beschreibt, beinhaltet drei Schritte. Die Annäherung, die Bindung an die bakterielle Außenmembran und schließlich die Bindung an die bakterielle Innenmembran.^[5]

Annäherung & Anziehung zwischen Defensin und Bakterium

Das Zusammenspiel der strukturellen Eigenschaften sowohl der Bakterienmembranen als auch der Defensine sind für die erste Annäherung entscheidend. Kationische, antimikrobielle Peptide werden über elektrostatische Anziehungskräfte an die negativ geladene Membran Gram-negativer Bakterien, z.B. durch anionische Phospholipide und Phosphatgruppen der Lipopolysaccharide (LPS), angezogen.^[6, 68, 72] Die Interaktion mit Gram-positiven Bakterien erfolgt über die Beschaffenheit der Oberfläche mit Teichonsäure.^[68] Die ladungsabhängigen, strukturellen Gegebenheiten der Bakterien machen sie förmlich zur Angriffsfläche für Defensine. Im Gegensatz dazu zeigen sich die Defensine gegenüber eukaryotischen Zellen, deren äußere Membran der Lipiddoppelschicht hauptsächlich aus zwitterionischen neutralen Phospholipiden und Cholesterol besteht, inaktiv.^[55, 72] Aufgrund der höheren Affinität der negativ geladenen LPS der Außenmembran (gram-negativer Bakterien) mit den kationischen Peptiden als mit den zur Verfügung stehenden Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Kationen, werden die Ionen verdrängt und es kommt zur elektrostatischen Interaktion zwischen LPS

und Peptid. Dies führt zu einer lokalen Störung innerhalb der Außenmembran, wodurch die antimikrobiellen Peptide durch die Außenmembran zur cytoplasmatischen Membran gelangen und agieren können.^[73] In Gegenwart von Gram-positiven Bakterien akkumulieren Defensine an anionischen Polymeren der Teichonsäure und können die Autolyse aktivieren.^[74]

Peptidinsertion und Membranpermeabilisierung

Die meisten Defensine besitzen einen amphipatischen Charakter, bestehend aus sowohl positiv geladenen als auch hydrophoben Seitenketten. Dies ermöglicht es ihnen neben der Interaktion mit den negativen Phospholipiden der Bakterienmembran auch mit den hydrophoben Fettsäurereste zu wechselwirken.^[6] Während bei geringen Defensinkonzentrationen (geringes Peptid/Lipid Verhältnis) die Peptide parallel an die Lipiddoppelschicht binden, orientieren sie sich bei einer Steigerung der Konzentration senkrecht zur Membran, das schließlich zur Ausbildung von Transmembranporen führt.^[68, 75] Der genaue Mechanismus der Permeabilisierung wird durch verschiedene Modelle versucht zu erklären (Abbildung 1.5).

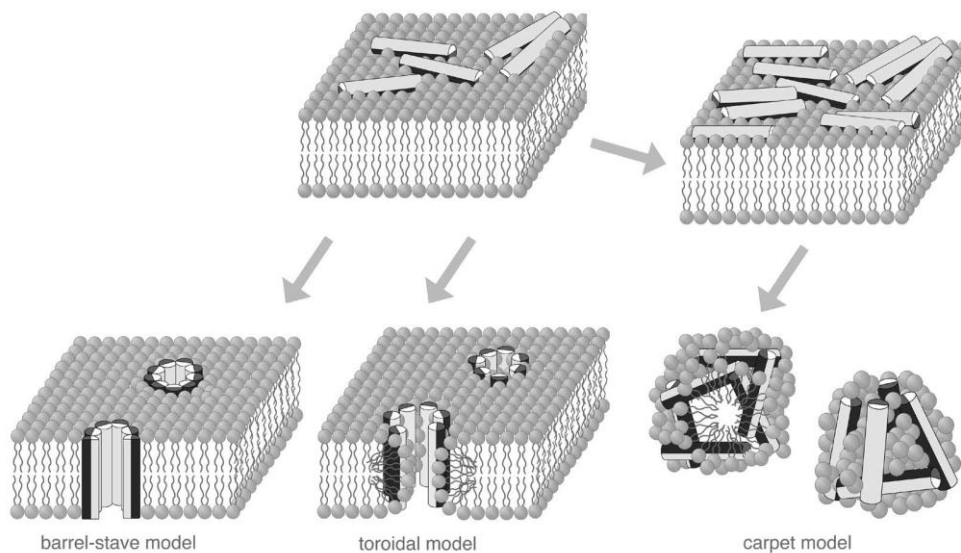


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der drei Modelle zur Beschreibung der Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide.^[72]

Die hydrophilen und lipophilen Bereiche der antimikrobiellen Peptide sind hellgrau und schwarz markiert. Abbildung übernommen aus Wiesner *et al.* (2010).^[72]

Einleitung

Barrel-stave-Modell: Die amphiphatischen helikalen Peptide aggregieren und inserieren in die Membran. Dabei richten sich die hydrophoben Reste der Peptide parallel gegen die Acyl-Reste der Membran-Lipide, während die hydrophilen Reste der Peptide die Innenfläche der Poren bilden.^[68, 72] Das Barrel-stave Modell ist nur auf eine geringe Anzahl von Beispielen anwendbar.

Toroidal-Modell: Im Gegensatz zum Barrel-stave Modell assoziieren die Peptide über die gesamte Transmembran mit den Lipid-Kopfgruppen. Daher kommt es zu einer Art Krümmung der Lipid-Schicht und folglich zu einer Art torroidalen Pore.^[72] Die Folge ist ein Fluss von Ionen, Lipiden und Peptiden durch die Membran hindurch.^[1] Dieses Modell kann den meisten antimikrobiellen Peptiden (AMP) zugeordnet werden.

Carpet Modell: Im Carpet-Modell kommt es zu einer elektrostatischen Anziehung und Anlagerung der amphiphatischen Peptide an die Membranoberfläche. Die Peptide akkumulieren parallel zur Membranoberfläche und bilden eine Art Teppich. Ab einer kritischen Konzentration kommt es zur Distorsion der Lipiddoppelschicht und zur Ausbildung von Mizellen oder Lipid-Peptid-Aggregaten. ^[68, 72, 76]

Intrazellulärer Mechanismus

Neben dem Zerstören der Membran zeigen antimikrobielle Peptide darüber hinaus die antimikrobielle Bekämpfung über den Eingriff in metabolische, zelluläre Prozess wie DNA- und Proteinsynthese, Proteinfaltung, enzymatische Aktivitäten oder Zellwandsynthese.^[68, 77]

1.6 Biologische Bedeutung eines Defensinmangels

1.6.1 Defensine in gastrointestinalen Erkrankungen

Im Magen-Darm-Trakt findet sich eine Vielzahl von Mikroben. Dazu gehören sowohl die kommensalen Bakterien unserer Darmflora als auch jene Mikroben, die z.B. über die Nahrungsaufnahme zugeführt werden. Defensine regulieren hier die Zusammensetzung der kolonisierenden Mikroben, so dass ein gesundes Gleichgewicht herrscht. Durch die konstitutive Expression des β -Defensins 1 (hBD-1) und des Cathelicidin LL-37 in den Epithelzellen des gesamten Gastrointestinaltrakts sowie der α -Defensine 5 und 6 speziell in den sekretorischen Epithelzellen des Dünndarms kommt es zu einer effektiven Abwehr gegen Darmbakterien.^[8] Eine Störung dieses Gleichgewichts spielt eine kritische Rolle in der Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und *Colitis ulcerosa*.

1.6.1.1 Morbus Crohn als „Defensin-Mangel-Syndrom“

Im Krankheitsbild des Morbus Crohn lassen sich, abhängig von der Lokalisation der Entzündungserscheinungen, zwei verschiedene Defensin-Defekte beschreiben.^[8] Während die Entzündungserscheinungen in *Colitis ulcerosa* ausschließlich auf den Dickdarm beschränkt sind, lässt sich Morbus Crohn praktisch über den gesamten Darm hinweg finden, an der Darmschleimhaut des Dünndarms und des Dickdarms. In beiden Fällen (Dünndarm- bzw. Dickdarmbefall) kommt es aufgrund des Defensinmangels zu eingeschränkten Kontrollmechanismen (Abwehrdefekt) gegen kommensale Bakterien, die schließlich eine Entzündung auslösen können. Eine Ursache der Erkrankung ist nicht bekannt, es konnte jedoch eine genetische Mutation im Gen *NOD2* bei einem Drittel aller untersuchten Morbus Crohn-Patienten nachgewiesen werden.^[78-80]

Das humane β -Defensin 1 (hBD-1) wird unabhängig von Entzündungen im Bereich des Kolons konstitutiv exprimiert, während die humanen β -Defensine 2 und 3 (hBD-2-3) zum Schutz vor eindringenden Pathogenen induziert werden.^[79] Morbus Crohn-Patienten mit Dickdarmbefall zeigen eine verminderte Expression der induzierbaren β -Defensine hBD-2 und hBD-3, wobei die verminderte Expression von hBD-2 auf eine verminderte Gen-Kopie-Anzahl zurückzuführen ist.^[81]

Einleitung

Im Gegensatz zum Dickdarm herrscht im Dünndarm, der für die Resorption zuständig ist, ein nahezu keimfreies Milieu.^[8] Ein besonderer Schutz wird hier durch die zahlreichen Paneth-Zellen erreicht, die hohe Konzentrationen an Defensinen absondern.

Die intestinalen Panethzell-Defensine HD5 und HD6 werden konstitutiv exprimiert und dienen zum Schutz vor kommensalen Bakterien im Dünndarmbereich.^[8, 81] Eine reduzierte Expression führt zu einer defekten Abwehrreaktion gegenüber Bakterien und folglich zu einer Entzündungsreaktion des Dünndarms, die sich in der Pathophysiologie des Morbus Crohn widerspiegelt.

Bei Morbus Crohn-Patienten mit vorhandener Mutation im *NOD2*-Gen wirkt sich dieser Mangel noch stärker aus und kann bei einem Drittel aller untersuchten Patienten beobachtet werden.^[82] Das Gen codierend für *NOD2* ist für die Erkennung von Bakterien zuständig.^[83] Die Expression des *NOD2* ist ebenfalls, wie die der humanen α -Defensine 5 und 6, in den Paneth-Zellen des Dünndarms lokalisiert und während Schleimhautentzündungen erhöht.^[78, 84] Bedingt durch eine Mutation im Gen *NOD2* konnte eine deutlich verringerte Expression der α -Defensine nachgewiesen werden, welches zu einer Störung der Immunantwort bei Bakterienbefall führt.^[84, 85] Anhand von Tiermodellen konnte der Zusammenhang des *NOD2*-Gens und der Paneth-Zellen untersucht werden. Knock-out-Mäuse, denen das Gen codierend für *NOD2* fehlt, zeigten eine verminderte Expression der α -Defensine und somit eine insuffiziente Mukosa-Barriere.^[86] Dieser vermeintlich interessante Zusammenhang wurde jedoch durch eine weitere Arbeitsgruppe widerlegt.^[87]

1.7 Alternativen zu herkömmlichen Antibiotika – Das Potential von und der Bedarf an antimikrobiellen Peptiden

Auf der Suche nach neuen Antibiotika machen die außergewöhnlichen, vielfältigen Eigenschaften sowie die antimikrobielle Aktivität gegenüber antibiotikaresistenten Bakterien den Einsatz von Defensinen und antimikrobiellen Peptiden interessant.

Vor allem zur Charakterisierung neuer antimikrobieller Peptide aber auch für die Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe sind eine Reihe von Untersuchungen bezüglich des genauen Wirkungsmechanismus und Struktur-Funktions-Eigenschaften grundlegend und unvermeidlich.^[2] Für die genauere Charakterisierung und die Untersuchung von Proteinen allgemein und antimikrobiellen Peptiden im Speziellen über biophysikalische Techniken bedarf es einer ausreichend hohen Menge an Zielprodukt.^[88] Während es für die Untersuchung von z.B. Bindungskinetiken über Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) lediglich 0,001 bis 0,1 µg an Protein bedarf, zeigt sich z.B. für Strukturaufklärungen über Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) der Bedarf an Protein bzw. antimikrobiellen Peptid mit 10-500 µg bereits als vergleichsweise hoch. Für einen therapeutischen Einsatz müssen weiter reproduzierbare und ökonomische Herstellungsverfahren realisiert werden und verfügbar sein. Sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die klinische Forschung und Anwendung besteht ein Bedarf an großen Mengen qualitativ hoch reiner Peptide und somit der direkte Bedarf eines geeigneten Herstellverfahrens.^[89]

1.7.1 Herstellung rekombinanter Defensine

Prinzipiell können drei verschiedene Verfahren zur Gewinnung antimikrobieller Peptide herangezogen werden.^[2] Die direkte Isolierung antimikrobieller Peptide aus natürlichen Quellen (1) zeigt sich nicht nur als zeitintensiv und teuer^[89], sondern zudem als umweltunfreundlich^[90]. Dieses Verfahren ist somit für die Gewinnung großer Mengen an Defensinen ineffizient und nicht realisierbar.

Die chemische Synthese (2) ist im Gegenzug effizient für die Synthese kurzer Peptide und ermöglicht prinzipiell die Produktion von Defensinen für die Forschung. Die chemische Synthese liefert hoch reine, bioaktive Produkte.^[91] Für die Synthese großer Mengen zeigt sich dieses Verfahren jedoch limitiert und speziell für jene Zielpeptide, die eine hohe Anzahl an

Disulfidbrücken aufweisen, durch nötige Rückfaltungsverfahren als sehr teuer und komplex.^[2, 89, 91]

Das dritte Verfahren zur Gewinnung großer Mengen antimikrobieller Peptide wird durch die rekombinante DNA-Technologie (3) ermöglicht.^[2] Der Einsatz rekombinanter pro- und eukaryotischer Expressionssysteme zur Gewinnung von Proteinen und Peptiden hat in den letzten Jahrzehnten aufgrund der kostengünstigeren und einfacheren Handhabung kontinuierlich mehr Aufmerksamkeit auf sich gezogen und wird heutzutage bereits für die Herstellung einer Vielzahl von Proteinen in der Forschung und pharmazeutischen Industrie eingesetzt. Antimikrobielle Peptide werden ebenfalls bereits rekombinant hergestellt. Durch Klonierungsarbeiten und z.B. dem Generieren von Mutanten kann diese Technologie nicht nur zur Herstellung der Zielproteine genutzt werden, sondern darüber hinaus durch gezielte Strukturanalyse Erkenntnisse der molekularen Eigenschaften und Funktionsweise der Peptide liefern.

1.7.1.1 *E. coli* als Expressionssystem

Für die Herstellung heterologer Proteine im Allgemeinen und für antimikrobielle Peptide im Speziellen ist der Bakterienstamm *E. coli* aufgrund seiner vielen Vorteile der am häufigsten eingesetzte Wirtsorganismus.^[89, 90] Die kostengünstige und einfache Handhabung sind neben der schnellen Wachstumsphase und der resultierenden Gewinnung hoher Biomassen und damit verbundenen Ausbeuten an Zielprotein attraktive Gründe, vor allem wenn es um die industrielle Realisierung eines Produktes geht.^[88, 92] Das Vorhandensein einer Vielzahl kommerziell erhältlicher Vektoren und die Eigenschaft, dass *E. coli* leicht gentechnisch manipulierbar ist, spiegelt sich heutzutage in der Vielzahl an gentechnischen Anwendungen wieder.^[2]

Der Einsatz von *E. coli* ist jedoch nicht uneingeschränkt möglich und zeigt seine Grenzen, wenn das zu exprimierende Zielprotein aus Säugetieren stammt.^[88] Posttranslationale Modifikationen wie z.B. Disulfidbrücken können in *E. coli* nur eingeschränkt erhalten werden. Dazu bedarf es meist den Einsatz geeigneter *E. coli*-Stämme, Strategien und/oder Rückfaltungstechniken.^[88, 92, 93] Dabei kann die Ausbildung von Disulfidbrücken oder Glykosylierungsmuster für Proteine und Peptide entscheidend für deren Stabilität und Biofunktionalität sein. Nichts desto trotz sind bis heute die höchsten Ausbeuten an toxischen

Einleitung

antimikrobiellen Peptiden durch den Einsatz von *E. coli* zu verzeichnen.^[2] Während z.B. die Expression von antimikrobiellen Peptiden und humanen Defensinen im Speziellen in *P. pastoris* und *Saccharomyces cerevisiae* mit Ausbeuten von 165 mg/L (HD5) und 55 µg/L (hBD-1) erzielt wurde, zeigt *E. coli* unter Einsatz von Carrier-Proteinen deutlich höhere Ausbeuten. So konnten bisher unter anderem die humanen β -Defensine hBD-2-6 und hBD-26-27 mit Ausbeuten von bis zu 689 mg/L hergestellt werden.^[2]

Die direkte Produktion der antimikrobiellen Peptide über den Expressionswirt *E. coli* zeigt sich jedoch aufgrund der Toxizität der Peptide gegenüber dem Wirt als problematisch. Darüber hinaus ist das zu exprimierende antimikrobielle Peptid bedingt durch seine geringe Größe und kationischen Charakter anfällig für eine proteolytische Degradierung.^[89, 94] Durch gezielte Strategien muss somit zum Einen die Toxizität des antimikrobiellen Peptids unterbunden werden, während im Gegenzug das Peptid selbst vor Proteasen des Wirts und somit vor der Degradierung geschützt werden muss.^[2, 89] Für die Expression toxischer Proteine bietet sich ebenfalls die gezielte Expression der Proteine in Form von *inclusion bodies* an.^[95]

a) Expression als Fusionsprotein

Ein heutzutage häufig eingesetztes Verfahren ist die Expression der antimikrobiellen Peptide in Form von Fusionsproteinen.^[94] Durch gentechnische Fusionierung des Peptids mit einem geeigneten Carrier-Protein kann die positive Ladung des Peptids neutralisiert und dessen antimikrobielle Aktivität gegenüber dem Expressionswirt maskiert werden.^[2, 89] Ähnlich wie in der Natur nimmt das Carrier-Protein die Rolle des inaktiven Prosegments an und schützt das Zielpeptid vor Proteasen und den Wirt vor dessen toxischen Eigenschaft.^[89, 94, 96, 97] Für eine solche Fusionierung stehen eine Reihe an verschiedenen Carrier-Proteinen wie z.B. SUMO, GST, PurF, GFP und Thioredoxin zur Verfügung. Dabei wird zwischen löslichkeits- und aggregatfördernden Carrier-Proteinen unterschieden.^[94, 96]

Aufgrund der Chaperon-ähnlichen Eigenschaft^[2] ist Thioredoxin, mit einem geringen Molekulargewicht von 11,8 kDa, das am häufigsten eingesetzte Carrier-Protein zur Expression löslicher Proteine in *E. coli*.^[94] Darüber hinaus ist Thioredoxin eine Disulfidreduktase und ermöglicht weiter die Katalyse von Disulfidbrücken im Cytoplasma von *E. coli*. Neben der Wahl eines geeigneten Carrier-Proteins erfordert eine erfolgreiche Gewinnung des Zielproteins bzw. -peptids ebenso den Einsatz einer chemischen oder

enzymatischen Schnittstelle, die es im folgenden Downstream-Prozess erlaubt das Zielprodukt vom Fusionsprotein zu trennen.

b) Tandem-Proteine

Eine weitere Methode, die bereits erfolgreich zur Expression antimikrobieller Peptide in *E. coli* eingesetzt wird, ist die Fusionierung mehrerer Peptid-Einheiten miteinander. Durch gentechnische Klonierungsarbeiten können so Multimere oder auch Tandem-Proteine gewonnen werden. Durch die Wiederholung von n -Einheiten an das zu exprimierende Zielpeptid können so, verglichen mit der Expression als Fusionsprotein, höhere Ausbeuten^[2] erzielt werden. Die Expression solcher multimerer Fusionsproteine zeigte meist die Bildung von *inclusion bodies*. Die Expression in Form dieser unlöslichen Aggregaten wird, bezüglich der Verhinderung der proteolytischen Degradierung, zum Teil als effizienter postuliert.^[94]

1.7.1.2 *P. pastoris* als Expressionssystem

Im Gegensatz zu *E. coli* zeigt das Expressionssystem *P. pastoris* einige Vorteile in der Expression heterologer Proteine. Die Expression in *P. pastoris* kann dabei sowohl intra- als auch extrazellulär erfolgen. Der Einsatz von *P. pastoris* erlaubt, wie auch *E. coli*, eine leichte Handhabung und die Überexpression des Zielproteins. Der vermutlich größte Vorteil in der Anwendung der Hefe besteht in der Ausbildung posttranslationaler Modifikationen, wie der Ausbildung von Disulfidbrücken und der Glykosylierung.^[2] So kann die Hefe *P. pastoris* beispielsweise die Herstellung eukaryotischer Proteine unter Ausbildung posttranslationaler Modifikationen ermöglichen.^[93, 98] Im Vergleich zu Zelllinien ist der Einsatz der Hefe weniger zeitintensiv, kostengünstiger und in ihrer Handhabung einfacher. Die Möglichkeit die Proteine in das Medium zu sekretieren bietet einen weiteren Vorteil für den Downstream-Prozess.^[2] Durch den geringen *Pichia*-eigenen Proteinanteil im Medium kann die Aufreinigung des Zielproteins vereinfacht und durch die Minimierung der Aufreinigungsstufen die Ausbeute des Produkts gesteigert werden.^[2] Weiterhin ist im Gegensatz zur Expression in *E. coli* eine Fusionierung mit einem Carrier-Protein nicht erforderlich.^[2] Dies stellt eine weitere Vereinfachung für die Aufarbeitung des Proteins dar. Zusammengefasst ist die einfache Handhabung, die vereinfachte Aufarbeitung, die kostengünstigen Edukte zur Herstellung der Medien und die Wachstumsbedingungen für

Einleitung

P. pastoris ideal für die großtechnische Produktion von Proteinen und stellen daher eine interessante Methode zur Gewinnung antimikrobieller Peptide und Defensine dar.^[99] *P. pastoris* ermöglicht außerdem die Kultivierung zu hohen Zelldichten und somit hohen Expressionsraten. Im Vergleich zu *E. coli* steht für *P. pastoris* jedoch nur eine begrenzte Anzahl an Vektoren für den Einsatz zur rekombinanten Expression zur Verfügung. Meist wird ein Vektor, der über den AOX-Promotor verfügt, verwendet, vor allem für die Expression antimikrobieller Peptide.^[2]

Die methylotrophe Hefe *P. pastoris* nutzt Methanol sowohl als Kohlenstoff- als auch Energiequelle.^[100] Über den AOX1-Promotor, der das AOX1-Gen reguliert und für eine Alkoholoxidase codiert, kann bei dessen Transkription das Methanol zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid oxidieren. Die Transkription der Gene, die in die AOX1-Region integriert wurden, können weiterhin unter Kontrolle des AOX1-Promotors durch Zugabe von Methanol induziert und kontrolliert werden.^[2] Im Fermentationsprozess kann weiterhin der Transkriptionsfaktor des AOX1-Gens, unter Kontrolle der benötigten Sauerstoffzufuhr, um das 3-5-fache erhöht werden.^[100] Dadurch können höhere Proteinausbeuten erzielt werden. Antimikrobielle Peptide konnten in Hefe bereits mit guten Ausbeuten hergestellt werden. Wang *et al.* gelang es bislang die höchsten Ausbeuten (165 mg/L) an rekombinanten bioaktiven mHD5 über die Fermentation in *P. pastoris* GS-115 zu erzielen.^[101] Das humane β -Defensin 2 (hPAB- β) konnte bereits ebenfalls mit guten Ausbeuten von 241 mg/L in *P. pastoris* exprimiert werden.^[2] Dennoch gibt es ebenso Fälle, in denen die Menge vernachlässigbar gering war bzw. das Peptid inaktiv war.^[94] Das humane β -Defensin 1 beispielsweise konnte nur mit Ausbeuten von 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ exprimiert werden.^[2] Die Expression des humanen α -Defensins 6 ist bisher in *P. pastoris* nicht beschrieben.

1.8 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit mit dem Titel „Herausforderungen in der Herstellung und Charakterisierung der humanen α -Defensine 5 und 6“ sollte ein effektives rekombinantes Herstellungsverfahren für die humanen α -Defensine 5 und 6 untersucht und etabliert werden.

Ziel der Arbeit war es über den Einsatz geeigneter gentechnischer Methoden und proteinbiochemischer Verfahren ein einheitliches, effizientes Expressionssystem zu entwickeln, welches es erlaubt antimikrobielle Peptide in ihrer bioaktiven Form herzustellen und zu charakterisieren. Dabei sollte die Expression der antimikrobiellen Peptide in guten Ausbeuten und in der richtigen Faltung erfolgen.

Zunächst mussten gentechnische Strategien zur Lösung der Problematik der, für die Wirtsorganismen, toxischen Peptide für die Expressionen in den gängigen Expressionssystemen *E. coli* und *P. pastoris* untersucht werden. Dabei sollten die Klonierungsstrategien so gewählt werden, dass möglichst wenige Verfahrensschritte in der Aufarbeitung der aktiven Peptide notwendig sind um die Ausbeute zu steigern und um ein effektives System zu etablieren. Darüber hinaus sollten Aufarbeitungs- und Aufreinigungsverfahren für Kulturbestände im Fermentationsmaßstab angepasst sein und die Charakterisierung der Peptide sowohl über spektroskopische Methoden wie CD-Spektroskopie und MALDI-TOF-MS und Chromatographie wie RP-HPLC erfolgen. Weiterhin galt es die rekombinanten Peptide auf ihre antimikrobielle Aktivität hin zu überprüfen.

Durch Optimierung der Expression und der Aufbereitungsverfahren sollte ein Expressionssystem für antimikrobielle Peptide und Peptide im Allgemeinen etabliert werden und somit ein wichtiger Beitrag für die Untersuchung antimikrobieller Peptide und deren möglichen Einsatz in der therapeutischen Medizin geleistet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Für die Herstellung der verwendeten Puffersysteme und Medien wurden Chemikalien der Firma Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), sofern nicht anders vermerkt, verwendet. Alle verwendeten Chemikalien waren analytischen oder höheren Grades.

Tabelle 2.1 **Verwendete Enzyme**

Enzym	Puffer	Erkennungssequenz	Hersteller
DNA-Polymerasen			
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/ μ L)	<i>Pfu</i> -Polymerase Puffer		Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -Polymerase (2,5 U/ μ L)	<i>Taq</i> -Polymerase Puffer		Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>PfuUltra</i> TM II Fusion HS DNA-Polymerase	<i>PfuUltra</i> TM II Puffer		Agilent Technologies, Waldbronn
Ligase			
T4 DNA Ligase (5 U/ μ L)	T4 Ligase Puffer		Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Endonuclease			
<i>Bam</i> HI (10 U/ μ L)	<i>Bam</i> HI Puffer	5'-G↓GATCC-3'	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>Nco</i> I (10 U/ μ L)	Tango Puffer	5'-C↓CATGG-3'	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>Nde</i> I (10 U/ μ L)	Orange Puffer	5'-CA↓TATG-3'	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>Dpn</i> I (5 U/ μ L)	Tango Puffer	5'-Gm6A↓TC -3'	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
RNase H (5 U/ μ L)			Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Proteinasen			
Proteinase K	0,1 M Tris-HCl 1 mM CaCl ₂ , pH 7,2	'	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rekombinant Yeast <i>Kex-2</i>		Arg-Arg/X Lys-Arg/X	Pepro Tech, Hamburg

2.1.2 Kits

Tabelle 2.2 Verwendete Kits

Kit	Hersteller / Bezug
Zippy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research, Freiburg
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Freiburg
Pierce Silver Stain Kit	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Protein Refolding Kit	Merck-Millipore, Darmstadt
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Freiburg

2.1.3 Plasmide

Tabelle 2.3 Verwendete Plasmide

Plasmid	Insert (Schnittstellen)	Quelle
pET-22b(+)		Merck Millipore, Darmstadt
pET-16b		Merck Millipore, Darmstadt
pBAD18		Guzman <i>et al.</i> , 1995
pPICZαA_HD5	Pro-HD5 (<i>XhoI</i> , <i>XbaI</i>)	Diplomarbeit (Lalli, 2010) ^[99]
pPICZαA_mHD5	mHD5 (<i>XhoI</i> , <i>XbaI</i>)	Diplomarbeit (Lalli, 2010) ^[99]
pPICZαA_mHD6	mHD6 (<i>XhoI</i> , <i>XbaI</i>)	Diplomarbeit (Lalli, 2010) ^[99]
pET-22b(+)_trxA_mHD5	trxA_mHD5 (<i>NdeI</i> , <i>BamHI</i>)	Diplomarbeit (Iftime, 2010) ^[102]
pBAD18_mHD5_BbsI tetramer	4 x mHD5 (<i>NdeI</i> , <i>BamHI</i>)	Diplomarbeit (Iftime, 2010) ^[102]
pET-22b(+)_trxA_His_mHD5	trxA_His_mHD5 (<i>NdeI</i> , <i>BamHI</i>)	diese Arbeit
pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD5	trxA_His_NcoI_mHD5 (<i>NdeI</i> , <i>BamHI</i>)	diese Arbeit
pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD6	trxA_His_NcoI_mHD6 (<i>NdeI</i> , <i>BamHI</i>)	diese Arbeit
pET-16b_mHD5 tetramer	4 x mHD5 (<i>NdeI</i> , <i>BamHI</i>)	Studienarbeit (Vargiami, 2012) ^[103]

2.1.4 Bakterien- und Hefestämme

Für die Klonierungsarbeiten wurden die *E. coli*-Stämme XL-1 blue und DH5 α verwendet. Alle weiteren Stämme wurden für die Expression der Zielgene oder für die Testung der antimikrobiellen Aktivität der Peptide gegenüber dem jeweiligen Stamm eingesetzt.

Tabelle 2.4 **Verwendete Bakterien- und Hefestämme**

Organismus	Stamm	Genotyp	Bezug
<i>P. pastoris</i>	X-33	<i>Wildtyp</i>	Life Technologies, Darmstadt
<i>E. coli</i>	K12	<i>Wildtyp</i>	Life Technologies, Darmstadt
<i>E. coli</i>	DH5 α	F- ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(r-k m-k) phoA</i> <i>supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Life Technologies, Darmstadt
<i>E. coli</i>	XL-1 blue	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac</i> <i>glnV44 F[::Tn10 proAB+ lacIq</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15] <i>hsdR17(rK- mK+)</i>	Life Technologies, Darmstadt
<i>E. coli</i>	BL21(DE3)	F – <i>ompT hsdSB (rB – mB –) gal dcm</i> (DE3)	Life Technologies, Darmstadt
<i>E. coli</i>	Origami(DE3)	F – <i>ompT hsdSB (rB – mB –) lacY1 ahpC</i> <i>gor522::Tn10(T10^R)trxB::kan</i> (DE3)	Life Technologies, Darmstadt
<i>E. coli</i>	C41(DE3)	F – <i>ompT hsdSB (rB – mB –) gal dcm</i> (DE3) (und weitere uncharakterisierte Mutationen)	Universität Hohenheim, Stuttgart
<i>E. coli</i>	C43(DE3)	F – <i>ompT hsdSB (rB – mB –) gal dcm</i> (DE3) (und weitere uncharakterisierte Mutationen)	Universität Hohenheim, Stuttgart
<i>Staphylococcus carnosus</i>	TM300	<i>Wildtyp</i>	Universität Tübingen
<i>Micrococcus luteus</i>		<i>Wildtyp</i>	Universität Hohenheim, Stuttgart

2.1.5 Oligonukleotide

In der nachstehenden Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten PCR- und Sequenzierprimer aufgelistet. Die Primer wurden von der Firma Metabion International AG (Martinsried) hergestellt und für die Amplifikation bzw. Sequenzierung verwendet. Die erhaltenen Lyophilisate wurden mit ddH₂O auf eine Stammkonzentration von 1 µg/µL gelöst. Die Arbeitskonzentration betrug 100 ng/µL. Die Restriktionsschnittstellen sind in der Schriftstärke fett dargestellt, die über QuikChange® einzubauende Basen sind unterstrichen.

Tabelle 2.5 **Verwendete Oligonukleotide**

Oligonukleotide	Funktion	Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen (5' - 3')
Mil_HD5_XhoI_f	Forward-Primer für die Amplifikation des <i>Pro-HD5</i> Gens (<i>XhoI</i>)	CCGCTCGAGAAAAGAATGAGGA CCATCGCCATCC
Mil_HD5_XbaI_r	Reverse-Primer für die Amplifikation des <i>Pro-HD5</i> und <i>mHD5</i> -Gens (<i>XbaI</i>)	GCTCTAGATCAGCGACAGCAGA GTCTG
Mil_mHD5_XhoI_f	Forward-Primer für die Amplifikation des <i>mHD5</i> -Gens (<i>XhoI</i>)	CCGCTCGAGAAAAGAGCCACCT GCTATTGCCGAAC
Mil_mHD6_XhoI_f	Forward-Primer für die Amplifikation des <i>mHD6</i> -Gens (<i>XhoI</i>)	CCGCTCGAGAAAAGAGCTTTCA CTTGCCATTGCAG
Mil_mHD6_XbaI_r	Reverse-Primer für die Amplifikation des <i>mHD6</i> -Gens (<i>XhoI</i>)	GCTCTAGATCAGAGGCAGCAGA ATCTG
Mil_trxA-His-1	QuikChange® Primer zum Einbau des <u>His₆</u> -Tags in pET-22b(+)_trxA_mHD5	GGCGGGAAGCGGAAGCCACCAT <u>CATCATCATCATTCTTCTGGTGAC</u> CCAGCCACCTGCTATTG
Mil_trxA-His-2	QuikChange® Primer zum Einbau des <u>His₆</u> -Tags in pET-22b(+)_trxA_mHD5	CAATAGCAGGTGGCTGGGTCACC <u>AGAAGAATGATGATGATGATGGT</u> GGCTTCCGCTTCCCGCC
Mil_trxA_His_NcoI_1	QuikChange® Primer zum Einbau der <i>NcoI</i> -Schnittstelle in pET-22b(+)_trxA_His_mHD5	CTTCTGGTGACCCATGGGCCACC TGCTATTGCC
Mil_trxA_His_NcoI_2	QuikChange® Primer zum Einbau der <i>NcoI</i> -Schnittstelle in pET-22b(+)_trxA_His_mHD5	GGCAATAGCAGGTGGCCCATGG GTCACCAGAAG
Mil_mHD6_NcoI_f	Reverse-Primer zur Amplifikation von <i>mHD6</i> (<i>NcoI</i>)	CCATGCCATGGGCTTTCACCTGC CATTGCAG
Mil_mHD6_BamHI_r	Reverse-Primer zur Amplifikation von <i>mHD6</i> (<i>BamHI</i>)	CGCGGATCCTCAGAGGCAGCAG AATCTG

Fortsetzung Tabelle 2.5

Oligonukleotide	Funktion	Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen (5' - 3')
<i>Sequenzierprimer</i>		
AOX_f	Forward-Sequenzierprimer von pPICZ α A-Plasmiden	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
AOX_r	Reverse-Sequenzierprimer von pPICZ α A-Plasmiden	GCAAATGGCATTCTGACATCC
T7_Primer	Forward-Sequenzierprimer von pET-Plasmiden	TAATACGACTCACTATAGGG
pET_RP	Reverse-Sequenzierprimer von pET- und pBAD-Plasmiden	CTAGTTATTGCTCAGCGG
pBAD-FP	Forward-Sequenzierprimer von pBAD-Plasmiden	ATGCCATAGCATTTTTATCC

2.1.6 Standards

Tabelle 2.6 Verwendete Molekulargewichtsstandards

Standard	Hersteller
<i>Molekulargewichtsstandard</i>	
GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (50-1000 bp)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (250-10000 bp)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder (1,7 – 40 kDa)	Thermo Scientific, Braunschweig
PageRuler Prestained Protein Ladder (10-170 kDa)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Gel Filtration Standard (1,3-670 kDa)	Bio Rad Laboratories, München
Gel Filtration Calibration Kit LMW (6,5 -75 kDa)	GE Healthcare, Freiburg
<i>Synthetische Defensine</i>	
HD5 (Human Defensin 5)	Peptide Institute, INC., Osaka, Japan
Human α -Defensin 5	EMC microcollections, Tübingen
HD6 (Human Defensin 6)	Peptide Institute, INC., Osaka, Japan

2.1.7 Antikörper

Tabelle 2.7 **Verwendete Antikörper**

Antikörper	Hersteller
<i>Primäre Antikörper</i>	
Anti-His Mouse Anti-His IgG	GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom
Anti-HD5 Rabbit Anti-HDEFA5 IgG (affinity pure)	Alpha Diagnostic International, San Antonio, Texas, USA
Anti-HD6 Rabbit Anti-HDEFA6 IgG (affinity pure)	Alpha Diagnostic International, San Antonio, Texas, USA
<i>Sekundäre Antikörper</i>	
Goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP conjugate	Promega, Mannheim
Goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) conjugate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.8 Puffer

2.1.8.1 Puffer zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

TFBI-Puffer (pH 5,8 mit Essigsäure)

KaOAc	30 mM
RbCl	100 mM
CaCl ₂	10 mM
MnCl ₂	50 mM
Glycerin	15 % (v/v)

TFBII-Puffer (pH 6,5 mit NaOH)

MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15 % (v/v)

2.1.8.2 Puffer zur Isolierung genomischer DNA aus *P. pastoris*

PBS-Puffer (pH 7,4 mit HCl_{conc.}) (Phosphate-buffered saline)

NaCl	140 mM
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄	6,4 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM

TE-Puffer (pH 7,5 mit HCl_{conc.})

Tris	100 mM
EDTA	10 mM

SDS-TE Puffer

SDS	2 % (w/v) (in TE-Puffer)
-----	--------------------------

Kaliumacetat-Puffer (pH 6,2 mit Essigsäure)

KOAc	5 M
------	-----

Natriumacetat-Puffer (pH 5,2 mit Essigsäure)

NaOAc	3 M
-------	-----

2.1.8.3 Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

5x DNA-Probenpuffer „Orange G“

Sucrose	40 g/L
Orange G	2 g/L

TAE-Puffer

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

2.1.8.4 Puffer für die SDS-,Tris-Tricin-Gelelektrophorese und Western Blot

6x SDS-Probenpuffer

4 x Sammelgel-Puffer	7 mL
SDS	1 g
Glycerin	3 mL
Bromphenolblau	1,2 mg
DTT	930 mg

Der 6x SDS-Probenpuffer wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

4x SDS-Trenngel-Puffer (pH 8,8 mit HCl_{conc.})

Tris-HCl	1,5 M
----------	-------

4x SDS-Sammelgel-Puffer (pH 6,8 mit HCl_{conc.})

Tris-HCl	0,5 M
----------	-------

10x SDS-Elektrophoresepuffer

Tris	30 g/L
Glycin	144 g/L
SDS	10 g/L

3x Tris-Tricin-Gelpuffer (pH 8,45 mit HCl_{conc.})

Tris-HCl	3 M
SDS	0,3 % (w/v)

Material und Methoden

Kathodenpuffer

Tris	0,1 M
Tricin	0,1 M
SDS	0,1 % (w/v)

Anodenpuffer (pH 8,9 mit HCl_{conc.})

Tris-HCl	0,2 M
----------	-------

Coomassie-Färbelösung

Coomassie Brilliant blue	0,1 % (w/v)
Ethanol	30 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Coomassie-Entfärbelösung

Ethanol	30 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

10x TBS (pH 7,4 mit Essigsäure) (Tris-buffered saline)

NaCl	1,5 M
KCl	0,03 M
Tris	0,25 M

Für die Herstellung des TBS-T-Puffers wurden 0,1 % (v/v) Tween® 20 hinzugefügt.

Transferpuffer

Glycin	0,192 M
Tris	0,025 M

2.1.9 Medien zur Kultivierung

2.1.9.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium (Lysogeny broth medium)^[104]

Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L

LB-Agar

Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	16 g/L

TB-Medium (Terrific broth medium)

Trypton	12 g/L
Hefeextrakt	24 g/L
Glycerol	4 ml/L
1 M KPi, pH 6,8	10 % (v/v)

Die jeweiligen Selektionsmarker Ampicillin (100 µg/mL) bzw. Zeocin (25 µg/mL) wurden bei Bedarf nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von ca. 50-55°C hinzugegeben.

2.1.9.2 Nährmedien zur Kultivierung von *P. pastoris*

BMGY-Medium (Buffered glycerol-complex medium)

Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
YNB	13,4 g/L
KPi, pH 6,0	100 mM
Glycerol	1 % (v/v)
Biotin	0,4 µg/mL

Material und Methoden

BMMY-Medium (Buffered methanol-complex medium)

Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
YNB	13,4 g/L
1 M KPi, pH 6,0	100 mM
Methanol	0,5 % (v/v)
Biotin	0,4 µg/mL

Die Lösungen (YNB, Glycerol und KPi-Puffer) wurden separat autoklaviert und nach dem Abkühlen dem Nährmedium zugegeben. Die Biotin-Lösung wurde steril filtriert. Für die Herstellung des BMMY-Mediums wurde das Glycerol durch MeOH (0,5 % (v/v)) ersetzt. Das Antibiotikum Zeocin wurde mit einer Endkonzentration von 100 µg/mL zugesetzt.

YPP-Medium (Yeast extract peptone phosphate medium)

Pepton	20 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
1 M KPi, pH 6,8	100 mL/L

YPD-Medium (Yeast extract peptone dextrose medium)

Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
Dextrose	20 g/L

Die Dextrose-Lösung wurde separat autoklaviert und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur dem Medium zugegeben.

YPDS-Agar (Yeast extract peptone dextrose sorbitol medium)

Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
Agar	16 g/L
Sorbitol	182,2 g/L
Dextrose	20 g/L

Nach separatem Autoklavieren der Dextrose-Lösung und des Nährmediums, wurden die Lösungen bei einer Temperatur von ca. 50-55°C zusammengegeben und mit dem Antibiotikum Zeocin (100 µg/mL) versetzt.

BSM (pH 5 mit NH₄OH (28%)) (Basalsalzmedium)

K ₂ SO ₄	9,1 g/L
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	7,5 g/L
KOH	4,2 g/L
CaSO ₄ ·2 H ₂ O	0,47 g/L
H ₃ PO ₄ (85%)	8 mL/L
Glycerol (87%)	50 g/L
D-Biotin	0,87 g/L
PTM1	4,35 mL/L

PTM1 Spurensalzlösung

CuSO ₄ ·5 H ₂ O	6 g/L
NaI	0,08 g/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	3 g/L
CoCl ₂	0,5 g/L
ZnCl ₂	20 g/L
H ₃ BO ₃	0,02 g/L
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0,2 g/L
FeSO ₄ ·7 H ₂ O	65 g/L
D-Biotin	0,2 g/L
H ₂ SO ₄ (6 N)	30 mL/L

2.1.9.3 Nährmedien zur Kultivierung von *S. carnosus* und *M. luteus*

MHB-Medium (pH 7,4 mit NaOH) (Müller-Hinton-Medium)

Fleischextrakt	3 g/L
Casein Hydrolysat	17,5 g/L
Stärke	1,5 g/L

HNB-Medium (pH 7,2 mit NaOH)

Fleischextrakt	3 g/L
Pepton	5 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	16 g/L

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*

Die für die PCR, Klonierungsarbeiten und Sequenzierungen benötigte Plasmid-DNA wurde mittels des Zippy™ Plasmid Miniprep Kits (Tabelle 2.2) aus *E. coli* XL-1 blue-Zellen isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Eine 5 mL Übernachtskultur mit entsprechendem Antibiotikum (100 µg/mL) wurde hierfür verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µL ddH₂O eluiert. Zur weiteren Analyse wurde die DNA-Konzentration über einen NanoDrop 1000 (Thermo Fisher, Waltham, USA) und das Molekulargewicht der isolierten Plasmid-DNA über Agarosegel-Elektrophorese (2.2.1.7) bestimmt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.2.1.2 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau der eingesetzten Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurde mit den Restriktionsenzymen (2.1.2) und zugehörigen Puffer der Hersteller Thermo Scientific (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Ipswich, USA) nach Vorschrift durchgeführt. Das Ergebnis des Restriktionsverdaus wurde anschließend über Agarosegel-Elektrophorese (2.2.1.7) analysiert und dokumentiert.

Zur Reinigung der PCR-Produkte nach einem Restriktionsverdau wurde das QIAquick® PCR Purification Kit (2.1.2) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers.

2.2.1.3 DNA-Gel Extraktion

Zur Isolierung der gewünschten DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht isoliert und anschließend die DNA über das QIAquick® Gel Extraction Kit aufgearbeitet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde in 50 µL ddH₂O eluiert.

2.2.1.4 Ligation

Die T4-DNA-Ligase (Tabelle 2.1) wurde nach Angaben des Herstellers zur Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren verwendet. Die Menge der verdauten DNA-Fragmente (Insert und Vektor) wurden über ein Agarosegel verglichen und im Ligationsansatz in einem Verhältnis von 3:1 (Insert:Vektor) eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 10°C über Nacht.

2.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.2.1.5.1 PCR zur Amplifikation von *mHD5* und *mHD6*

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifikation der Zielgene *mHD5* und *mHD6* mit den entsprechenden flankierenden Restriktionsschnittstellen eingesetzt. Dazu wurden die Primer und das Plasmid bzw. das PCR-Produkt im folgenden Reaktionsansatz und Temperaturprogramm verwendet:

10 x <i>PfuUltra</i> TM II Puffer	5 µL
dNTP Mix (10 mM)	1 µL
Forward Primer (1 pmol/µL)	2 µL
Reverse Primer (1 pmol/µL)	2 µL
PCR-Produkt bzw. Plasmid (50-100 ng/µL)	3 µL
<i>PfuUltra</i> TM II Fusion HS DNA-Polymerase	1 µL
ddH ₂ O	ad 50 µL

Tabelle 2.8 Temperaturprogramm für die PCR

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95°C	1 min
2	Denaturierung	95°C	30 sec
3	Annealing	51°C	30 sec
4	Elongation	72°C	2 min
2-4			18 x
5	Elongation	72°C	7 min
6	Pause	8°C	unbegrenzt

2.2.1.5.2 PCR zum Nachweis der Gen-Insertion

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Klonierung der Gene *mHD5* und *mHD6* in den gewünschten Vektor wurde eine PCR mit den sequenzspezifischen Primer für *mHD5* und *mHD6* durchgeführt. Diese PCR-Methode wurde ebenfalls für den Nachweis der erfolgreichen Gen-Insertion in die genomische DNA von *P. pastoris* angewendet. Dazu wurde die genomische DNA zunächst isoliert (2.2.1.10) und als Template im Reaktionsansatz verwendet.

10 x <i>Taq</i> -Puffer (- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, - MgCl_2)	3 μL
MgCl_2	3 μL
dNTP Mix (10 mM)	0,5 μL
Forward Primer (1 pmol/ μL)	5 μL
Reverse Primer (1 pmol/ μL)	5 μL
Genomische DNA bzw. Plasmid (50-100 ng/ μL)	2 μL
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	0,5 μL
ddH ₂ O	ad 30 μL

Folgendes Temperaturprogramm wurde durchlaufen:

Tabelle 2.9 Temperaturprogramm für die PCR zum Nachweis der Gen-Insertion

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95°C	5 min
2	Denaturierung	95°C	1 min
3	Annealing	51°C bzw. 53°C *	20 sec
4	Elongation	72°C	1 min
2-4			30 x
5	Elongation	72°C	1 min
6	Pause	8°C	unbegrenzt

* Je nach Schmelztemperatur des eingesetzten Primers

2.2.1.6 Gezielte Mutagenese

Für die Insertion eines His₆-Tags in pET-22b(+)_trxA_mHD5 (Tabelle 2.3) und einer Restriktionsschnittstelle *NcoI* in pET-22b(+)_trxA_His_mHD5 wurde jeweils eine gezielte Mutagenese mit dem QuikChange® Verfahren (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt.

Das Konstrukt pET-22b(+)_trxA_His_mHD5, das einen His₆-Tag innerhalb der Gene codierend für das Thioredoxin (*trxA*) und dem mature HD5 (*mHD5*) enthält, wurde über eine PCR ausgehend vom Plasmid pET-22b(+)_trxA_mHD5^[102] und den zugehörigen Primer (Tabelle 2.5) synthetisiert.

Der einzubauende His₆-Tag befindet sich dabei in der Mitte der entworfenen Primer, so dass diese zwar nicht an der zu mutierenden Stelle hybridisieren können, aber die Randstücke an die Matrix hybridisieren und somit stabilisieren. Beide Primer, *Forward* und *Reverse*, flankiert durch unmodifizierte Nukleotidsequenz, sind komplementär zueinander und zu den komplementären DNA-Strängen.

Nach der PCR wurde das Reaktionsgemisch mit einer, für methylierte und hemimethylierte DNA (5'-Gm6ATC-3') spezifische Endonuklease (*DpnI*) verdaut (2 h, 37°C). Dieser Schritt selektiert auf mutierte DNA (PCR-Produkt), da nur die methylierte parentale Plasmid-DNA verdaut wird, während das unmethylierte PCR-Produkt erhalten bleibt.

Reaktionsansatz und Temperaturprogramm wurden gemäß der Angaben des Herstellers durchgeführt.

10 x <i>PfuUltra</i> TM II Reaction Buffer	5 µL
dNTP Mix (10 mM)	1 µL
Forward Primer (1 pmol/µL)	1 µL
Reverse Primer (1 pmol/µL)	1 µL
Plasmid Template (50-100 ng/µL)	1,5 µL
<i>PfuUltra</i> TM II Fusion HS DNA-Polymerase	0,5 µL
ddH ₂ O	ad 50 µL

Tabelle 2.10 Temperaturprogramm für die QuikChange®-Reaktion

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95°C	2 min
2	Denaturierung	95°C	30 sec
3	Annealing	50°C	1 min
4	Elongation	72°C	3 min
2-4			18 x
5	Elongation	72°C	7 min
6	Pause	8°C	unbegrenzt

Nach der QuikChange® Reaktion wurde dem Ansatz 1 µL *DpnI* (5 U/µL) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde kurz abzentrifugiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die DNA (10 µL) in XL-1 blue kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

2.2.1.7 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde zur Überprüfung der Reinheit und Menge an DNA, sowie zur Trennung und Isolierung von DNA-Fragmenten herangezogen. Abhängig von der Molekulargewichtsgröße der eingesetzten DNA-Moleküle wurden Agarosegele mit einem Agarose-Anteil von 1% und 2% (w/v) in TAE-Puffer hergestellt. Zur Detektion der DNA unter UV-Licht wurde der Agarose-Lösung der Farbstoff GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit dem Ladepuffer Orange G (5x) versetzt und neben einen DNA-Standard im gewünschten Größenbereich (Tabelle 2.6) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V über einen Zeitraum von ca. 30 min in TAE-Puffer betrieben.

2.2.1.8 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen wurde die Hitzeschockmethode angewendet. 1 µL der Plasmid-DNA-Lösung bzw. 10 µL eines Ligationsansatzes wurden zu 100 µL, auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli*-Zellen XL-1 blue gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden. Die Zellsuspension wurde daraufhin für 2-3 min auf Eis inkubiert und mit 500 µL LB-Medium versetzt. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 37°C und 350 rpm wurde die

Zellsuspension auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum als Selektionsmarker enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.9 Transformation von *P. pastoris*

Für die Transformation von *P. pastoris* erfolgte zunächst die Herstellung kompetenter *Pichia*-Zellen. Dazu wurden 5 mL YPD-Medium mit *P. pastoris* X-33 angeimpft und bei 30°C und 180 U/min über Nacht angezogen. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 20 erfolgte die Überimpfung in jeweils 200 mL YPD-Medium in einem 1000 mL-Kolben mit 50 µL, 75 µL und 100 µL der Übernachtskultur. Die Hauptkultur wurde bei o.g. Bedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 1,3-1,5 kultiviert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 1500 g und 4°C für 5 min und die Resuspension des Pellets mit 200 mL sterilem, 4°C gekühltem ddH₂O. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 mL gekühlten ddH₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 20 mL einer gekühlten, sterilen 1 M Sorbitol-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach Abtrennung des Überstandes wurde das Pellet in 400 µL gekühlter 1 M Sorbitol-Lösung resuspendiert.

Die Transformation von *P. pastoris* erfolgt über Elektroporation. Die Permeabilität der Zellmembran wird durch kurze Elektroimpulse erhöht, so dass die linearisierte DNA in die Zelle diffundieren kann. Zur Transformation wurden jeweils 25 µL (50-100 ng/µL) Plasmid-DNA des zu transformierenden Konstruktes mit *PmeI* linearisiert und zur Transformation anschließend mit 80 µL vorbereiteter Zellen in gekühlten Elektroporationsküvetten vermischt. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden die Zellen im GenePulser™ (Bio-Rad, München) einem kurzen Puls von 1500 V, 50 µF und 200 Ohm ausgesetzt. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Zellen mit 1 mL gekühlter 1 M Sorbitol-Lösung versetzt. Die Lösung wurde in ein 15 mL-Polypropylenröhrchen überführt und bei 30°C im Brutschrank für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 5 min bei 1500 g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in wenig Überstand resuspendiert. Die Zellen wurden auf YPDS-Agarplatten, die als Selektionsmarker Zeocin in einer Endkonzentration von 100 µg/mL enthielten, ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C über drei bis vier Tage.

2.2.1.10 Isolierung genomischer DNA aus P. pastoris

Zur Kontrolle der Transformation wurde die genomische DNA aus *P. pastoris* isoliert und anschließend über Kolonie-PCR (2.2.1.5.2) auf die Integration der Ziel-DNA überprüft. Zur Isolierung der genomischen DNA wurden 10 mL YPD-Medium mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und 180 U/min inkubiert. Die Kultur wurde 3 min bei 4°C und 2500 U/min zentrifugiert und das Pellet in 500 µL PBS-Lösung, der unmittelbar vor Zugabe 1 mg/mL Proteinase K zugesetzt wurde, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 2 mL-Eppendorf-Röhrchen überführt und es erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei 65°C. Anschließend wurde die Suspension mit ca. 500 µL, mit Salzsäure vorbehandelten, Glasperlen (Ø 0,75 mm-1 mm) versetzt und die Zellen in der Schwingmühle (MM 2000, Retsch) 30 min bei maximaler Amplitude (9000 Hz) und bei 4°C aufgebrochen. Die Glasperlen und Zellbestandteile wurden 5 min bei 14000 U/min und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt, mit 150 µL SDS-TE-Puffer resuspendiert und 5 min bei 65°C im Thermomixer inkubiert. Nach der Zugabe von 150 µL 5 M KOAc-Lösung (pH 6,2) erfolgte eine 40-minütige Inkubation auf Eis. Danach folgten zwei Fällungen der DNA mit Isopropanol. Dazu wurden zuerst 200 µL einer 3 M NaOAc-Lösung (pH 5,2) und 1 mL Isopropanol der Suspension zugegeben und für 10 min bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 14000 U/min und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Präzipitat bei Raumtemperatur getrocknet. Das Präzipitat wurde in 90 µL ddH₂O aufgenommen und mit 9 µL 3 M NaOAc-Lösung (pH 5,2) und 90 µL Isopropanol versetzt. Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei -80°C und anschließender Zentrifugation entsprechend o.g. Bedingungen. Das Präzipitat der zweiten Fällung wurde anschließend in 1 mL 70%-igem Ethanol (v/v) gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde in der Speedvac (Concentrator 5301, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für 15 min bei 45°C getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 100 µL TE-Puffer mit 200 µg/mL RNase H resuspendiert und bei 37°C für 30 min inkubiert um restliche RNA-Bestandteile aus der Lösung zu entfernen.

2.2.1.11 DNA-Sequenzierung

Zum Nachweis der korrekten Klonierung der Gene und zum Ausschluss von Mutationen wurden alle Plasmidkonstrukte zur Sequenzierung der Firma GATC Biotech AG (Köln) gesendet. Die Sequenzierung erfolgte mit den entsprechenden Sequenzierprimer (Tabelle 2.5) sowohl in Richtung 5'→3' als auch in 3'→5'. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte über EMBOSS Needle Alignment.

2.2.2 Stammhaltung

2.2.2.1 Glycerolstocks von *E. coli*-Zellen

Zur Langzeit-Lagerung von *E. coli*-Zellen wurde jeweils eine Einzelkolonie in 5 mL LB-Medium bei 37°C über Nacht inkubiert. 750 µL der Übernachtskultur wurden mit 250 µL einer sterilen 87%-igen Glycerol-Lösung vermischt und die Zellen bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Glycerolstocks von *P. pastoris*-Zellen

Zur Stammhaltung von *P. pastoris*-Transformanten wurden Glycerol-Stocks hergestellt. Dazu wurde jeweils eine Einzelkolonie in 10 mL YPD-Medium bei 30°C über Nacht inkubiert, die Zellen bei 4°C und 2500 U/min abzentrifugiert und in 500 µL sterilem YPD-Medium resuspendiert. Anschließend wurden 500 µL einer sterilen 87%-igen Glycerol-Lösung zugegeben, resuspendiert und die Zellen bei -80°C gelagert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 *Expression in E. coli*

2.2.3.1.1 Expression der Thioredoxin-Fusionsproteine in *E. coli*

Für die Überprüfung der Expression der Thioredoxin-Fusionsproteine *trxA*-His-mHD5 und *trxA*-His-NcoI-mHD6 wurden die *E. coli*-Stämme BL21(DE3), Origami(DE3), C41(DE3) und C43(DE3) eingesetzt. Eine 5 mL Übernachtskultur in LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin) des transformierten Stammes wurde auf 50 mL TB-Medium auf eine $OD_{600} \sim 0,1$ überimpft und bis zu einer OD_{600} von $\sim 0,5$ (von 0,4 bis 0,8) bei 37°C und 180 U/min kultiviert. Nach Abkühlen auf die Expressionstemperatur wurde die Kultur mit IPTG (Endkonzentration 0,25 mM) induziert und anschließend bei 25°C, 30°C und 37°C kultiviert. Entsprechende *E. coli*-Transformanten des leeren Vektors pET-22b(+) wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Die Expression erfolgte für ca. 20 h (über Nacht). Die Kulturen wurden in den ersten 5 h nach Induktion stündlich beprobt, die letzte Probenahme erfolgte kurz vor der Ernte der Kultur.

Zur präparativen Expression der verschiedenen Fusionsproteine wurde jeweils der *E. coli*-Stamm C41(DE3) eingesetzt. Eine Vorkultur aus 5 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin wurde mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht bei 180 U/min inkubiert. Die Hauptkultur wurde in 400 mL TB-Medium (100 µg/mL Ampicillin) in einem 2 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane bei 37°C in einem Schüttelinkubator kultiviert. Bei einer OD_{600} von $\sim 0,5$ erfolgte die Induktion mit 0,25 mM IPTG bei 30°C. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C bis zur Ernte der Zellen am Folgetag (ca. 20 h). Zur Isolierung der Fusionsproteine wurden die jeweiligen Hauptkulturen abzentrifugiert (17000 U/min, 30 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet, sofern es nicht direkt aufgeschlossen wurde, bei -20°C gelagert.

2.2.3.1.2 Expression der Tandem-Fusionsproteine in *E. coli*

Die Expression des Tandem-Fusionsproteins mHD5-Tetramer wurde in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3), C41(DE3) und C43(DE3) untersucht.^[103] Dazu wurde jeweils für eine Vorkultur 5 mL LB-Medium (100 µg/mL Ampicillin) mit einer Einzelkolonie von frisch transformierten *E. coli*-Stämmen angeimpft und bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Am Folgetag erfolgte die Inokulation von 50 mL TB_{Amp}-Medium. Die Hauptkultur wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ~ 0,5 bei 37°C und 180 U/min inkubiert, anschließend mit IPTG (0,25 mM) induziert und bei 20°C, 25°C, 30°C und 37°C über Nacht kultiviert. Für die Expressionsstudie in C41(DE3) und C43(DE3) wurden lediglich die Temperaturen 20°C und 37°C überprüft. Zur Überprüfung der Expressionsrate wurden direkt vor Induktion und Ende der Expression Proben für die SDS-PAGE (2.2.4.1) gezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (9000 U/min, 4°C, 30 min) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellkulturpellet bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Die präparative Expression des mHD5-Tetramers erfolgte im *E. coli*-Stamm C41(DE3) in einer Fermentation (2.2.3.2.1).

2.2.3.2 *Fermentation in E. coli*

2.2.3.2.1 Fermentation von mHD5-Tetramer in *E. coli* C41(DE3)

Eine Einzelkolonie von *E. coli* C41(DE3) transformierter Zellen wurde in 5 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin bei 37°C und 180 U/min inokuliert (Vorkultur I). Diese Kultur wurde anschließend zur Inokulation von 400 mL LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verwendet (Vorkultur II). Die Inkubation der Vorkultur II erfolgte bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 180 U/min. Das Fermentationsmedium (25 L TB-Medium, Ampicillin 100 µg/mL) wurde im 42 L-Bioengineering Reaktor mit 400 mL der Vorkultur II (1,5% (v/v)) auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Der Fermentationsprozess wurde mit einer Belüftungsrate von 20 L/min (0,77 vvm) und einer Drehzahl von 550 U/min durchgeführt. Die Messwerte des Sauerstoffpartialdrucks und somit des gelösten Sauerstoffgehalts (DO) wurden über die pO₂-Elektrode online erfasst. Die Kultivierung erfolgte unter der Einhaltung der eingestellten Startparameter bei 37°C. Die Induktion mit IPTG (0,25 mM) erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,7. Nach ca. 3 h Inkubation wurden die Zellen mit 200 mL Glycerol gefüttert. Außerdem erfolgte die Zugabe von 100 g (NH₄)₂HPO₄ und 50 mL MgSO₄·7 H₂O

(1 M). Die Fermentation wurde nach ca. 21 h beendet und die Zellen bei 10000 U/min, 4°C für 20 min abzentrifugiert. Zur Lagerung der Biofeuchtmasse wurde diese proportioniert und bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Zellaufschluss

Das geerntete Pellet wurde für den Zellaufschluss in Tris-HCl-Puffer (50 mM, 150 mM NaCl, pH 7,2) auf eine Endkonzentration von ca. 20% (w/v) resuspendiert und mittels eines Potters homogenisiert. Nach der Zugabe von PMSF (1 mM), MgCl₂ (15 mM), CaCl₂ (15 mM) sowie DNase und anschließender Homogenisierung erfolgte der Zellaufschluss über Ultraschall (Branson Sonifier 250, Genf, Schweiz) auf Eis. Mit einer Leistungsabgabe von 100 W und einem Arbeitsintervall von 35% wurden die Zellen für zwei Minuten beschallt und anschließend für eine Minute pausiert. Nach 6-8 Beschallungszyklen wurden die Zelltrümmer und unlöslichen Proteine bei 17000 U/min für 45 min bei 4°C abzentrifugiert. Zur Isolierung der löslichen Proteine wurde das Lysat für die weitere Proteinreinigung verwendet.

Die unlöslichen Proteine (*inclusion bodies*), die sich mit den Zelltrümmern im Pellet befanden, wurden durch Zusatz von geeigneten Detergenzien in Lösung gebracht (2.2.3.4) und nach proteolytischem Verdau mit Ameisensäure (2.2.3.5) weiter aufgereinigt.

2.2.3.4 Solubilisierung

Zur Überprüfung der Löslichkeitseigenschaften der *inclusion bodies* in Detergenzien wurde das unlösliche Fusionsprotein trxA-His-NcoI-mHD6 mit unterschiedlichen Detergenzien versetzt. Die nach dem Zellaufschluss erhaltene unlösliche Fraktion wurde mit ddH₂O auf eine Endkonzentration von 2 mg/mL resuspendiert. Jeweils 1 mL der Zellsuspension wurde abzentrifugiert und die Löslichkeit des Pellets jeweils in CHAPS (0,2%), LDAO (0,5%), SDS (2%) und Lauroylsarcosine (0,3%) in zwei verschiedenen Puffersystemen (50 mM KPi pH 7,5, 300 mM NaCl und 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7,5) untersucht. Nach vollständiger Resuspension wurden die Zellsuspensionen bei 4°C unter Rotation für ca. 4 h inkubiert. Darüber hinaus wurde das Fusionsprotein auf die Löslichkeit in Triton X-100 (0,2%) in beiden Puffersystemen untersucht. Nach der Zentrifugation (14000 U/min, 4°C, 10 min) wurde der Überstand abgenommen und die Pellets in PBS-Puffer gewaschen. Die Resultate der Solubilisierung wurden über SDS-PAGE (2.2.4.1) und Western Blot (2.2.4.2) analysiert.

Die Solubilisierung des mHD5-Tetramers wurde in den Detergenzien Harnstoff, Guanidinhydrochlorid (GuHCl) und Lauroylsarcosine untersucht. Nach Aufschluss (2.2.3.3) und anschließender Waschschrte der Zellen wurden die Zellen in ddH₂O auf eine Endkonzentration von 2 mg/mL gelöst und zu 1 mL aliquotiert. Nach Zentrifugation (14000 U/min, 4°C, 10 min) wurde die resultierenden Pellets (2 mg) anschließend in drei verschiedenen Puffersystemen (50 mM Citrat pH 4,0, 50 mM Tris-HCl pH 7,8 und 50 mM CAPS, pH 11,5) unter Zusatz von Lauroylsarcosine (0,3% und 0,9%), GuHCl (2 M und 6 M) sowie in Harnstoff (2 M und 8 M) bis zur vollständigen Suspension resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 1 h unter Rotation bei Raumtemperatur. Nach Abtrennung der löslichen Fraktion wurde diese über SDS-PAGE (2.2.4.1) analysiert, sowie die Proteinkonzentration der löslichen Fraktion mittels BCA bestimmt (2.2.4.3).

Die präparative Solubilisierung der Fusionsproteine trxA-His-mHD5 und trxA-His-NcoI-mHD6 und des Tandem-Proteins mHD5-Tetramer erfolgte nach Herstellervorschrift des Protein Refolding Kits (Merck Millipore, Darmstadt). Die abgetrennten *inclusion bodies* wurden in 1x Waschpuffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7,5) resuspendiert und mittels eines Potters homogenisiert. Die löslichen Kontaminanten wurden durch Zentrifugation bei 8900 U/min und 4°C für 10 min abgetrennt. Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet erneut gewaschen. Insgesamt wurden mindestens drei Waschschriffe durchgeführt bzw. bis der Überstand klar war. Anschließend wurden die gewaschenen *inclusion bodies* im Solubilisierungspuffer (50 mM CAPS, 0,3% Lauroylsarcosine, 1 mM DTT, pH 11) resuspendiert und für 15-45 min bei RT inkubiert. Ungelöste Proteine wurden durch eine Zentrifugation (17000 U/min, 4°C, 30 min) abgetrennt.

2.2.3.5 Fällung der Fusions- und Tandem-Proteine

Die Fällung der solubilisierten Zielproteine (Fusionsproteine und Tandem-Proteine) wurde über isoelektrische Präzipitation und Präzipitation mit Isopropanol durchgeführt. Durch vorsichtiges Versetzen des Solubilisats unter Rühren mit konzentrierter HCl wurde der pH-Wert von pH 11 kontrolliert gesenkt. Die Überprüfung des pH-Wertes erfolgte simultan mittels pH-Elektrode. Am isoelektrischen Punkt (pI) des jeweiligen Zielproteins wurden die Zielproteine gefällt und durch Zentrifugation (8900 U/min, 15 min, 4°C) vom Überstand abgetrennt.

Die Fällung der Zielproteine mit Isopropanol erfolgte durch Zusatz von reinem Isopropanol zum Solubilisat auf eine Endkonzentration von 85% (v/v) und anschließender Inkubation über Nacht bei -80°C. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation bei 4°C und 8900 U/min für 30 min gewonnen. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat zweimal in gekühltem Ethanol (96%) gewaschen und zentrifugiert (8600 U/min, 15 min, 4°C).

2.2.3.6 Proteolyse mit Ameisensäure

Das Präzipitat der Isopropanolfällung (2.2.3.5) des Fusionsproteins trxA-His-NcoI-mHD6 und des Tandem-Proteins mHD5-Tetramer wurde in 50%-iger Ameisensäure auf eine Endkonzentration von ca. 20 mg/mL resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 50°C für ca. 48 h. Anschließend wurde die Proteolysemischung mit dem zweifachen Volumen an ddH₂O verdünnt und weiter aufgereinigt. Der Verlauf des proteolytischen Verdauens wurde über Tris-Tricin-Gelelektrophorese (2.2.4.1) und über RP-HPLC kontrolliert (2.2.4.4).

2.2.3.7 Ni²⁺- Affinitätschromatographie

Das lösliche Fusionsprotein trxA-His-mHD5 wurde über eine *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC) an einem FPLC-System ÄKTAPurifier bzw. ÄKTAExplorer (GE Healthcare, Freiburg) aufgereinigt. Zur präparativen Aufreinigung wurde jeweils das Lysat einer 400 mL Kultur eingesetzt. Eine 5 mL HisTrap FF Säule (GE Healthcare, Freiburg) wurde mit 5 Säulenvolumen (CV) an Bindepuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,2) äquilibriert. Ca. 25 mL Lysat wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 mL/min aufgetragen und unspezifisch gebundene Proteine mit 10 CV an Bindepuffer von der Säule gewaschen. Schwach bindende *E. coli*-eigene Proteine wurden durch Zusatz von 50 mM Imidazol über einen Stufengradient (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,2, 50 mM Imidazol) über 7 CV mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 mL/min von der Säule verdrängt. Die Elution des Zielproteins wurde durch einen Stufengradienten (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,2, 187,5 mM Imidazol) über 10 CV erhalten. Anschließend wurden stärker bindende Proteine über 5 CV an Elutionspuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,2, 250 mM Imidazol) entfernt. Die Fraktionierung wurde anhand der UV-Absorption bei 280 nm durchgeführt. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereint und anschließend über Sephadex G10 (GE Healthcare, Freiburg) an einem FPLC-System ÄktaExplorer (GE Healthcare, Freiburg) entsalzt. Dazu wurde Sephadex G10 (XK 26/40, CV=125 mL) mit 3 CV Entsalzungspuffer (100 mM NH₄OAc, pH 4,2) äquilibriert und die Probe (Probenvolumen 20% des Säulenvolumens) bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 mL/min gegen 20 mM NH₄OAc, pH 4,2 entsalzt. Die entsalzten Proteinfractionen wurden bei 280 nm detektiert, vereint und in N_{2(l)} schockgefroren. Für den proteolytischen Verdau mit Ameisensäure (2.2.3.5) wurden das Zielprotein zuvor gefriergetrocknet (2.2.3.13).

2.2.3.8 Ionenaustauschchromatographie und Ni²⁺-Affinitätschromatographie zur Isolierung von P-mHD5, P-mHD5-D und P-W-mHD6

Zur Isolierung der Zielpeptide nach Proteolyse der Fusionsproteine trxA-His-mHD5 und trxA-His-NcoI-mHD6 und des Tandem-Proteins mHD5-Tetramer wurde die IMAC eingesetzt. Für die Isolierung des Zielpeptids P-mHD5 aus trxA-His-mHD5 wurde darüber hinaus die Ionenaustauschchromatographie durchgeführt.

Das Fusionsprotein trxA-His-mHD5 (*pI* 5,94, His₆-Tag) bzw. das verdaute Fusionsprotein „trxA-His-D“ (*pI* 5,18; His₆-Tag) und dessen resultierendes Zielpeptid P-mHD5 (*pI* 9,00) wurden über einen Kationentauscher getrennt. Dazu wurde das Proteolysegemisch nach dem Verdau mit Ameisensäure (2.2.3.6) zunächst über Sephadex G10 (XK 26/40, CV=125 mL) in den entsprechenden Puffer umgepuffert. Die Säule wurde mit 5 CV an Puffer (20 mM Tris, pH 6,8) äquilibriert und die Proteinlösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 mL/min aufgetragen und gegen den Puffer umgepuffert. Die Fraktionierung erfolgte anhand der UV-Absorption bei 280 nm. Eine SP 650M 1 mL-Säule (Tosoh Bioscience, Stuttgart) wurde mit Bindepuffer (20 mM Tris, pH 6,8) über 5 CV äquilibriert. Die fraktionierte Proteinlösung wurde anschließend mit einer Flussgeschwindigkeit 1 mL/min aufgetragen. Schwach bindende Peptide wurden mit 7 CV abgetrennt. Über einen linearen Gradienten gegen den Elutionspuffer (20 mM Tris, pH 6,8, 1 M NaCl) über 10 CV erfolgte die Elution. Anschließend wurde die Säule über 3 CV mit Elutionspuffer gewaschen.

Für die Trennung über IMAC erfolgte die Entsalzung der Proteolysemischung entsprechend gegen den Bindepuffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,2). Eine HisTrap 5 mL-Säule (GE Healthcare, Freiburg) wurde mit 5 CV an Bindepuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 mL/min aufgetragen und schwach bindende Proteine mit 10 CV an Bindepuffer abgetrennt. Die Elution der bindenden Proteine erfolgte in einem Stufengradienten über 10 CV an Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,2). Die Fraktionierung erfolgte anhand der UV-Absorption bei 280 nm.

Der Durchlauf der Isolierung über IMAC bzw. die Eluat-Fraktion des Kationenaustauschers wurde anschließend über Sephadex G10 entsalzt. Dazu wurde die Säule XK 26/40 (CV=125 mL) mit 100 mM NH₄OAc (pH 4,2) äquilibriert, die zu entsalzende Fraktionen mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 mL/min aufgetragen und entsalzt.

Für die Isolierung der Zielpeptide P-W-mHD6 und P-mHD5-D, ausgehend des Proteolysegemisches der aus *inclusion bodies* solubilisierten Fusionsprotein trxA-His-NcoI-mHD6 bzw. mHD5-Tetramer, erfolgten über IMAC unter denaturierenden Bedingungen. Dazu wurde das jeweilige Proteolysegemisch nach dem Verdau mit Ameisensäure (2.2.3.6) über Sephadex G10 (XK 26/40, CV=125 mL) in den entsprechenden Puffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,15% Lauroylsarcosine, pH 8,3) umgepuffert. Die Säule wurde mit 5 CV an Puffer äquilibriert und die Proteinlösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 mL/min aufgetragen und umgepuffert. Die Fraktionierung erfolgte anhand der UV-Absorption bei 280 nm. Die fraktionierte Proteinlösung wurde anschließend über IMAC aufgetrennt. Eine HisTrap 5 mL-Säule wurde mit Bindepuffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,15% Lauroylsarcosine, pH 8,3) über 5 CV äquilibriert. Der Auftrag der umgepufferten Probe erfolgte mit 3 mL/min. Schwach gebundenes P-W-mHD6 bzw. P-MHD5-D und weitere schwachbindende Proteine wurden mit Bindepuffer über 7 CV abgetrennt und gesammelt. Die Elution der bindenden Proteine erfolgte mit Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,3% Lauroylsarcosine, pH 8,3, 250 mM Imidazol) über 7 CV. Die jeweilige Durchlaufaktion wurde anschließend über Sephadex G10 (XK 26/40, CV=125 mL) mit 100 mM NH₄OAc (pH 4,2) bei 10 mL/min entsalzt.

2.2.3.9 Expression in *P. pastoris*

2.2.3.9.1 Fed-Batch-Fermentation in *P. pastoris*

In einem 50 mL-Polypropylenröhrchen wurden 10 mL YPP-Medium, das den entsprechenden Selektionsmarker Zeocin (100 µg/mL) enthielt, mit jeweils einer Einzelkolonie pPICZαA_mHD5, pPICZαA_HD5 und pPICZαA_mHD6 in *P. pastoris* X-33 transformiert, angeimpft und für ca. 24 h bei 30°C und 180 U/min kultiviert (Vorkultur I). Anschließend wurden 200 mL frisches YPP-Medium (Zeocin 100 µg/mL) in einem 2 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane überimpft und bei 30°C und 180 U/min im Schüttelinkubator bis auf eine OD₆₀₀ ~ 20-25 weiter inkubiert (Vorkultur II).

Die Kultivierung der transformierten *P. pastoris*-Zellen erfolgten für die Konstrukte pPICZαA_mHD5, pPICZαA_HD5, pPICZαA_mHD6 codierend für mHD5, Prepro-HD5 und mHD6 jeweils im 4 L bzw. 5 L-Maßstab in einem 7,5 L-Labfors-Bioreaktor (Infors, Bottmingen, Schweiz). Für die Gewinnung des mHD5 erfolgte außerdem ein Upscaling des

Material und Methoden

Prozesses in einem 42 L-Bioreaktor (Bioengineering AG, Wald, Schweiz) in den 20 und 25 L-Maßstab.

Für die Kultivierung in den verschiedenen Bioreaktoren wurde Basalsalzmedium verwendet. Dem Medium wurde jeweils 0,87 mg/L steril filtriertes Biotin und 4,35 mg/L PTM1-Lösung zugegeben. Für die Kultivierung im Bioreaktor wurde das Fermentationsmedium mit der Vorkultur II auf eine $OD_{600} \sim 0,4$ inokuliert und für ca. 20 h bei 30°C inkubiert, anschließend erfolgte eine Temperatursenkung auf 22-23°C. Der pH-Wert des Mediums wurde über eine pH-Elektrode kontrolliert und durch Zugabe von NH_4OH (28%) und H_3PO_4 (10%) auf pH 5,0 konstant gehalten. Für die Kultivierungsprozesse wurde im 5 L-Reaktor die Belüftungsrate auf 8 L/min und die Rührerdrehzahl auf 800 U/min eingestellt. Für die Prozesse im 42 L-Reaktor wurde die Belüftungsrate auf 25 L/min und die Rührerdrehzahl auf 500-550 U/min entsprechend eingestellt. Nach dem vollständigen Verbrauch des Glycerols (5% (w/v)) im Medium erfolgte nach einer kurzen „Hungerphase“ die Fütterung mit 0,5% (v/v) Methanol, dem zuvor 6 mL/L PTM1-Lösung zugesetzt wurde. Nach Verbrauch des Methanols in der Fermentationsbrühe, das durch den spontanen Anstieg des gelösten Sauerstoffgehalts (pO_2 -Wert, Sauerstoffpartialdruck bzw. DO-Wert, *dissolved oxygen*) detektiert wird, erfolgte die automatische Zugabe von 16 bzw. 20 g MeOH (6 mL/L PTM1-Lösung) zu 4 L bzw. 5 L Fermentationsmedium. Für die Fermentationsüberstände 20 L und 25 L wurden entsprechend 80 g bzw. 100 g MeOH (6 mL/L PTM1-Lösung) zugefüttert. Die Kontrolle der Temperatur, Belüftungsrate, Rührerdrehzahl, pH-Wert und Antischaumzugabe wurde mittels der IRIS Kontrollsoftware (Infors, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Durch die Integration einer Waage mit der IRIS Kontrollsoftware wurde die Zugabe des Methanols gesteuert. Die Zugabe des Antifoams 204 wurde über eine Antifoam-Elektrode reguliert. Nach einer Prozessdauer von 215 bis 360 h wurden die Fermentationen im 5 L-Maßstab beendet und die Zellen durch Zentrifugation (15900 g, 30 min, 4°C) abgetrennt. Die Prozesszeit für die Herstellung von mHD5 im 20-25 L Maßstab betrug 113 bis 216 h. Der Fermentationsüberstand, der das sekretierte Zielpeptid enthielt, wurde anschließend über eine 10 kDa-Membran konzentriert, gegen 20 mM NH_4OAc (pH 4,2) diafiltriert (2.2.3.11) und anschließend über die Kationenaustauschchromatographie (2.2.3.12) aufgereinigt.

2.2.3.9.2 Fed-batch-Fermentation in *P. pastoris* im 1 L-Maßstab

Für die Untersuchung des Einflusses des Mediums und des Gelöst-Sauerstoff-Gehalts auf die Prozessierung des humanen α -Defensins 5 wurden vier Fermentationen (jeweils 0,6 L) in 1 L-Multifors-Bioreaktoren (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) parallel betrieben.

In einem 50 mL Polypropylenröhrchen wurden 5 mL YPP-Medium mit Zeocin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mit einer *P. pastoris* Einzelkolonie, transformiert mit pPICZ α A_mHD5, angeimpft, für ca. 24 h bei 30°C und 180 U/min kultiviert (Vorkultur I). Anschließend erfolgte das Überimpfen in 200 mL frisches YPP-Medium (Zeocin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in einem 2 L-Erlenmeyerkolben mit Schikane. Am Folgetag wurden die vier Fermenter mit dem Volumen von jeweils 600 mL auf eine Start-OD₆₀₀ von $\sim 0,4$ inokuliert. Die Fermentationsprozesse in den Reaktoren Multifors M1 und M2 wurden mit Basalsalzmedium (BSM) kultiviert, in M3 und M4 in Komplexmedium BMGY.

Die Temperatur der vier Fermenter wurde auf 23°C und der pH-Wert der Fermentationsbrühe durch Zugabe von NH₄OH (28%) und H₃PO₄ (10%) auf pH 5,0 konstant gehalten. Die Belüftungsrate wurde jeweils auf 1,2 L/min und die Rührerdrehzahl auf 800 U/min eingestellt. Die Fütterung mit 0,5% (v/v) Methanol erfolgte analog zum 5 L bzw. 25 L Maßstab nach jedem Anstieg des DO-Wertes mit 1,4 g MeOH (6 mL/L PTM1-Lösung).

Die Reaktoren M2 (BSM) und M4 (BMGY) wurden jeweils mit Sauerstoff zusätzlich begast. Die Sauerstoffbegasung wurde über eine Sauerstoffzufuhr von reinem Sauerstoff in die Zuluft eingestellt. Nach 237 h Prozesszeit wurden die Zellen, die nicht mit Sauerstoff begast wurden, geerntet. Für die Fermentationen unter Sauerstoffbegasung erfolgte die Ernte bereits nach 150 bzw. 192 h. Die Fermentationsüberstände wurden anschließend über Tangentialflussfiltration konzentriert und diafiltriert (2.2.3.11).

2.2.3.10 *Messung der Optischen Dichte*

Für die Messung der optischen Dichte (OD₆₀₀) wurden im Verlauf der Fermentationsprozesse täglich Proben gezogen. Die Messung erfolgte nach entsprechender Verdünnung mit ddH₂O am Spectrophotometer (Ultrospec 3000, Amersham Biosciences, Freiburg). Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Biofeucht- (BFM) und Biotrockenmasse (BTM). Dazu wurden 5 mL Fermentationsüberstand für 15 min bei 3500 g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 mL ddH₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (15 min,

3500 g, 4°C) wurde das Pellet gewogen. Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden entsprechend der BFM-Bestimmung verfahren. Das Pellet wurde abschließend bis zur Konstanz der Masse bei 100°C getrocknet. Alle Messungen (OD₆₀₀, BFM, BTM) wurden jeweils als Triplikate durchgeführt.

2.2.3.11 Tangentialflussfiltration

Das sekretierte Peptid (mHD5, Prepro-HD5, mHD6), das im Überstand der Fermentationsbrühe enthalten war, wurde zunächst über eine Tangentialflussfiltration unter Einsatz einer 0,22 µm Membran (Pelicon Mini Casette, 0,093 m²) filtriert. Das Filtrat wurde anschließend über eine 10 kDa-Ultrafiltrationsmembran (OMEGA, Millipore) auf das 10-fache einkonzentriert und dreimal mit demselben Volumen an Bindepuffer (20 mM NH₄OAc, pH 4,2) diafiltriert. Abschließend wurde das Konzentratvolumen erneut auf das zweifache Volumen einkonzentriert und dreimal mit demselben Volumen an Puffer (20 mM NH₄OAc, pH 4,2) gespült. Anschließend erfolgte die Reinigung über Kationenaustauschchromatographie (2.2.3.12).

2.2.3.12 Kationenaustauschchromatographie

Das Zielpeptid, das sich in der Konzentratfraktion der 10 kDa-Filtration befand, wurde über Kationenaustauschchromatographie an einem FPLC-System ÄktaExplorer (GE Healthcare, Freiburg) aufgereinigt. Für die Reinigung von mHD5 wurde die XK 26/40-Säule (111 mL Säule), gepackt mit SP 650M (Tosoh Bioscience, Stuttgart), mit Bindepuffer (20 mM NH₄OAc, pH 4,2) äquilibriert und chargenweise mit 40-45 mL Konzentrat mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 mL/min beladen. Unspezifisch bindende Proteine wurden mit 3 CV Bindepuffer (20 mM NH₄OAc, pH 4,2) entfernt, während schwach bindende wirtseigene Proteine im Stufengradient mit 250 mM und 400 mM NaCl über jeweils 3 CV abgetrennt wurden. Das humane α-Defensin 5 konnte abschließend mit 4 CV Elutionspuffer (20 mM NH₄OAc, pH 4,2, 1 M NaCl) eluiert werden. Die Aufreinigung des mHD6 erfolgte analog zu mHD5 mit einem Stufengradient von 150 mM und 1 M NaCl. Die Fraktionierung und das Vereinen der Fraktionen wurden anhand der UV-Absorption bei 220 nm durchgeführt. Fraktionen, die das Zielpeptid enthielten, wurden anschließend über Sephadex G10 (XK 50/20, 275 ml CV) mit 100 mM NH₄OAc, pH 4,2 entsalzt. Der

Probenauftrag erfolgte mit jeweils ca. 10-15% des Säulenvolumens an Elutionsfraktion mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 mL/min. Fraktionen der entsalzten Zielpeptide wurden anhand des UV-Signals bei 280 nm vereint und über Gefriertrocknung konzentriert (2.2.3.13).

2.2.3.13 Gefriertrocknung

Durch die Gefriertrocknung wird der Proteinlösung das enthaltene Wasser schonend entzogen. Dieser Methode liegt das Prinzip der Sublimation zu Grunde. Das entsalzte Fusionsprotein bzw. Zielpeptid, die sich nach der Umpufferung in volatilen Ammoniumacetat-Puffer (20 mM bzw. 100 mM, pH 4,2) befanden, wurden in Petrischalen überführt und bei -80°C bzw. mit flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurden die Petrischalen in die auf ca. -89°C gekühlte Gefriertrocknungsanlage (Alpha 2-4 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode) gebracht, bis zur vollständigen Trocknung (100-140 h) lyophilisiert, anschließend in Glasgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Proteinbiochemische Charakterisierung

2.2.4.1 SDS-PAGE nach Laemelli^[105] und Tricin-SDS-Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow^[106]

Zur Bestimmung des Molekulargewichts und der Reinheit der rekombinanten Fusionsproteine und antimikrobiellen Peptide wurden je nach Bedarf denaturierende SDS-Gele (15%) oder Tris-Tricin-Gele (16,5%) verwendet. Für die Expressionsstudie wurden die Proben jeweils mit $2,5 \times 10^8$ Zellen aliquotiert (OD_{600} von 1 entspricht ca. 1×10^9 Zellen/mL), abzentrifugiert und das Pellet in 50 μ L SDS-Probenpuffer (2x) resuspendiert. Die Proteine wurden anschließend für 10 min bei 95°C denaturiert, kurz abzentrifugiert und jeweils ca. 15 μ g über SDS-PAGE aufgetrennt. Gegebenenfalls wurden die Proben zuvor über einen Evaporator aufkonzentriert. Als Molekulargewichtstandards wurde ein PageRuler Prestained Protein Ladder (10-170 kDa) bzw. PageRuler Prestained Protein Ladder (10-170 kDa) (2.1.6) eingesetzt. SDS-Gele (15%) wurden mit SDS-Elektrophoresepuffer (1x) für ca. 1 h bei 15-25 mA und Tris-Tricin-Gele in Anoden- und Kathodenpuffer für ca. 4-6h in einer Hoefer SE 250 Elektrophoresekammer (Hoefer, San Francisco, USA) betrieben. Zur Färbung der Proteinbanden wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung über 2 h eingelegt. Die Entfärbung erfolgte anschließend mit Entfärbelösung. Schwach exprimierte Proteine wurden über die empfindlichere Silberfärbemethode mit dem Pierce Silver Stain Kit (2.1.2) nach Angaben des Herstellers angefärbt. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Quantum ST 4 (Vilber Lourmat, Eberhardzell).

SDS-Gele (15%)

Trenngel (15%)		Sammelgel (4%)	
Trenngel-Puffer (4x)	7,5 mL	Sammelgel-Puffer (4x)	2,5 mL
SDS (10%)	0,3 mL	SDS (10%)	0,1 mL
ddH ₂ O	7,1 mL	ddH ₂ O	6 mL
Acrylamid (40%)	15 mL	Acrylamid (40%)	1,33 mL
APS (20%)	160 μ L	APS (20%)	60 μ L
TEMED	10 μ L	TEMED	5 μ L

Die Angaben richten sich für die Herstellung von 4 Mini SDS-Gelen.

Tris-Tricin-Gele (16,5%)

	Trenngel 1 (16,5%)	Trenngel 2 (10%)	Sammelgel (4%)
Tricin-Gelpuffer (3x)	6 mL	3 mL	1,83 mL
Glycerol	1,9 mL	-	-
ddH ₂ O	0,6 mL	3,57 mL	4,842 mL
Acrylamid (40%)	9 mL	2,43 mL	0,678 mL
APS (20%)	60 µL	30 µL	60 µL
TEMED	6 µL	3 µL	6 µL

Die Angaben richten sich für die Herstellung von 4 Mini Tris-Tricin-Gelen.

2.2.4.2 Western Blot

Als spezifischen Nachweis der exprimierten Fusionsproteine und Zielpeptide mHD5 und mHD6 wurden diese über den Western Blot mit spezifischen Anti-His- bzw. Anti-HD5- und Anti-HD6-Antikörper detektiert. Das Blotten der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte für 45 min bei 15 V in einem Trans-blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München). Primärer Anti-His-Antikörper (1:10.000 in TBS-T, 4% Milchpulver) wurde für den Nachweis der Thioredoxin-Fusionsproteine (trxA-His-mHD5, trxA-His-NcoI-mHD6, mHD5-Tetramer) eingesetzt, während für deren Proteolyseprodukt und für in *P. pastoris* sekretierten Peptide die spezifischen Antikörper Anti-HD5 und Anti-HD6 (1:200 in TBS-T, 4% Milchpulver) eingesetzt wurden. Zur Detektion wurden die sekundären Antikörper Goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate bzw. Goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) conjugate verwendet. Zur Visualisierung wurde das Kit Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet und über Fusion SL image acquisition system (Vilber Lourmat, Eberhardzell) analysiert und dokumentiert.

2.2.4.3 Quantifizierung der Gesamtprotein- und Peptidkonzentration

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration einer Lösung wurde die BCA-Methode eingesetzt. Diese beruht auf der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Proteine in alkalischer Lösung. Die Bichinoinsäure (BCA) komplexiert die entstandenen Cu⁺-Ionen. Der resultierende violette Komplex kann anschließend bei 562 nm spektrometrisch detektiert werden. Die Durchführung erfolgte in Mikrotiterplatten nach Angaben des Herstellers mit dem BCA Protein Assay Kit (2.1.2). Die Messung der Absorption bei 562 nm erfolgte an

einem Spektramax 340PC Mikrotiterplattenlesegerät (Molecular Devices GmbH, Biberach). Zur Erstellung der Kalibriergerade wurde eine Verdünnungsreihe von BSA (0-2 mg/mL) eingesetzt. Jede Probe wurde als Triplikat jeder Verdünnung gemessen.

Zur Quantifizierung der Peptidkonzentration (mHD5, mHD6) im Fermentationsüberstand von *P. pastoris* bzw. in den Fraktionen der Reinigungsschritte wurden die Proben abzentrifugiert (14000 U/min, 4°C, 5 min), filtriert (0.2 µm) und über RP-HPLC an einem HPLC System (Agilent, Santa Clara, USA) analysiert. Zur Auftrennung der Proteine wurde eine TSKgel ODS-100V Säule (4,6 mm x 150 mm, 3 µm Partikelgröße, Tosoh Bioscience, Stuttgart) mit Lösungsmittel A (90% ddH₂O, 0,1% TFA) und B (10% ACN, 0,1%TFA) äquilibriert und über einen Gradient mit Lösungsmittel B 10-60% (ACN, 0,1% TFA) in 40 min mit einer Flussrate von 1 mL/min eluiert. Die Detektion erfolgte über einen Dioden Array Detektor bei 220 nm. Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgte jeweils mit synthetischen HD5 und HD6 (0-1 mg/mL).

2.2.4.4 RP-HPLC

Für die Überprüfung der Oxidationsform und Reinheit des rekombinanten Defensins durch den Vergleich der Retentionszeit und des Chromatogramms der Referenz wurden die Peptide über RP-HPLC an einem HPLC System Agilent 1200 series (Agilent, Santa Clara, USA) analysiert. Jeweils 10 µL (bis max. 100 µL) der zu analysierenden Probe wurden über eine TSKgel ODS-100V (4,6 mm x 150 mm, 3 µm Partikelgröße, Tosoh Bioscience, Stuttgart) über einen linearen Gradient 10-60% ACN (0,1% TFA) und einer Flussrate von 1 mL/min über 40 min aufgetrennt. Als Referenz wurden die synthetischen Defensine eingesetzt und die Retentionszeiten verglichen. Die Detektion erfolgte über einen Dioden Array Detektor bei 220 nm.

2.2.4.5 Antimikrobielle Aktivitätstests

Für den Nachweis der antimikrobiellen Aktivität wurde sowohl die Messung der optischen Dichte als auch die CFU-Bestimmung (*colony-forming unit*, Koloniebildende Einheit) angewendet. Für die CFU-Methode wurde eine Kultur von *S. carnosus* in MHB-Medium bei 37 °C und 180 U/min über Nacht inkubiert. Nach Bestimmung der OD₆₀₀ wurde die Kultur abzentrifugiert und das Pellet in sterilem 10 mM NaPi pH 7,2 auf eine OD₆₀₀ von 0,05 resuspendiert.

Jeweils 100 µL der Kultur (OD₆₀₀ von 0,05) wurde in einer 96 Well-Mikrotiterplatte vorgelegt, wobei die erste Reihe mit 180 µL befüllt wurde. 20 µL einer 10x Stock-Lösung des rekombinanten Defensins (synthetisches Peptid als Kontrolle) wurden mit der vorgelegten Kultur (180 µL) resuspendiert. Anschließend wurden 100 µL entnommen und mit 100 µL einer weiteren vorgelegten Kultur resuspendiert (1:1 Verdünnung). Alle weiteren Verdünnungen wurden ebenfalls als 1:1 Verdünnung der Ausgangskonzentration mit den vorgelegten Kulturen durchgeführt. Im letzten Ansatz wurden die 100 µL verworfen, so dass die letzte Probe einer Peptidkonzentration von 0 µg/mL entsprach (Negativkontrolle). Zusätzlich wurde als Negativkontrolle ebenfalls die Zugabe von 20 mM NH₄OAc (pH 4,2) bzw. ddH₂O zur Kultur überprüft um deren Einfluss auf die Abnahme der Koloniebildenden Einheiten auszuschließen. Alle Verdünnungen wurden mindestens als Duplikate durchgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde mit einem sterilen Deckel geschlossen und die Proben bei 37°C für 1 h bei 500 U/min inkubiert (TiMix Control, Edmund Bühler GmbH, Hechingen). Für jede Konzentration wurde anschließend eine Verdünnungsreihe (10⁻¹-10⁻⁸) in 10 mM NaPi erstellt, 100 µL jeder Verdünnung als Duplikat auf MHB-Agarplatten ausplattiert und für ca. 18 h bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation wurden die gewachsenen Kolonien bestimmt und auf die CFU/mL umgerechnet.

Als weitere Untersuchungsmethode der antimikrobiellen Aktivität erfolgte die Messung der optischen Dichte. Hierfür wurde *S. carnosus* in MHB-Medium und *M. luteus* in HNB-Medium mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinanten mHD5 in 96 well-Mikrotiterplatten inkubiert. Eine Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstamms wurde mit MHB-bzw. HNB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt. Entsprechend der CFU-Methode erfolgte die 1:1 Verdünnung 10x Stock-Lösung des rekombinanten Defensins (synthetisches Peptid als Kontrolle) in Mikrotiterplatten. Die Mikrotiterplatte wurde mit

einem sterilem Deckel abgedeckt und die Proben bei 37°C für über Nacht bei 500 U/min inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte am Spektramax 340PC Mikrotiterplattenlesegerät (Molecular Devices GmbH, Biberach).

Die Versuche zur Messung der optischen Dichte wurden außerdem in einem 2 mL-Maßstab durchgeführt. Dazu wurde die Übernachtskultur von *S. carnosus* in MHB-Medium und *M. luteus* in HNB bei 37 °C und 180 U/min inkubiert und mit frischem, sterilem Medium auf die OD₆₀₀ 0,1 in einem Endvolumen von 2 mL verdünnt. Zu dieser Verdünnung wurde eine 10x Stock-Lösung der Peptidlösung gegeben (Endkonzentration 100 bzw. 20 µg/mL). Der Ansatz wurde bei 37°C und 180 U/min erneut inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte zum Zeitpunkt t=0 h, 4 h und 24 h nach Inkubation mit dem Zielpeptid.

2.2.4.6 Circular dichroismus Spektroskopie

Die Durchführung der Circular dichroismus (CD) Spektroskopie erfolgte mit der Unterstützung von Herrn Dr. Sebastian Leptihn (Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim, Stuttgart).

Das Lyophilisat des rekombinanten mHD5, exprimiert in *P. pastoris*, wurde in ddH₂O auf eine Endkonzentration von 500 µM gelöst und zur Aufnahme der Spektren weiter auf eine Endkonzentration von 50 µM verdünnt. Die Spektren wurden an einen J715 Spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) unter Verwendung einer Quartz Küvette (Hellma AG, Müllheim) einer Schichtdicke von 1 mm aufgenommen. Alle CD-Spektren wurden im Bereich von 185-260 nm bei Raumtemperatur mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 20 nm/min und einer Auflösung von 1 nm gemessen. Die Antwortzeit wurde auf 1 s eingestellt. Jede Messung wurde als Quadruplikat durchgeführt. Alle Spektren wurden durch Subtraktion der korrespondierenden Daten ohne Peptid (reines ddH₂O) korrigiert. Um die negative Bakterienmembran nachzuahmen wurde der Lösung SDS 1% (v/v) hinzugegeben. Die Spektren wurden ebenfalls als Quadruplikate unter den oben genannten Einstellungen aufgenommen.

2.2.4.7 Massenspektrometrische Analyse

2.2.4.7.1 PMF (Peptid-Massen-Fingerprint)-Analyse:

Das rekombinante Fusionsprotein trxA-His-mHD5, sowie das Lyophilisat des aufgereinigten rekombinanten humanen α -Defensins 5, sekretiert in *P. pastoris*, wurden über ein SDS-Gel bzw. Tris-Tricin-Gel aufgetrennt, die zu analysierenden Proteinbanden aus den Gelen ausgeschnitten und zum Nachweis der Massen an das Life Science Center (Universität Hohenheim, Stuttgart) zur Analyse gegeben. Die Durchführung der massenspektrometrische Analyse ist im Folgenden zusammengefasst.

Zur Analyse der Zielproteine wurde die Proteinbande mit Trypsin (Roche, Mannheim) nach Shevchenko *et al.*^[107] behandelt und ein „in-Gel-Verdau“ durchgeführt. Die Durchführung der Nano-LC-ESI-MS/MS Experimente erfolgte an einem ACQUITY nano-UPLC System (Waters, Milford, USA), gekoppelt an einem LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Fischer Scientific, Braunschweig). Der tryptische Verdau wurde über eine C18-Vorsäule (2 cm x 180 μ m, 5 μ m, Waters, USA) aufkonzentriert, entsalzt und anschließend über RP-HPLC (25 cm x 75 μ m BEH 130, C18, 1.7 μ m, Waters, USA) aufgetrennt. Die Elution erfolgte mittels linearen Gradienten von 1% - 50% Acetonitril in 0,1% TFA innerhalb von 90 min. Das LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer wurde unter der Kontrolle der XCalibur 2.0.7 software betrieben. Die Aufnahme der Übersichtspektren ($m/z=250-2000$) erfolgten in der Orbitrap mit einer Auflösung von 60.000 bei $m/z = 400$. Die sieben intensivsten Ionen eines Übersichtsspektrums wurden automatisch ausgewählt und in der Ionenfalle fragmentiert.

Die Identifizierung der gemessenen Massen wurde die Datenbanksuche mittels Mascot 2.3 (Matrix Science, UK) durchgeführt. Als Suchparameter wurde Trypsin als Enzym für die Fragmentierung ausgewählt, mit der Einstellung von 3 überlesenen Schnittstellen und einer Massentoleranz von 5 ppm und 0,6 Da für die fragmentierten Ionen. Carbamidomethylierung der Cysteine wurde als fixe Modifikation angegeben und Methioninoxidation als eine variable Modifikation.

2.2.4.7.2 LC-ESI-MS

Die rekombinanten, aufgereinigten humanen α -Defensine 5 und 6 wurden gefriergetrocknet (2.2.3.13) und das Lyophilisat anschließend zur Massenbestimmung an das Life Science Center (Universität Hohenheim, Stuttgart) zur Analyse gegeben. Alternativ erfolgte die Vermessung der Eluat-Proben (Kationenaustauscher) bzw. Durchlaufaktion (Entsalzung bzw. IMAC). Die Proben wurden 1:100 mit Ameisensäure (0,1%) verdünnt und 1 μ L der Verdünnung über das ACQUITY nano-UPLC System (Waters, USA) über RP-HPLC aufgetrennt (2.2.4.7.1). Zur exakten Massenbestimmung erfolgte die Spektrendekonvolution der Übersichtspektren über Xtract (Thermo Fischer Scientific, Braunschweig).

2.2.4.7.3 MALDI-TOF-MS

Molekulargewichtsbestimmungen zur Identifizierung der Zielpeptide bzw. deren Prozessierung erfolgten über MALDI-TOF-MS (Life Science Center, Universität Hohenheim, Stuttgart). Die Proben wurden 1:100 mit Ameisensäure (0,1%) verdünnt. 10 μ L der zu analysierenden Probe wurde anschließend mit Ziptip (Millipore, Darmstadt) entsalzt und mit 1 μ L der Matrix α -Cyano-4-Hydroxymizsäure (5 mg/mL in 50% Acetonitril/0,1% TFA) direkt auf das Target eluiert. Die MALDI-TOF-MS-Experimente wurden am Autoflex III MALDI-TOF-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) im (+)-Linear-Modus durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 in *E. coli*

In dieser Arbeit sollte spezieller Fokus auf die heterologe Expression der humanen α -Defensine 5 und 6 in den gängigsten etablierten Expressionssystemen gesetzt werden, um ein kostengünstiges, einfaches und robustes Herstellungsverfahren großer Mengen an antimikrobiellen Peptiden für den Einsatz in der Forschung zu gewährleisten. Eine einfache und kostengünstige Handhabung sowie kurze Expressionszeiten machen daher speziell *E. coli* als Expressionssystem interessant. Erfolgreiche Klonierungs- und Expressionsarbeiten von mHD5 aus Vorarbeiten von D. Iftime^[102] wurden für weitere Untersuchungen, Optimierungen und schließlich für die Etablierung eines geeigneten Expressionssystems für die humanen α -Defensine einbezogen.

3.1.1 Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 über Thioredoxin-Fusionsproteine

Eine Strategie zur Expression von antibakteriellen Peptiden in *E. coli* ist die Expression als Fusionsprotein.^[94] Dabei schützt der Fusionspartner sowohl das Peptid vor Proteasen als auch den Wirtstamm vor toxischen Eigenschaften des antibakteriellen Peptids während der Peptidsynthese. Zu den am meisten verwendeten Carrier-Proteinen gehört Thioredoxin. Mit seiner niedrigen Molekularmasse von ca. 12 kDa und seiner Chaperon-ähnlichen Aktivität zeigt es vielversprechende Eigenschaften zur Expression löslicher Fusionsproteine. Durch die Wahl einer geeigneten Endoprotease, die schließlich das Zielpeptid vom Carrier-Protein abspaltet und freilegt, kann unter optimalen Bedingungen das Zielpeptid N- bzw. C-terminal ohne extraterminalen Aminosäuren erhalten werden.

3.1.2 Klonierung der Thioredoxin-Konstrukte für die Expression in *E. coli*

Zur Expression der humanen Defensine in *E. coli* über Fusionsproteine wurde das bereits aus Vorarbeiten vorhandene Plasmid pET-22b(+)_trxA_mHD5^[102] für weitere Klonierungsarbeiten verwendet. Der eingesetzte Expressionsvektor pET-22b(+) verfügt über einen Promotor für die T7-RNA-Polymerase. Durch die Zugabe von IPTG kann die Transkription der T7-RNA-Polymerase induziert werden. Der Vektor verfügt außerdem über eine Ampicillin-Resistenz. Die in das Plasmid klonierten Fremdgene codieren für das Fusionsprotein trxA-mHD5, das sich aus dem Carrier-Protein Thioredoxin (trxA) und dem Zielpeptid mHD5 (*mature*-Form des humanen α -Defensins 5) zusammensetzt. Durch die eingebaute Schnittstelle Asparaginsäure-Prolin (D-P), die sich zwischen trxA und mHD5 befindet, wird nach einer sauren Hydrolyse mit Ameisensäure das Zielpeptid abgespalten. Das Gen codierend für Thioredoxin (*trxA*) wurde mit *mHD5* über eine PCR fusioniert und in pET-22b(+) über die Schnittstellen *Nde*I und *Bam*HI erfolgreich kloniert.^[102] N-terminal von *mHD5* befinden sich die Nukleotide, die für die Schnittstelle (D-P) codieren. Für die weiteren Klonierungsarbeiten wurde dieses Plasmid als Ausgangskonstrukt verwendet.

Zur einfacheren Aufreinigung des Fusionsproteins und Abtrennung *E. coli*-eigener Proteine erfolgte der Einbau eines Affinitäts-Tags für eine spezifische Affinitätschromatographie. Der Vektor pET-22b(+) verfügt bereits über einen His₆-Tag, dieser befindet sich im eingesetzten Konstrukt jedoch außerhalb des Leserahmens. Da eine Insertion des His₆-Tags am C-Terminus von *mHD5* eine weitere Endoprotease-Schnittstelle zur proteolytischen Abtrennung des His₆-Tags erfordern würde, erfolgte der Einbau des Tags innerhalb des Fusionsproteins. Das zur Verfügung stehende Plasmid pET-22b(+)_trxA_mHD5^[102] wurde in *E. coli* vervielfacht, über Minipräparation (2.2.1.1) gereinigt und durch Sequenzierung überprüft. Über eine QuikChange®-Reaktion wurde unter Verwendung der sequenzspezifischen Primer mil_trxA-His-1 und mil_trxA-His-2 der His₆-Tag an den C-Terminus des Thioredoxins-Gens (*trxA*) vor der Schnittstelle (D-P) eingebaut. Nach dem Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Dpn*I und erfolgreicher Transformation der mutierten DNA in *E. coli* XL1-blue-Zellen konnte die Isolierung des resultierenden Plasmids pET-22b(+)_trxA_His_mHD5 erfolgen. Über die Agarosegel-Elektrophorese konnte das Plasmid mit einer Größe von 5879 bp nachgewiesen werden (Abbildung 3.1). Der korrekte

Ergebnisse

Einbau des His₆-Tags wurde anschließend durch die DNA-Sequenzierung mit den Sequenzierprimer T7- und pET-RP bestätigt.

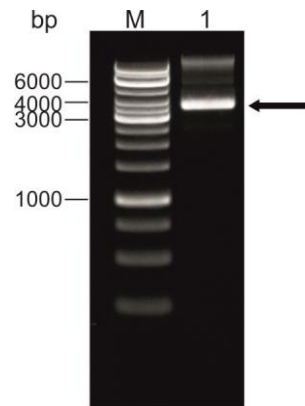


Abbildung 3.1 Agarosegel-Elektrophorese (1%) nach der QuikChange®-Reaktion zur Insertion des His₆-Tags in pET-22b(+)_trxA_mHD5.

M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 1: pET-22b(+)_trxA_His_mHD5 (5879 bp).

Abbildung 3.2 stellt schematisch die Expressionskassette des Fusionsproteins trxA-His-mHD5 dar. Der His₆-Tag befindet sich dabei zwischen *trxA* und *mHD5*, unmittelbar vor der Schnittstelle D-P. Diese Anordnung ermöglicht nach proteolytischer Spaltung des Fusionsproteins mit Ameisensäure die simultane Abtrennung des His₆-Tags mit dem Carrier-Protein Thioredoxin vom mHD5.

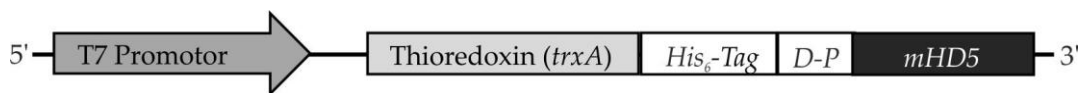


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der Expressionskassette des trxA-His-mHD5.

Die Expression des Fusionsproteins trxA-His-mHD5 in pET-22b(+) erfolgt unter der Kontrolle des T7-Promotors. Thioredoxin fungiert als Carrier-Protein zur Expression des antibakteriellen Peptids mHD5 in *E. coli*. Der Einbau des His₆-Tags dient zur Aufreinigung des Fusionsproteins über IMAC. Durch die saure Hydrolyse mit Ameisensäure kann die Proteolyse zwischen Asparaginsäure (D) und Prolin (P) erfolgen, so dass das Zielpeptid mHD5 vom Fusionsprotein abgespalten wird. Das resultierende humane α -Defensin 5 trägt am N-Terminus ein zusätzliches Prolin und erhält die Bezeichnung „P-mHD5“.

Die Klonierungsarbeiten zur Herstellung des Thioredoxin-HD6-Konstrukts in pET-22b(+) wurden ausgehend des Plasmids pET-22b(+)_trxA_His_mHD5 durchgeführt. Dazu wurde zunächst in pET-22b(+)_trxA_His_mHD5 eine *Nco*I-Schnittstelle an den N-Terminus des Gens, codierend für *mHD5*, über eine QuikChange®-Reaktion mit den Primern mil_trxA-His-NcoI 1 und mil_trxA-His-NcoI 2 eingebaut. Der Einbau der *Nco*I-Schnittstelle wurde

Ergebnisse

über den erfolgreichen Einfachverdau des Plasmids mit *NcoI* bestätigt (5882 bp) (Abbildung 3.3 a). Die korrekte Sequenz konnte über die DNA-Sequenzierung nachgewiesen werden. Dieses Konstrukt pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD5 wurde weiter für die Umklonierung eingesetzt. Das Gen codierend für *mHD5* wurde anschließend in einem Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BamHI* herausgeschnitten und das linearisierte Plasmid über Gelextraktion (2.2.1.3) aufgereinigt (5777 bp).

Ausgehend von einem PCR-Produkt, das bereits aus eigenen Vorarbeiten zur Verfügung stand^[99], konnte *mHD6* mit den sequenzspezifischen Primer mil_mHD6_NcoI_f und mil_mHD6_BamHI_r erfolgreich amplifiziert werden (2.2.1.5.1). In einem anschließenden Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BamHI* wurde das PCR-Produkt geschnitten und gereinigt. Das PCR-Fragment von ca. 120 bp wurde über Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen (Abbildung 3.3 b). Anschließend wurde das Insert *mHD6* in das linearisierte Plasmid ligiert und das Konstrukt pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD6 (5882 bp) erhalten. Der korrekte Einbau des *mHD6*-Inserts wurde über DNA-Sequenzierung bestätigt.

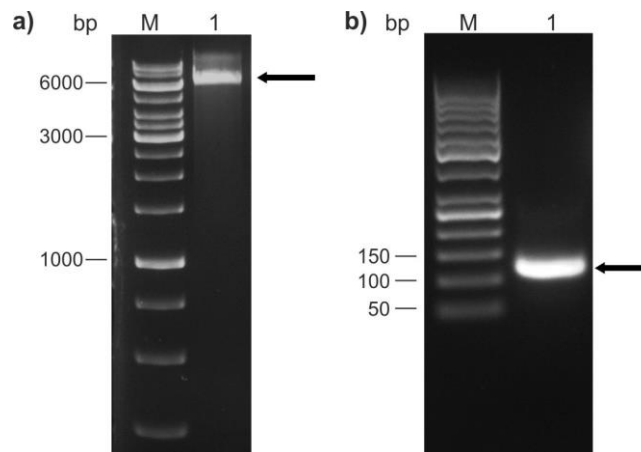


Abbildung 3.3

Agarosegel-Elektrophorese des Plasmids pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD5 nach Restriktionsverdau mit *NcoI* (a) und des PCR-Produktes *mHD6*.

- a) Agarosegel (1%) des pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD5 (5882 bp) linearisiert mit *NcoI* zur Kontrolle der erfolgreichen Insertion der *NcoI*-Schnittstelle über die QuikChange®-Reaktion. M: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 1: pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD5 linearisiert mit *NcoI*.
- b) Agarosegel (2%) des PCR-Produktes *mHD6* (~120 bp) nach Verdau mit *NcoI* und *BamHI*. M: GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 1: *mHD6* PCR-Produkt.

Ergebnisse

Die Plasmide pET-22b(+)_trxA_His_mHD5 und pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD6 codieren jeweils für die Thioredoxin-Fusionsproteine, die jeweils N-terminal zum Zielpeptid *mHD5* und *mHD6* über eine Schnittstelle für die chemische Proteolyse des Proteins mit Ameisensäure verfügen. Die Asparaginsäure-Prolin-Schnittstelle (D-P) stellt dabei die labilste Bindung bei saurer Behandlung dar.^[108] Für mHD6 bildet die eingebaute Schnittstelle *NcoI* (CCA TGG), die in-frame für Prolin (P) und Tryptophan (W) codiert, welche einen Teil der Schnittstelle für die Ameisensäure (D-P) darstellen (Abbildung 3.4). Der proteolytische Verdau mit Ameisensäure zwischen D und P führt folglich zu zwei extraterminalen Aminosäuren am N-Terminus des mHD6 (P-W-mHD6). Das humane α -Defensin 5 liegt nach erfolgreicher Proteolyse mit Ameisensäure als P-mHD5 vor.

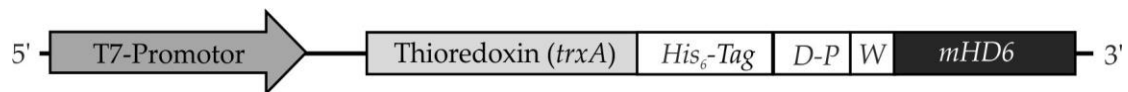


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Expressionskassette des Fusionsproteins trxA-His-NcoI-mHD6.

Die Expression des Fusionsproteins trxA-His-NcoI-mHD6 in pET-22b(+) erfolgt unter der Kontrolle des T7-Promotors. Entsprechend zum Konstrukt für mHD5 dient Thioredoxin als Fusionspartner während der His₆-Tag die Aufreinigung des Fusionsproteins über Affinitätschromatographie ermöglicht. Nach Abspaltung durch die saure Hydrolyse mit Ameisensäure zwischen Asparaginsäure (D) und Prolin (P) wird als Zielpeptid das rekombinante mHD6 als „P-W-mHD6“ erhalten.

In der nachstehenden Abbildung 3.5 sind die Schritte der Klonierungsarbeiten für die Fusionskonstrukte schematisch zusammengefasst.

Ergebnisse

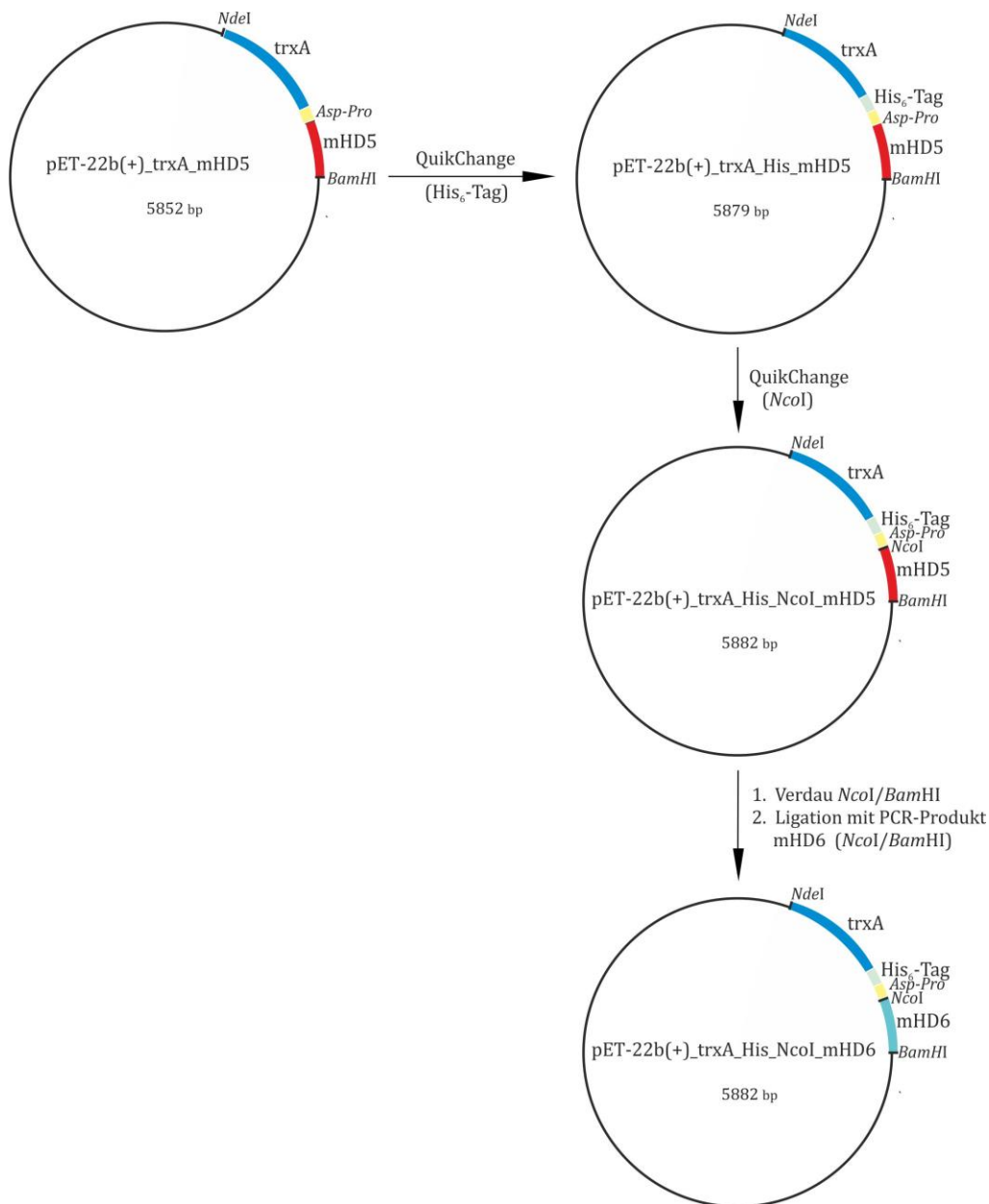


Abbildung 3.5

Schematische Übersicht der Klonierung von pET-22b(+)_trxA_His_mHD5 und pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD6.

Die Klonierung des Konstrukts pET-22b(+)_trxA_His_mHD5 erfolgte ausgehend des Plasmids pET-22b(+)_trxA_mHD5^[102] über eine QuikChange®-Reaktion zum Einbau des His₆-Tags zwischen den Nukleotiden codierend für *trxA* und *mHD5*. Über eine weitere QuikChange®-Reaktion wurde eine *NcoI*-Schnittstelle zwischen den Nukleotiden codierend für *mHD5* und der Schnittstelle für die saure Hydrolyse mit Ameisensäure (*Asp-Pro*) eingebaut.

Nach Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BamHI* konnte das Plasmid pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD5 unter Entfernung des *mHD5* linearisiert werden und der Austausch der Gene *mHD5* und *mHD6* erfolgen. Durch Ligation des *mHD6* PCR-Produkts^[99], verdaut mit *NcoI* und *BamHI*, mit dem linearisierten pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD5 konnte das Konstrukt pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD6 erhalten werden.

3.1.3 Expression der Fusionsproteine

Die Expression der beiden Fusionsproteine *trxA*-His-mHD5 (~17,4 kDa) und *trxA*-His-NcoI-mHD6 (~17,9 kDa) wurde in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3), Origami(DE3), C41(DE3) und C43(DE3) unter Kontrolle des T7-Promotors bei verschiedenen Temperaturen (25°C, 30°C und 37°C) untersucht (2.2.3.1.1). Die sogenannten Walker-Stämme C41(DE3) und C43(DE3) stellen Mutanten des *E. coli*-Stamms BL21(DE3) dar, in denen eine deutlich bessere Überexpression toxischer Proteine möglich ist.^[109] Bei den unterschiedlichen Temperaturen konnte die Expression des Fusionsproteins für mHD5 erfolgreich in allen untersuchten Stämmen durchgeführt werden. Das Fusionsprotein *trxA*-His-NcoI-mHD6 konnte nur in den Walker-Stämmen überexprimiert werden. Insgesamt zeigte sich eine bessere Stabilität der Fusionsproteine in den Walker-Stämmen, so dass der *E. coli*-Stamm C41(DE3) für die Expression der Fusionsproteine ausgewählt wurde. Abbildung 3.6 zeigt die erfolgreiche Überexpression beider Fusionsproteine in *E. coli* C41(DE3) bei 30°C, induziert mit IPTG (0,25 mM). Auf Höhe des Standards von 15 kDa ist jeweils die Zunahme von Proteinbanden in Abhängigkeit der Expressionszeit erkennbar, die den Molekulargewichten der Zielproteine *trxA*-His-mHD5 (17,4 kDa) und *trxA*-His-NcoI-mHD6 (17,9 kDa) entsprechen.

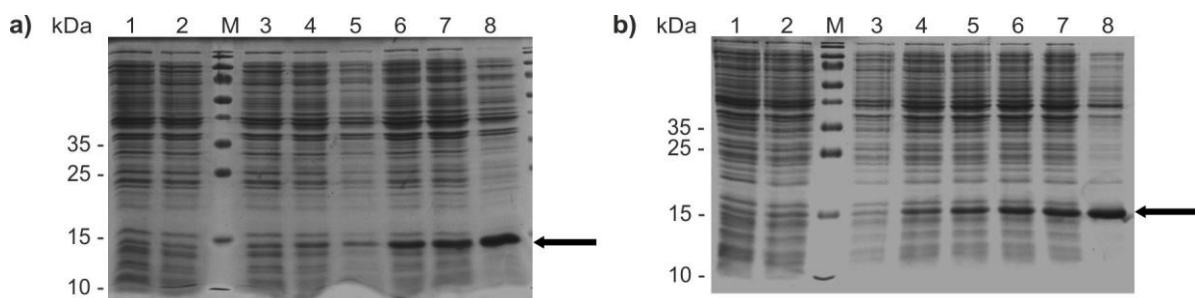


Abbildung 3.6

Expression der Fusionsproteine *trxA*-His-mHD5 und *trxA*-His-NcoI-mHD6 in *E. coli* C41(DE3).

Coomassie gefärbte SDS-Gele (15%) der Expression von *trxA*-His-mHD5 (a) und *trxA*-His-NcoI-mHD6 (b) in *E. coli* C41(DE3) bei 30°C. Als Negativkontrolle ist jeweils die Expression des *E. coli*-Stammes ohne transformiertes Plasmid aufgetragen (1).

M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 2: Expression vor Induktion mit IPTG, 3: 1 h nach Induktion mit 0,25 mM IPTG, 4: 2 h nach Induktion mit 0,25 mM IPTG, 5: 3 h nach Induktion mit 0,25 mM IPTG, 6: 4 h nach Induktion mit 0,25 mM IPTG, 7: 5 h nach Induktion mit 0,25 mM IPTG, 8: Expression üN (20 h) nach Induktion mit IPTG.

Ergebnisse

Zur Herstellung der Fusionsproteine wurde die Expression in 400 mL TB-Medium durchgeführt (2.2.3.1.1). Nach einer Expression von ca. 20 h wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet der exprimierten Fusionsproteine wurde jeweils in Tris-HCl-Puffer resuspendiert und nach Homogenisierung über Ultraschall aufgeschlossen (2.2.3.3). Nach dem Zellaufschluss zeigte die SDS-PAGE-Analyse der unterschiedlichen Fraktionen (Lysat und Zelltrümmer) jeweils eine deutliche Bande in der unlöslichen Fraktion auf Höhe von ca. 15 kDa (Abbildung 3.7 a, Spur 2; b, Spur 1). Lediglich für die Expression des trxA-His-mHD5 konnte das Fusionsprotein anteilig in löslicher Form erhalten werden (Abbildung 3.7 a, Spur 3). Die Wiederholung und Überprüfung der Expression in *E. coli* BL21(DE3), Origami(DE3) und C43(DE3) lieferten ähnliche Ergebnisse. Die Untersuchung des Einflusses erniedrigter Temperatur (17°C) und Variation der Induktorkonzentration (0,1 mM IPTG) konnte die Expression an löslichem Fusionsprotein in beiden Fällen nicht begünstigen.

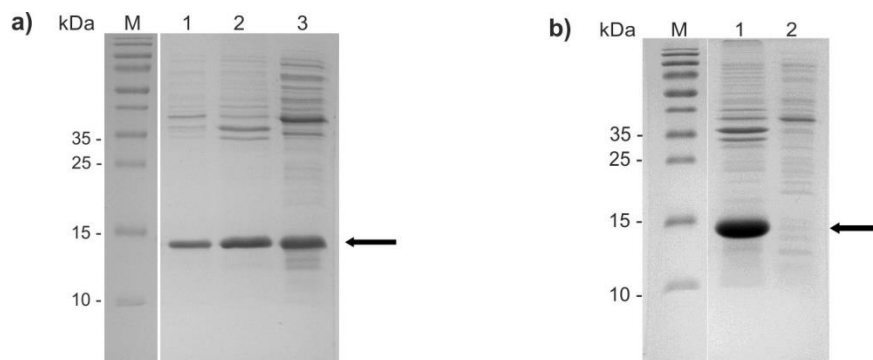


Abbildung 3.7

Darstellung der löslichen und unlöslichen Fraktionen der Fusionsproteine von mHD5 und mHD6 nach Zellaufschluss.

Coomassie gefärbte SDS-Gele (15%) der Zellaufschlüsse nach Expression von trxA-His-mHD5 (**a**) und trxA-His-NcoI-mHD6 (**b**) in *E. coli* C41(DE3) bei 30°C, induziert mit 0,25 mM IPTG.

a) M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 1: Expression üN nach Induktion mit IPTG, 2: unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss, 3: lösliche Fraktion nach Zellaufschluss.

b) M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 1: unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss, 2: lösliche Fraktion nach Zellaufschluss.

3.1.3.1 Reinigung des *trxA*-His-mHD5 über Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung des löslich exprimierten Fusionsproteins einer 400 mL *E. coli* C41(DE3)-Kultur wurde die Ni²⁺-Affinitätschromatographie eingesetzt. Die Abtrennung der unlöslichen Fraktion nach Zellaufschluss lieferte die lösliche Fraktion. Diese zeigte in Abhängigkeit der Lagerzeit auf Eis (ab 30–60 min) durch eine zunehmende Trübung sichtbare Stabilitätsprobleme. Über SDS-PAGE konnte das Zielprotein im entstandenen Präzipitat nachgewiesen werden (Abbildung 3.8, Spur 1). Untersuchungen zum Einfluss von Salz- und Proteinkonzentrationen auf die Stabilität des Fusionsproteins im Lysat zeigten, dass durch Minderung der Ionenstärke (300 mM, 150 mM, 0 mM NaCl) eine bessere Stabilität gewährleistet werden konnte. Durch die Abwesenheit von Salz blieb das Lysat klar, während die Minderung von 300 mM auf 150 mM NaCl eine Stabilität über mehrere Stunden gewährleistete.

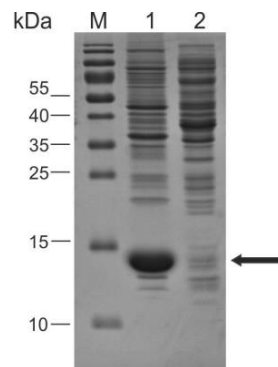


Abbildung 3.8

Stabilitätsproblem des löslichen Fusionsprotein *trxA*-His-mHD5.

Coomassie gefärbtes SDS-Gel (15%) des Überstandes und Präzipitats des Lysats von *trxA*-His-mHD5. Dargestellt ist das Fusionsprotein *trxA*-His-mHD5 (~17,4 kDa), das nach Zellaufschluss in der löslichen Fraktion erhalten wird. Der Aufschluss in Tris-HCl-Puffer (20 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7,2) zeigt bei Lagerung der Fraktion auf Eis innerhalb kurzer Zeit (30 min) eine Trübung. Nach Zentrifugation des trüben Lysats kann im Präzipitat das Fusionsprotein *trxA*-His-mHD5 neben weiteren *E. coli*-eigenen Proteinen nachgewiesen werden (1). Der Überstand zeigt einen Verlust des Zielproteins an (2). M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 1: Präzipitat, 2: lösliche Fraktion.

Zur Etablierung eines effizienten Reinigungsverfahrens für das antimikrobielle Peptid mHD5 wurde für die Reinigung des Fusionsproteins über IMAC ein Bindepuffer mit einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl gewählt. Diese sollte sowohl die Stabilität des Fusionsproteins als auch einen ausreichenden Reinigungseffekt über IMAC durch

Ergebnisse

Vermeidung ionischer Interaktionen von Kontaminanten gewährleisten. Die Reinigung des löslichen trxA-His-mHD5 erfolgte an einem FPLC-System (ÄKTAexplorer 100, GE Healthcare, Freiburg) über eine HisTrap FF 5 mL-Säule (GE Healthcare, Freiburg). Die Auftragung des gesamten Lysat-Volumens einer 400 mL-Kultur erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 mL/min. Abbildung 3.9 a zeigt beispielhaft die Aufreinigung des löslichen Fusionsproteins trxA-His-mHD5 über IMAC. Nicht-bindende Proteine wurden in der Durchlauf-Fraktion aufgefangen (a, Spur 3).

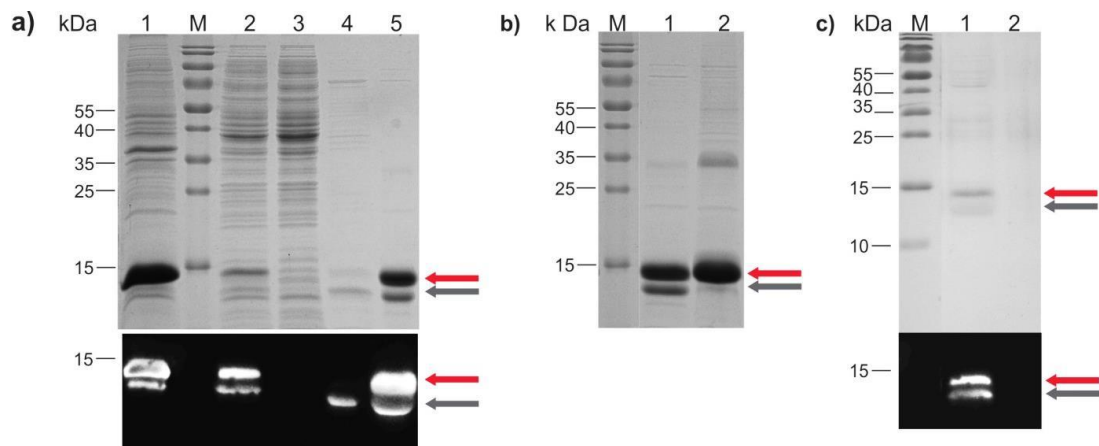


Abbildung 3.9

Aufreinigung des löslichen Fusionsproteins trxA-His-mHD5 über IMAC.

Coomassie gefärbte SDS-Gele (15%) der Aufreinigung von trxA-His-mHD5 über IMAC (a), Stabilitätsproblem der Eluat-Fraktion (b), Entsalzung über Sephadex G10 (c) und dazugehörige Western Blot-Analyse mittels Anti-His-Antikörper (a, c). Das Zielprotein ist jeweils durch einen roten Pfeil markiert. Die Degradierung des Zielpeptids ist durch den grauen Pfeil gezeigt.

- Die Reinigung des löslichen Fusionsproteins erfolgte über eine 5 mL-HisTrap FF Säule (GE Healthcare, Freiburg) durch den Stufengradienten (20/75/100) mit 250 mM Imidazol. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 1: unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss, 2: lösliche Fraktion nach Zellaufschluss, 3: Durchlauf-Fraktion der IMAC, 4: Waschschrift I (50 mM Imidazol), 5: Eluat-Fraktion (188 mM Imidazol).
- Die Lagerung der Eluat-Fraktion auf Eis über Nacht zeigt eine deutliche Präzipitation des Zielproteins. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 1: Überstand der Eluat-Fraktion, 2: Präzipitat der Eluat-Fraktion.
- Die Entsalzung der Eluat-Fraktion der Affinitätschromatographie wurde direkt im Anschluss über Sephadex G 10 (GE Healthcare, Freiburg) entsalzt. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 1: Fraktion 1 (280 nm), trxA-His-mHD5 entsalzt, 2: Fraktion 2, Co-Eluat (220 nm) mit Salzpeak.

Ergebnisse

Die Fraktionierung erfolgte anhand der UV-Absorption bei 280 nm. Durch einen optimierten Stufengradienten konnten über einen Waschschrift I (50 mM Imidazol) unspezifisch bindende *E. coli*-eigene Proteine entfernt werden (a, Spur 4), während die Elution des Fusionsproteins bei einer Imidazolkonzentration von 188 mM erfolgte (a, Spur 5). Die Analyse der Probe und der einzelnen Fraktionen über SDS-PAGE zeigt den Reinigungseffekt für das Fusionsprotein durch den Einsatz der IMAC. Auf der Höhe von ca. 15 kDa kann neben der Proteinbande, die dem Molekulargewicht des Fusionsproteins mit 17,4 kDa zugeordnet werden kann, ebenso eine Proteinbande geringeren Molekulargewichts beobachtet werden. Mittels eines spezifischen Anti-His-Antikörpers konnte die zweite Proteinbande als ein Degradierungsprodukt des Fusionsproteins identifiziert werden. Über die Western Blot-Analyse kann außerdem gezeigt werden, dass sowohl die unlösliche (a, Spur 1) als auch die lösliche Fraktion (a, Spur 2) bereits vor der Aufreinigung über IMAC das Degradierungsprodukt beinhaltet. Durch eine Peptid-Massen-Fingerprint-Analyse (Life Science Center, Universität Hohenheim) der beiden Proteinbanden konnte der Aminosäureabgleich erfolgen und das Fusionsprotein *trxA*-His-mHD5 als auch dessen Degradierungsprodukt nachgewiesen werden. Dabei konnten die durch Trypsinverdau erhaltenen Fragmente in beiden Fällen dem N-Terminus Thioredoxins zugeordnet werden. Da der Verdau mit Trypsin eine Fragmentierung der sechs Aminosäuren am C-Terminus des mHD5 zur Folge hatte (zwei Fragmente je drei Aminosäuren) konnte an dieser Stelle ein Abgleich nicht erfolgen. Da jedoch der N-Terminus beider Proteinbanden identisch ist, wird hier die Degradierung am C-Terminus des mHD5 vermutet.

Weiter konnte ebenfalls in der Eluat-Fraktion, bei Lagerung über Nacht im Kühlraum, eine Instabilität des Fusionsproteins über die Bildung sichtbarer Präzipitaten beobachtet werden (Abbildung 3.9 b, Spur 2). Das auf ein SDS-Gel aufgetragene Präzipitat zeigte eine Proteinbande auf Höhe des löslichen Fusionsproteins (b, Spur 1). Über ein zügiges Arbeiten in der Aufreinigung konnte diese Problematik umgangen werden.

Für die Entsalzung der Eluat-Fraktion wurden verschiedene Methoden untersucht. Während eine Entsalzung über Dialyse ebenfalls die Bildung von Präzipitaten zeigte, konnte über die Aufkonzentrierung und Umpufferung unter Einsatz einer Rührzelle (MWCO 5 kDa; Amicon) bzw. Ultra-Zentrifugen-Einheiten (10 kDa; Amicon) wenige bzw. kaum Präzipitate beobachtet werden. Dagegen zeigte sich die Entsalzung über Säulenchromatographie sowohl in der verlustfreien Ausbeute als auch im zeitlichen Aufwand als am besten. Die Eluat-

Ergebnisse

Fraktion wurde über Sephadex G10 (XK 26/40, SV=125 mL) chargenweise (Probenvolumen: 10-15% des Säulenvolumen) gegen 20 mM NH₄OAc, pH 4,2 umgepuffert. Anhand der Detektion des UV-Signals bei 280 nm und 220 nm konnte die Fraktionierung des entsalzten Fusionsproteins durchgeführt werden. Das Fusionsprotein (UV-Absorption bei 280 nm) konnte vom Salzpeak abgetrennt und über SDS-PAGE als das Zielprotein nachgewiesen werden (Abbildung 3.9 c, Spur 1). Eine Überprüfung des Peaks bei 220 nm, der mit dem Salzpeak co-eluiert, zeigte weder über SDS-PAGE noch Western Blot-Analyse eine Proteinbande bzw. Verlust des Zielproteins (c, Spur 2).

Tabelle 3.1 zeigt die Ausbeute nach Reinigung des Fusionsproteins trxA-His-mHD5 über IMAC. Die Ausbeutebestimmung des aufgereinigten Fusionsproteins einer 400 mL-Kultur erfolgte über die Proteinkonzentrationsbestimmungen einer Vielzahl von Aufreinigungschargen. Die Aufreinigung des löslichen trxA-His-mHD5 ausgehend einer 400 mL-Kultur lieferte eine Ausbeute von 55 mg (\pm 4%) trxA-His-mHD5 bzw. 137 mg/L Kultur mit einer theoretischen Produktivität des Zielpeptids P-mHD5_{crude} von 29 mg/L.

Tabelle 3.1

Darstellung der Ausbeute des Fusionsproteins trxA-His-mHD5.

Die mittels BCA-Bestimmung ermittelte Gesamtproteinkonzentration erfolgte als Triplikat. Die dargestellte Ausbeute wurde aus der Messung dreier Chargen erstellt. Das Gesamtprotein [mg] bezieht sich auf die Ausbeute pro 400 mL Kultur. Ausgehend davon wurde die Ausbeute pro Liter [mg/L] errechnet. Die Gesamtausbeuten an theoretischen P-mHD5_{crude} ergibt sich aus dem Anteil des Peptids (3,68 kDa) am Fusionsprotein (17,4 kDa). Die Ausbeuten beziehen sich für das Fusionsprotein zusammen mit dessen Degradierungsprodukt, da eine Quantifizierung beider Anteile nicht erfolgte.

	Gesamtprotein [mg]	Ausbeute [%]	Wiederfindung [%]	Gesamtprotein [mg/L]	P-mHD5 [mg/L]
Lysat	384 (\pm 4%)	100		959	
IMAC Eluat	55 (\pm 9%)	14	98	137	29 *
Entsalzung	73 (\pm 3%)	133	133	182	
<i>Verdau</i>	82 (\pm 2%) **			205	

* theoretische Ausbeute an P-mHD5

** Messung der Gesamtproteinkonzentration nach 48 h

3.1.4 Proteolytischer Verdau des trxA-His-mHD5

Zur Isolierung des antimikrobiellen Zielpeptids P-mHD5 musste zunächst ein proteolytischer Verdau des Fusionsproteins trxA-His-mHD5 mit Ameisensäure erfolgen. Das aufgereinigte und entsalzte Fusionsprotein wurde mit Stickstoff schockgefroren und über Gefriertrocknung konzentriert (2.2.3.13). Durch den Einsatz eines volatilen Ammoniumacetat-Puffers in der Entsalzung konnte das Fusionsprotein salzfrei aufkonzentriert werden. Der Verdau des Fusionsproteins mit 50%-iger Ameisensäure über 72 h bei 50°C ist in Abbildung 3.10 a dargestellt.

Während zum Startpunkt des Verdau (a, Spur 2) das Fusionsprotein (~17,4 kDa) und das Degradierungsprodukt anhand einer Proteinbande bei 15 kDa sichtbar sind, konnte deren vollständiger Abbau innerhalb von 24 h (a, Spur 3) gezeigt werden. Entsprechend der Abspaltung von P-mHD5 (~3,68 kDa) ist eine Proteinbande auf Höhe des Molekulargewichtsbereich von 3,58 kDa (Referenz) nachweisbar, sowie eine Proteinbande korrelierend für das verkürzte verdaute Rest-Fusionsprotein „trxA-His-D“ mit einer Größe von 13,7 kDa. Eine Proteinbande unterhalb des verdauten Fusionsproteins „trxA-His-D“ konnte als ein mögliches Degradierungsprodukt nach Verdau ebenfalls beobachtet werden. Nach bereits 24 h ist der Verdau bereits vollständig verlaufen.

Die Proteolyse wurde durch Verdünnung mit der Zugabe des 2-fachen Volumens an ddH₂O beendet und für die Chromatographie umgepuffert. Dazu wurden verschiedene Neutralisationsmethoden zur Entfernung der Ameisensäure und Umpufferung untersucht. Weder die Gefriertrocknung, noch die Dialyse oder kontrollierte isoelektrische Präzipitation zeigten sich vielversprechend und waren infolge von Präzipitatbildungen nur unter großen Ausbeuteverlusten durchführbar. Abbildung 3.10 b zeigt beispielhaft die Problematik durch die Auftragung des Präzipitats und des Überstandes nach der Dialyse gegen einen neutralen Puffer. Eine deutliche Proteinbande mit dem Molekulargewicht von ca. 4,6 kDa weist auf den Verlust des Zielpeptids P-mHD5 (3,68 kDa) im Präzipitat hin (b, Spur 2), während im Überstand Proteinbanden 4,6 kDa bis ca. 13 kDa zu beobachten sind (b, Spur 1). Die Entsalzung über Säulenchromatographie unter Einsatz des Sephadex G10 zeigte bedingt durch die Auftrennung der Produktmischung in zwei Peaks und der teilweise Co-Elution mit dem Salz-Peak ebenfalls einen hohen Verlust von 65%. Dieser erwies sich aber

Ergebnisse

gegenüber den zum Teil vollständigen Verlusten über Präzipitationen, aufgrund deren schlechten Löslichkeitsverhalten in Puffer, als geringer.

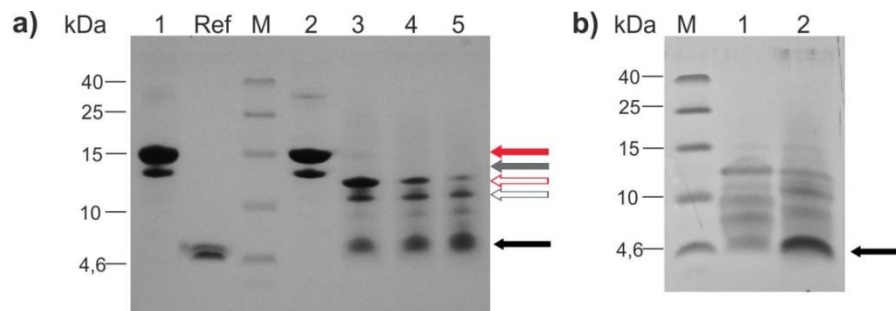


Abbildung 3.10

Chemische Proteolyse des Fusionsproteins trxA-His-mHD5 mit Ameisensäure und anschließende Dialyse.

Die Coomassie gefärbten Tris-Tricin-Gele (16,5%) zeigen den Verdau mit Ameisensäure des über IMAC aufgereinigten Fusionsproteins (a) und die anschließende Neutralisierung über Dialyse (b). Das Zielprotein trxA-His-mHD5 (rot) zeigt durch die Proteindoppelbande ein Degradierungsprodukt (grau). Durch Verdau mit Ameisensäure (50%) bei 50°C erfolgt die Abspaltung des „P-mHD5“ (schwarze Pfeil). Die resultierenden verkürzten Fusionsproteine „trxA-His-D“ (roter Pfeil ohne Füllung) bzw. das entsprechende verkürzte Fusionsprotein des Degradierungsprodukts (grauer Pfeil ohne Füllung) sind markiert dargestellt.

- a) Die verdauten Proben wurden jeweils ca. 10-fach aufkonzentriert. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, R: synthetisches HD5 (Peptide Institute, INC., Osaka, Japan), 1: Eluat IMAC, aufgereinigtes und entsalztes trxA-His-mHD5 2: trxA-His-mHD5 unverdaut (0 h), 3: trxA-His-mHD5 24 h verdaut, 4: trxA-His-mHD5 48 h verdaut, 5: trxA-His-mHD5 72 h verdaut.
- b) Nach dem Verdau mit Ameisensäure wird die saure Lösung mit dem 2-fachen Volumen an ddH₂O verdünnt und gegen neutralen Puffer dialysiert (20 mM KPi, pH 7,5). Das „P-mHD5“ im Präzipitat ist durch den schwarzen Pfeil gezeigt. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, 1: Überstand nach Dialyse des Proteolysegemisches, 2: Präzipitat während Dialyse des Proteolysegemisches.

3.1.4.1 Untersuchungen zur Isolierung des P-mHD5

Aufgrund der gegebenen Eigenschaften des Zielpeptids P-mHD5 (*pI* 9,0) und dem verdauten Fusionsprotein „trxA-His-D“ (*pI* 5,18; His₆-Tag) bzw. unverdautem Fusionsprotein trxA-His-mHD5 (*pI* 5,94, His₆-Tag) wurde sowohl der Einsatz einer Kationenaustauschchromatographie als auch der einer Affinitätschromatographie für die Reinigung des P-mHD5 untersucht. Das Proteolysegemisch wurde über Sephadex G10 (XK 26/40, CV=125 mL) in den jeweiligen Puffer (20 mM Tris, pH 6,8 bzw. 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,2) umgepuffert. Die Reinigung des P-mHD5 aus dem Proteolysegemisch wurde für die Reinigung über IMAC über eine 5 mL HisTrap FF Säule (GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Die Durchführung der Reinigung über Kationenaustauschchromatographie erfolgte über eine 1 mL Toyopearl SP-650M (Tosoh Bioscience, Stuttgart). Sowohl die Kationenaustauschchromatographie als auch der Einsatz von Affinitätschromatographie lieferten ungenügende Trenneigenschaften und waren mit hohen Ausbeuteverlusten verbunden. Insgesamt zeigte sich die Aufarbeitung des mit Ameisensäure verdauten Zielproteins durch hohe Verluste problematisch. Der massenspektrometrische Nachweis über LC-ESI-MS (Life Science Center, Universität Hohenheim) zeigte des Weiteren im IMAC-Durchlauf als auch im Eluat des Kationenaustauschers eine Summe an verschiedenen Massen. Während die Massen in der Durchlaufraktion (IMAC) kleinerer Fragmente mit einem Molekulargewichtsbereich von 1 bis 3 kDa enthielten, zeigte die Analyse der Reinigung über Kationenaustauschchromatographie (Eluat) Peptideinheiten im Bereich von 5 bis 8 kDa. Abbildung 3.11 zeigt korrelierend zu den Ergebnissen LC-ESI-MS in der Eluat-Fraktion des Kationenaustauschers (Spur 4) die Detektion einer Proteinbande mittels Anti-His-Antikörper (c) bei ca. 10 kDa und schwache Detektionen mittels Anti-HD5 (b) im Molekulargewichtsbereich 4,6 bis 15 kDa. Die Analyse der Durchlaufraktion der IMAC (a, Spur 1) deutet anhand der Proteinbande bei ca. 4,6 kDa auf dem Tris-Tricin-Gel auf das Vorhandensein des Zielpeptids hin. Dies konnte durch die schwache Detektion mittels Anti-HD5 (b, Spur 1) bestätigt werden.

Trotz immunochemischer Nachweise, konnte in keiner der untersuchten Fraktionen das mHD5 mit einer Masse von 3,58 kDa (mHD5) bzw. 3,68 kDa (P-mHD5) massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Eine Zuordnung der exakten Massen erwies sich schwierig und konnte nicht erfolgen.

Ergebnisse

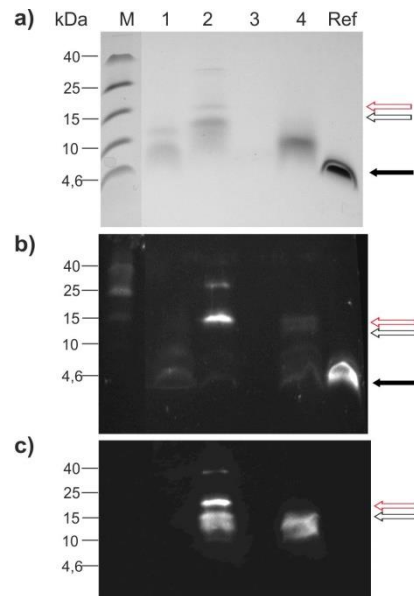


Abbildung 3.11

Aufreinigung des Zielpeptids P-mHD5 über Ni²⁺-Affinitäts- und Kationenaustauschchromatographie.

Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) (a) der Aufreinigung von P-mHD5 (*pI* 9,0, kein His-Tag) über IMAC (Spur 1 und 2) und über Kationenaustauschchromatographie (Spur 3 und 4) mit dazugehörigen Western Blot-Analyse mittels Anti-HD5-Antikörper (b) und mittels Anti-His-Antikörper (c). Das Zielprotein ist jeweils durch einen schwarzen Pfeil markiert. Die Fusionsproteine (verdaut) sind über die unausgefüllten Pfeile dargestellt.

Ref: synth. HD5; M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, 1: Durchlauf fraktion IMAC, 2: Eluat-Fraktion IMAC, 3: Durchlauf fraktion Kationenaustauscher, 4: Eluat-Fraktion Kationenaustauscher.

3.1.4.2 Reinigung der Fusionsproteine *trxA-His-mHD5* und *trxA-His-NcoI-mHD6* aus *inclusion bodies*

3.1.4.2.1 Solubilisierung

Die Solubilisierung des Fusionsproteins *trxA-His-NcoI-mHD6* wurde mit verschiedenen Detergenzien untersucht (2.2.3.4) und zeigte für Lauroylsarcosine die besten Ergebnisse. Die Solubilisierung des Fusionsproteins *trxA-His-mHD5* wurde nur in Lauroylsarcosine untersucht. Für die Durchführung der präparativen Solubilisierung wurden die Bedingungen aus dem Protein Refolding Kit (2.1.2) gewählt bzw. modifiziert. In Abbildung 3.12 a sind die einzelnen Aufarbeitungsschritte des Fusionsproteins *trxA-His-NcoI-mHD6* über SDS-PAGE dargestellt. Nach Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall (2.2.3.3) und anschließender Zentrifugation (17000 U/min, 45 min, 4°C) konnte in der unlöslichen Fraktion eine deutliche Proteinbande bei 15 kDa beobachtet werden, die dem Fusionsprotein *trxA-His-NcoI-mHD6* mit einem Molekulargewicht von 17,9 kDa zuzuordnen ist (Spur 2).

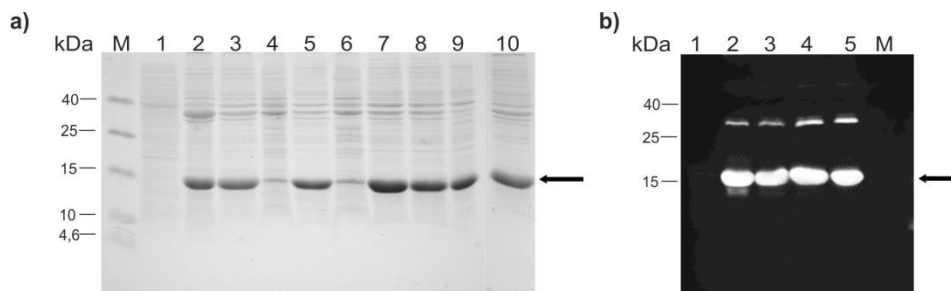


Abbildung 3.12

Solubilisierung des Fusionsproteins *trxA-His-NcoI-mHD6* aus *inclusion bodies*.

Coomassie gefärbtes SDS-Gel (15%) (a) der einzelnen Waschschriffe und Solubilisierung des Fusionsproteins und dazugehörige Western Blot-Analyse mittels Anti-His-Antikörper (b).

- a) Aufgetragen ist die lösliche (1) und die unlösliche (2) Fraktion nach Zellaufschluss, die unlösliche Fraktion nach den einzelnen Waschschriffe (3, 5, 7) und deren abgetrennte löslichen Fraktionen (4, 6) sowie das Pellet vor Solubilisierung (8), das lösliche Fusionsprotein (9) und das Restpellet (10) nach Solubilisierung mit Lauroylsarcosine. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder.
- b) Dargestellt sind folgende Fraktionen: die lösliche (1) und unlösliche (2) Fraktion nach Zellaufschluss, Pellet vor Solubilisierung (3), das lösliche Fusionsprotein (4) und das Restpellet (5) nach Solubilisierung mit Lauroylsarcosine. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder.

Ergebnisse

Durch dreimaliges Waschen in 1% (v/v) Triton X-100 in Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 konnten noch weitere lösliche Proteine entfernt werden (Spur 4, 6). Das Fusionsprotein wurde anschließend in Lauroylsarcosine (0,3%, 50 mM CAPS, 1 mM DTT, pH 11) auf eine Endkonzentration von 20 mg/mL resuspendiert und für 15 min bei RT denaturiert. Nach Zentrifugation (8900 U/min, 15 min, 4°C) konnte die lösliche Fraktion von der verbliebenen unlöslichen Fraktion getrennt werden. Die Analyse über SDS-PAGE zeigt eine Proteinbande bei 15 kDa in der löslichen Fraktion (Spur 9) und in der unlöslichen Fraktion (Spur 10). Über Western Blot-Analyse mit Anti-His-Antikörper konnte das Fusionsprotein sowohl in der löslichen als auch der unlöslichen Fraktion vor und nach Solubilisierung nachgewiesen werden (b). Eine vollständige Lösung der Fusionsproteine aus dem Pellet war nicht möglich. Die Solubilisierung des Fusionsproteins zeigte sich mit 9% (gravimetrisch) bzw. 5% (Proteinkonzentrationsbestimmung der löslichen Fraktion) als sehr gering. Auch durch eine längere Denaturierung konnte die Ausbeute nicht gesteigert werden.

Die Solubilisierung der *inclusion bodies* des trxA-His-mHD5 zeigte sich problematisch. Wie bereits in 3.1.3.1 gezeigt werden konnte, tritt in der löslichen Fraktion (Spur 2) als auch in der unlöslichen Fraktion (Spur 1) nach Zellaufschluss mittels Ultraschall (2.2.3.3) neben der Proteinbande bei 15 kDa eine Proteinbande auf, die als Degradierungsprodukt identifiziert werden konnte (Abbildung 3.13 a). Die unlösliche Fraktion wurde analog zum Fusionsprotein trxA-His-NcoI-mHD6 in Waschpuffer dreimal gewaschen und anschließend in Lauorylsarcosine denaturiert (2.2.3.4). Abbildung 3.13 a zeigt die Abtrennung löslicher *E. coli*-eigener Proteine sowie ein Teil des löslichen Fusionsproteins am Beispiel eines Waschschrilles (Spur 4). Die Solubilisierung des gewaschenen Pellets (5) konnte nicht die Gewinnung des löslichen Fusionsproteins gewährleisten (Spur 6). Während im verbleibenden Pellet sowohl die Proteinbande des Fusionsproteins mit einem Molekulargewicht von 17,3 kDa und dessen Abbauprodukt über SDS-PAGE (a, Spur 7) und Western Blot-Analyse (b, Spur 2) nachgewiesen werden konnte, ist in der löslichen Fraktion (a, Spur 6) keine Proteinbande bei entsprechender Größe von ca. 15 kDa nachweisbar. Eine Proteinbande unterhalb von 10 kDa deutet auf ein Abbauprodukt des Fusionsproteins hin. Durch die Detektion mittels Anti-His-Antikörper konnte dies bestätigt werden (b, Spur 1). Die Überprüfung mittels Anti-HD5 zeigte keine Detektion des Abbauprodukts und lieferte somit keine weiteren Hinweise bezüglich der Art des Abbauprodukts. Sowohl das SDS-Gel als auch der Western Blot zeigt eine Proteinbande bei 30 kDa, die dem Molekulargewicht

Ergebnisse

eines Dimerisierungsprodukt des Fusionsproteins zugeordnet werden kann. Die Herstellung des mHD5 über Fusionsproteine zeigte sich sowohl ausgehend von der löslichen Fraktion als auch über die *inclusion bodies* ineffizient und wurde daher nicht weiter verfolgt.

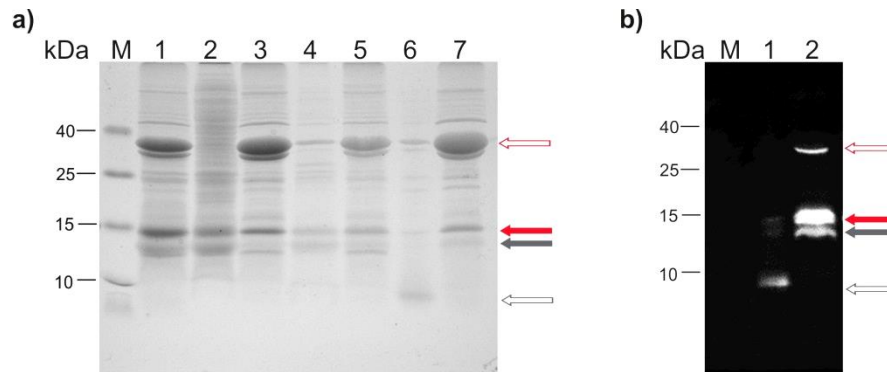


Abbildung 3.13

Solubilisierung des Fusionsproteins trxA-His-mHD5 aus *inclusion bodies*.

Coomassie gefärbtes SDS-Gel (15%) (a) eines beispielhaften Waschschrittes und der Solubilisierung des Fusionsproteins mit dazugehöriger Western Blot-Analyse mittels Anti-His-Antikörper nach Solubilisierung (b). Das Fusionsprotein ist durch einen roten Pfeil (ausgefüllt) gekennzeichnet, dessen Dimer ebenfalls mit einem roten Pfeil (unausgefüllt). Der graue Pfeil weist auf das Degradierungsprodukt hin, während der schwarze Pfeil (unausgefüllt) das Abbauprodukt nach Solubilisierung zeigt.

- a)** Aufgetragen ist die unlösliche Fraktion (1) und lösliche Fraktion (2) nach Zellaufschluss, die unlösliche Fraktion nach Waschschritt II (3) und die abgetrennte löslichen Fraktion des Waschschritts (4) sowie das Pellet vor Solubilisierung (5), das lösliche Fusionsprotein (6) und das Restpellet (7) nach Solubilisierung mit Lauroylsarcosine. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder.
- b)** Dargestellt ist die lösliche (1) und unlösliche (2) Fraktion nach Solubilisierung mit Lauroylsarcosine. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder.

3.1.5 Isolierung des P-W-mHD6

Das in Lösung gebrachte Fusionsprotein trxA-His-NcoI-mHD6 wurde mit Isopropanol gefällt (2.2.3.5) und zur Abspaltung des „P-W-mHD6“ anschließend mit Ameisensäure verdaut (2.2.3.6). Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Solubilisat und des Präzipitats nach Aufnahme in Ameisensäure zeigte, dass die Isopropanolfällung zu einem Verlust von bis zu 80% des Fusionsproteins führte. Nach der Fällung konnte eine deutliche Bande mit dem Molekulargewicht von ca. 15 kDa im Überstand nachgewiesen werden (Abbildung 3.14 a). Die Untersuchung des Verdauens mit Ameisensäure über SDS-PAGE zeigt den Abbau des Fusionsproteins. Die Proteinbande, die dem Fusionsprotein mit 17,9 kDa entspricht, konnte nach 48 h nicht mehr detektiert werden (Abbildung 3.14 b, Spur 2). Eine schwache Bande bei ca. 5 kDa konnte jedoch aufgrund fehlender Referenz-Proteinbande (b, Spur Ref) nicht eindeutig als P-W-mHD6 identifiziert werden.

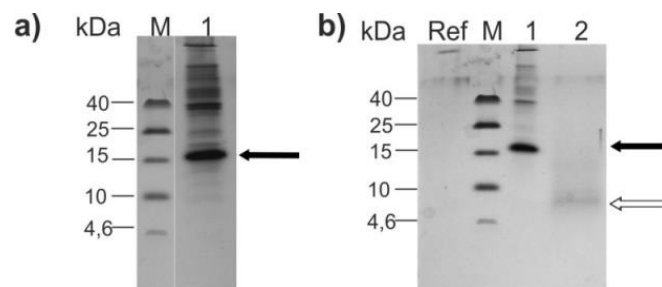


Abbildung 3.14

Fällung und Verdau des Fusionsproteins trxA-His-NcoI-mHD6.

- a)** Coomassie gefärbte Tris-Tricin-Gele (16,5%). Dargestellt ist der Verlust des Fusionsproteins im Überstand der Isopropanolfällung (1) nach Abtrennung des Präzipitats. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder.
- b)** Dargestellt ist der Verdau des Fusionsproteins mit Ameisensäure nach 0 h (1) und 48 h (2). M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder.

Die Weiterverarbeitung des Proteolysegemisches zeigte sich in mehreren Ansätzen als schwierig. Das denaturierte und reduzierte P-W-mHD6 wurde nach Aufreinigung über IMAC (2.2.3.8) weiter über LC-ESI-MS (2.2.4.7.2) analysiert. Ähnlich wie für P-mHD5, konnte das Zielpeptid P-W-mHD6 mit der Masse 4,22 kDa nicht nachgewiesen werden. Es konnte jedoch eine Summe an Fragmenten kleiner 3 kDa beobachtet werden, die auf eine Instabilität des Peptids bzw. auf eine Unspezifität der Ameisensäure hinweisen. Aufgrund der geringen Ausbeute an solubilisiertem trxA-His-NcoI-mHD6 wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt.

3.1.6 Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 in *E. coli* über Tandem-Proteine

Eine weitere Strategie, die es ermöglicht die Toxizität der Peptide zu unterbinden und somit die Expression im gängigen Expressionssystem *E. coli* zu ermöglichen, ist die der Tandem-Proteine. Dabei wird durch die Expression multimerer Peptideinheiten als *inclusion bodies* die Aktivität der Defensine unterbunden, durch Spaltung dieser Tandem-Proteine die Monomere freigelegt und unter Einsatz geeigneter *in vitro*-Rückfaltungsschritte die bioaktiven Monomere erhalten. Das Ziel war es durch Fusionierung von n -Peptideinheiten und Expression durch Spaltung n -Monomereinheiten zu erhalten und die somit die Ausbeute zu steigern. *Bis dato* ist diese Strategie für die Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 nicht beschrieben und soll für die Herstellung beider antimikrobiellen Peptide untersucht werden.

3.1.7 Klonierung der Tandem-Konstrukte und Untersuchung der Expression in *E. coli*

Die Konstrukte für die Expression der Tandem-HD5-Proteine (Dimer bis Tetramer) standen bereits zur Verfügung.^[102] Das pBAD18-mHD5-Tetramer wurde für die weiteren Klonierungsarbeiten für diese Arbeit eingesetzt. Zur Veranschaulichung des Aufbaus ist die Klonierungsstrategie der Vorarbeiten im nachfolgenden Schema mitdargestellt (Abbildung 3.15). Zur Vereinfachung der Aufreinigung über Affinitätschromatographie wurde, im Rahmen einer Studienarbeit, das Konstrukt pBAD18_mHD5_Tetramer mit den Restriktionsnukleasen *NdeI* und *BamHI* verdaut und in den linearisierten Vektor pET-16b umkloniert. Die DNA-Sequenzierung bestätigte die korrekte Sequenz. Die Expression dieses Konstrukts, unter der Kontrolle des T7-Promotors, codiert für das mHD5-Tetramer, das durch die Umklonierung einen His-Tag am N-Terminus trägt (Abbildung 3.16).

Ergebnisse

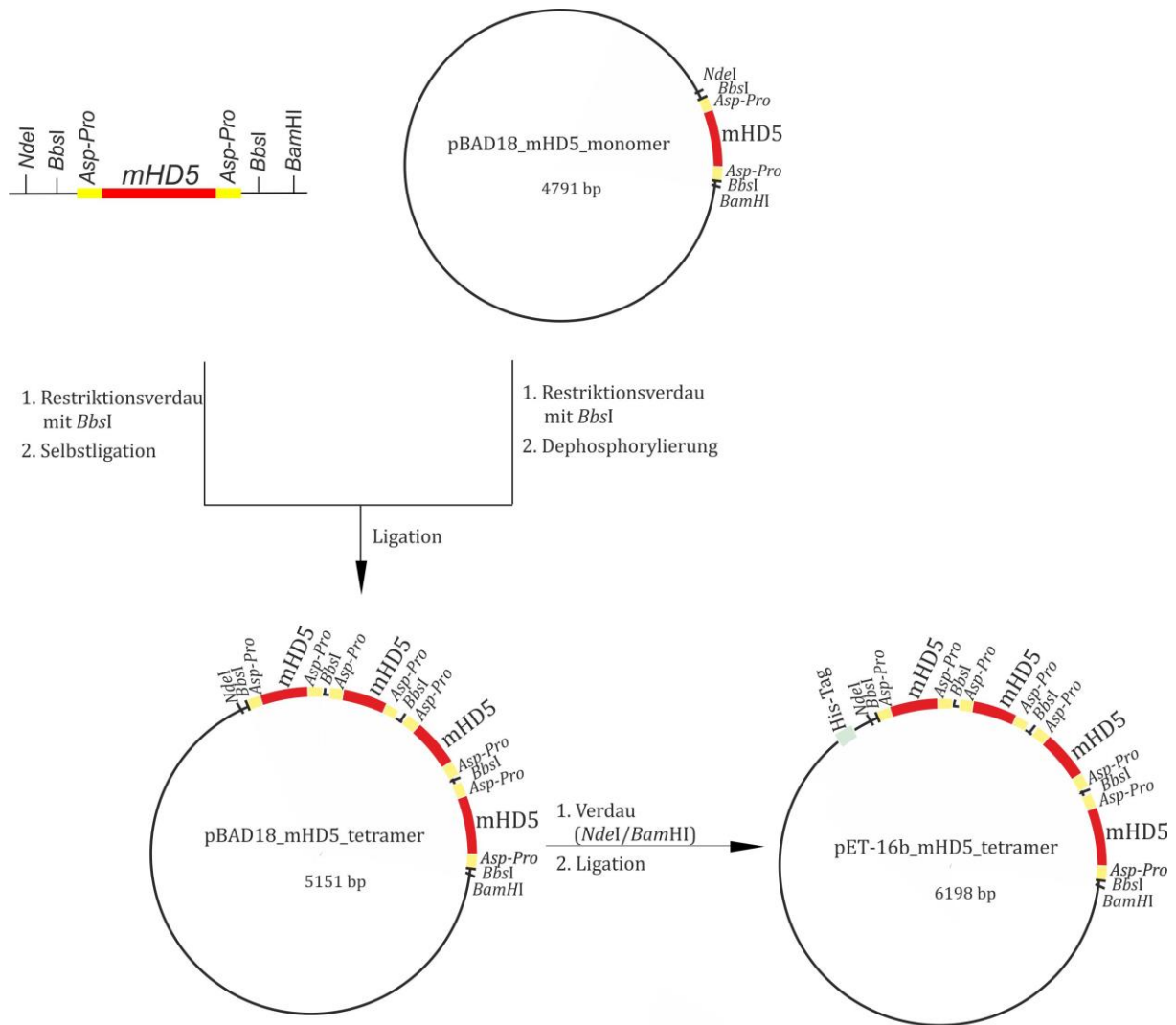


Abbildung 3.15

Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für das mHD5-Tetramer.

Klonierungsarbeiten bis zum Erhalt des pBAD18_mHD5_tetramer Konstruktes sind nur zur Veranschaulichung des Aufbaus dargestellt.^[102] Die Umklonierung des pBAD18_mHD5_tetramer in pET-16b erfolgte zur Insertion eines in-frame His-Tags.^[103]

Zusammengefasst wurden die Tandem-Konstrukte über die Amplifikation des mHD5-PCR-Produkts mit entsprechenden Primern mit den Schnittstellen *BbsI* und *Asp-Pro* (jeweils 5' und 3') über PCR versehen. Durch den Verdau mit *BbsI* und anschließender Selbstligation konnten die erhaltenen Tandem-Produkte in den mit *BbsI* linearisierten Vektor pBAD18-mHD5-monomer kloniert werden. Dabei konnten Konstrukte von Dimer bis Tetramer erhalten werden. Die Umklonierung des mHD5-Tetramers in den Vektor pET-16b über die Restriktionsnukleasen *NdeI* und *BamHI* wurde für die Vereinfachung der Aufreinigung über Affinitätschromatographie mittels His-Tags durchgeführt.

Ergebnisse

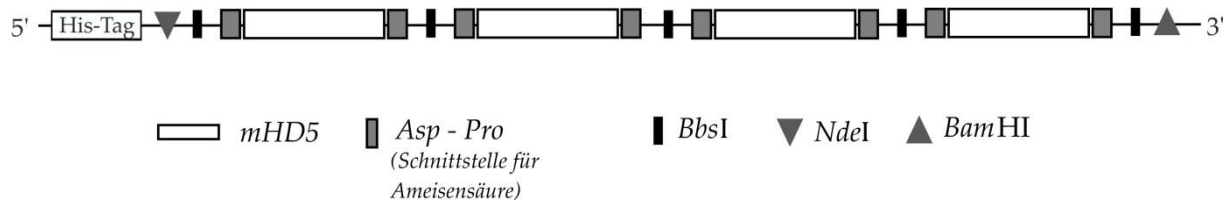


Abbildung 3.16

Schematische Darstellung des Aufbaus des mHD5-Tetramers.

Dargestellt sind die multimeren mHD5-Genabschnitte ($n=4$) mit den jeweiligen Schnittstellen. N-Terminus trägt das Tandem-Protein durch geeignete Klonierungsarbeiten einen His-Tag zur Aufreinigung über IMAC. Die n -Peptideinheiten von mHD5 sind durch Klonierungsarbeiten mit der Schnittstelle *BbsI* jeweils verbunden. Am N- und C-Terminus trägt jede mHD5-Einheit eine Schnittstelle für die Ameisensäure (*Asp-Pro*). Die saure Hydrolyse erfolgt zwischen Asparaginsäure und Prolin, so dass durch den Verdau mit Ameisensäure das Zielpeptid mHD5 als „P-mHD5-D“ erhalten wird.

Erste Expressionsuntersuchungen zeigten die erfolgreiche Expression des mHD5-Tetramers als *inclusion bodies* in den *E. coli*-Stämmen C41(DE3) und C43(DE3) bei 25°C und 37°C mit 0,25 mM IPTG als Induktor.^[103] Anhand dieser Voruntersuchungsergebnisse, die ebenfalls im Rahmen der Studienarbeit erhalten wurden, wurde für die Herstellung des mHD5-Tetramers der Stamm C41(DE3) ausgewählt.

Klonierungsarbeiten und erste Expressionsstudien zu einem äquivalenten mHD6-Multimer zeigten im Rahmen einer Diplomarbeit keine erfolgreiche Expression.^[110] Die Umklonierung zu einem Thioredoxin-mHD6-Multimer (pET-32a-trxA-His-mHD6-pentamer) konnte ebenso wenig eine erfolgreiche Expression gewährleisten. Zur Etablierung eines Herstellungsverfahrens für mHD6 wurde diese Strategie im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

3.1.8 Fermentation des mHD5-Tetramers in *E. coli*

Die Fermentation des mHD5-Tetramers wurde in einem Bioengineering 42 L-Bioreaktor in 25 L angereichertem TB-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) durchgeführt (2.2.3.2.1). Die Inokulation erfolgt mit 1,5% (v/v) des Fermentationsvolumens auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,05. Unter den Einstellungen einer Belüftungsrate von 20 L/min (0,77 vvm) und einer Drehzahl von 550 U/min wurde der Prozess bei 37°C durchgeführt. Die Induktion mit IPTG (Endkonz. 0,25 mM) erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,7. Nach einer Prozesszeit von ca. 21 h wurden die Zellen geerntet und durch Zentrifugation (10000 U/min, 20 min, 4°C) vom Zellüberstand abgetrennt.

Insgesamt konnten ausgehend von einem geernteten Fermentationsvolumen von 25 L eine Biofeuchtmasse (BFM) von 27,52 g/L Fermentationskultur erhalten werden.

In Abbildung 3.17 zeigt das SDS-Gel die Zunahme einer Proteinbande bei ca. 21 kDa nach Induktion mit IPTG (Spur 2-4), die dem Zielprotein mHD5-Tetramer (21,5 kDa) zugeordnet werden kann.

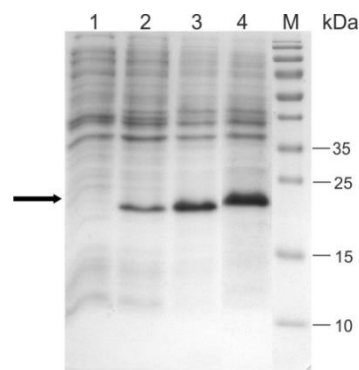


Abbildung 3.17

Fermentation des mHD5-Tetramers in *E. coli* C41(DE3).

Coomassie gefärbtes SDS-Gel (15%) des Fermentationsverlaufs von mHD5-Tetramer in *E. coli* C41(DE3) bei 37°C, induziert mit 0,25 mM IPTG. Aufgetragen sind die Proben nach 2 h Prozesszeit (Startpunkt vor Induktion) (1), 5 h (2), 18 h (3) und 21 h (Ernte) (4). M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

3.1.8.1 Reinigung der inclusion bodies

Zur Reinigung des mHD5-Tetramers aus *inclusion bodies* wurde nach Aufschluss der Zellen (2.2.3.3) die unlösliche Fraktion in einem Waschpuffer (20 mM Tris, 10 mM EDTA, 1% Triton, pH 7,2) resuspendiert (5 mL/g), mit einem Potter homogenisiert und über Ultraschall aufgeschlossen (2.2.3.3). Abbildung 3.18 zeigt die einzelnen Aufarbeitungsschritte. In der unlöslichen Fraktion kann das mHD5-Tetramer anhand der Bande bei 21 kDa nachgewiesen werden (Spur 1) während die lösliche Fraktion das Zielprotein nicht enthält (Spur 2). Durch mehrmaliges Waschen der unlöslichen Fraktion im Waschpuffer konnten weitere lösliche, *E. coli*-eigene Proteine durch Zentrifugation (8900 U/min, 15 min, 4°C) abgetrennt werden (Spur 4 und 6). Dieser Schritt wurde dreimal bzw. so lange wiederholt bis der Überstand klar war.

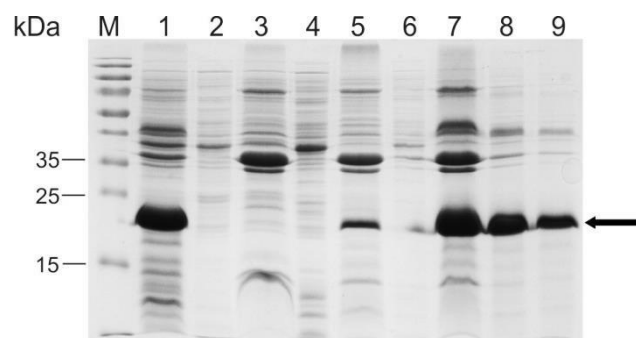


Abbildung 3.18

Aufarbeitung und Solubilisierung des mHD5-Tetramers aus *inclusion bodies*.

Coomassie gefärbtes SDS-Gel (15%) der Aufarbeitungsschritte und Solubilisierung des mHD5-Tetramers mit Lauroylsarcosine. Dargestellt ist die unlösliche (1) und lösliche Fraktion (2) nach Zellaufschluss. Nach Waschen und Zentrifugation wird die unlösliche Fraktion (3, 5, 7) schrittweise von weiteren löslichen Bestandteilen (4, 6) gereinigt. Nach Solubilisierung der unlöslichen Fraktion kann ein Restpellet (8) beobachtet werden während ein Teil des mHD5-Tetramers in Lösung ist (9). M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Durch den Pfeil wird das mHD5-Tetramer gekennzeichnet (21 kDa).

Ein Zusatz von 2 M Harnstoff oder 1,5 M NaCl im Waschpuffer, der zur Solubilisierung und somit Entfernung von Kontaminanten führen sollte, zeigte keinen Einfluss auf eine bessere Reinheit des Zielproteins.

Zur Untersuchung der Solubilisierung des mHD5-Tetramers wurden für die Detergenzien Harnstoff (2 M, 8 M), Guanidinhydrochlorid (GuHCl) (2 M, 6 M) und Lauroylsarcosine (0,3%, 0,9%) Ansätze mit jeweils unterschiedlichen pH-Werten (pH 4, pH 7,8, pH 11)

Ergebnisse

durchgeführt. Lauroylsarcosine (0,3%) erwies sich für die Solubilisierung des mHD5-Tetramers bei pH 11 am besten, während bei pH 7,8 GuHCl (6 M) gute Ergebnisse lieferte. Dieses zeigte sich jedoch nur für kleine Screening-Ansätze gut. Für einen größeren Ansatz (~1 g) konnte nach Versetzen des Pellets mit GuHCl (6 M, pH 7,8) dieses aufgrund der Festigkeit nicht resuspendiert werden, was sich in einer schlechten Ausbeute widerspiegelte. Die Solubilisierung des unlöslichen mHD5-Tetramers (Spur 7) erfolgte mit 0,3% Lauroylsarcosine (50 mM CAPS, 1 mM DTT, pH 11) mit einer Endkonzentration von 10 mg/mL. Der Einfluss von Inkubationszeit und Temperatur auf die Effizienz der Solubilisierung wurde untersucht, zeigte aber keinen signifikanten Effekt. Die Aufarbeitung erfolgte daher angelehnt an die Anleitung des Herstellers des Protein Refolding Kits (Merck Millipore, Darmstadt). Mittels gravimetrischer Bestimmungen der unlöslichen Fraktion sowie Gesamtproteinkonzentrationsbestimmungen der gelösten Fraktion (Spur 9) mittels BCA Assay konnte die Solubilisierung des mHD5-Tetramers mit einer Ausbeute von 48% bewertet werden (Tabelle 3.2). Anhand Abbildung 3.18 (Spur 9) kann gezeigt werden, dass das Zielprotein bereits durch Zentrifugationswaschschritte in einen reinem Zustand gewonnen werden konnte.

Die Aufarbeitung und Solubilisierung konnte nur in Chargen von ca. 2 g Pellet als Ausgangsprodukt durchgeführt werden. Bei größeren Ausgangsmengen zeigte sich aufgrund mangelnder Homogenität der Suspension ein höherer Verlust im Zuge der Zentrifugationswaschschritte. Darüber hinaus zeigte sich die praktische Umsetzung der Solubilisierung auf eine Endkonzentration von 10 mg/mL aufgrund höher Volumina und zügiger Verarbeitung problematisch.

Da störende Kontaminanten die Renaturierung negativ beeinflussen können, wurde versucht das solubilierte Protein unter denaturierende Bedingungen über IMAC und Ionenaustauschchromatographie weiter aufzureinigen und die Reinheit des Zielproteins zu erhöhen. Der Einsatz von Säulenchromatographie war jedoch bedingt durch eine geringe Bindungsstärke des Zielproteins an das Säulenmaterial und keines zusätzlichen Reinigungseffektes mit hohen Verlusten verbunden und wurde daher nicht weiter für das Reinigungsverfahren des mHD5-Tetramers eingesetzt.

Tabelle 3.2 zeigt die Gesamtübersicht der Ausbeute am Zielprotein mHD5-Tetramer ausgehend von der BFM, die durch die Fermentation erhalten werden konnte. Basierend auf der Auswertung zahlreicher Aufarbeitungs- und Solubilisierungsschritte konnte das

Ergebnisse

Zielprotein mHD5-Tetramer_{crude} mit einer Ausbeute von 2,85 g/L ($\pm 10\%$) über die Fermentation und die Aufarbeitung erhalten werden. Aufgrund der enthaltenen mHD5-Peptideinheiten ($n=4$) wird somit eine theoretische Produktivität von 2,02 g/L ($\pm 10\%$) an rekombinanten P-mHD5-D_{crude} erzielt.

Tabelle 3.2 **Übersicht der Ausbeute der Aufarbeitungsschritte und Solubilisierung des mHD5-Tetramers.**

Die Ausbeuteberechnung der *inclusion bodies* erfolgt ausgehend der erhaltenen Biofeuchtmasse der Fermentation des Zielproteins mHD5-Tetramer in *E. coli* C41(DE3). Die gravimetrische Bestimmung der unlöslichen Fraktionen nach Zellaufschluss, Waschschrinen und Solubilisierung erfolgte je Charge als Triplikat. Die Darstellung dieser Messwerte bezieht sich auf den Mittelwert dreier Aufarbeitungschargen. Die theoretische unlösliche Fraktion nach Solubilisierung ergibt sich durch Subtraktion der Pellets vor und nach Solubilisierung. Durch die Proteinkonzentrationsbestimmung der löslichen Fraktion mittels BCA konnte dieser Wert bestätigt werden. Die Ausbeute der unlöslichen Fraktion nach Zellaufschluss und Waschschrinen beträgt ausgehend der Biofeuchtmasse ca. 21%. Nach der Solubilisierung können noch 11% unlöslicher Fraktion nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Solubilisierungsrate von 49 % bzw. 48%. Ausgehend des mHD5-Tetramer-Konstruktes, das sich aus 4 mHD5-Einheiten zusammensetzt kann eine Produktivität von 2,02 g/L P-mHD5-D_{crude} erreicht werden.

	BFM [g/L]	Ausbeute [%]	Gesamtprotein [g/L]	P-mHD5-D [g/L]	Ausbeute [%]
Pellet nach Fermentation	27,5	100			
Pellet nach Zellaufschluss	11,3 ($\pm 3\%$)	41			
Pellet nach Waschschrinen	5,91 ($\pm 10\%$)	21			100
Pellet nach Solubilisierung	3,03 ($\pm 1\%$)	11			51
Solubilisiert (<i>theo.</i>)	2,88				49
Lösliche Fraktion			2,85 ($\pm 10\%$)	2,02 ($\pm 10\%$)	48

3.1.9 Verdau des mHD5-Tetramers mit Ameisensäure

Die saure Hydrolyse des mHD5-Tetramers führt, aufgrund der Schnittstellen (D-P) jeweils am N- und C-Terminus einer mHD5-Einheit, unter optimalen Bedingungen zur Abspaltung von vier „P-mHD5-D“-Peptiden (3,8 kDa) (Abbildung 3.19).

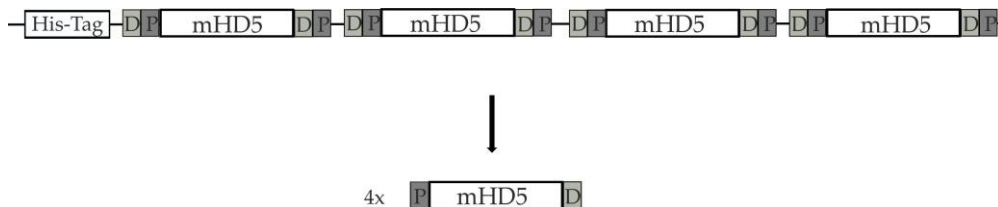


Abbildung 3.19

Darstellung des Zielpeptids nach saurer Hydrolyse des mHD5-Tetramers.

Durch den Verdau des mHD5-Tetramers (21,5 kDa) mit Ameisensäure (50%) erfolgt eine saure Hydrolyse der Aspartyl-Gruppen. Unter optimalen Bedingungen werden ausgehend von einem Tandem-Protein vier mHD5-Einheiten erhalten. Resultierend aus der Anordnung der Schnittstellen und der proteolytischen Spaltung zwischen D und P wird das Zielpeptid in Form von P-mHD5-D (3,8 kDa) erhalten.

Das nach Solubilisierung in alkalischer Lösung (pH 11) enthaltende Zielprotein wurde mit verschiedenen Methoden für den Verdau mit Ameisensäure vorbereitet. Dazu konnte die Lyophilisierung des Solubilisats und anschließender Aufnahme in 50%-iger Ameisensäure einen Verdau des Proteins zeigen. Diese Suspension war allerdings unlöslich, so dass eine Weiterverarbeitung nicht möglich war. Die Fällung des Proteins durch Zugabe konzentrierter Salzsäure war unvollständig und mit hohen Verlusten verbunden. Im Gegensatz dazu zeigte die Fällung mit Isopropanol eine vollständige Fällung. Im Überstand der Isopropanol-Fällung konnten weder über SDS-PAGE noch mittels spezifischen Anti-His-Antikörper über Western Blot-Analyse Verluste an mHD5-Tetramer nachgewiesen werden (Abbildung 3.20, Spur 4), so dass diese Methode zur Weiterverarbeitung gewählt wurde. Spätere Proteinkonzentrationsbestimmungen mittels BCA zeigten jedoch ebenfalls einen hohen Verlust von 70% an. Eine vollständige Fällung des Zielproteins konnte durch die Dialyse des Solubilisats gegen ddH₂O erreicht werden.

Abbildung 3.20 b bestätigt durch die fehlende (1) bzw. der beobachteten Detektionsbande bei ca. 21 kDa (2) die Expression des mHD5-Tetramers ausschließlich in Form von *inclusion*

Ergebnisse

bodies. Die über SDS-PAGE nachgewiesenen schwachen Proteinbanden auf Höhe von ca. 35-40 kDa wie unterhalb des Zielproteins konnten über Western Blot einem Dimerisierungsprodukt bzw. Degradierungsbanden zugeordnet werden (Abbildung 3.20 b, Spur 3).

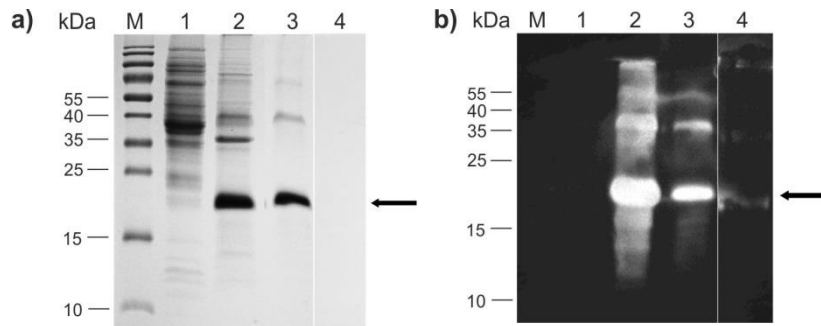


Abbildung 3.20

Solubilisierung und Fällung des mHD5-Tetramers mit Isopropanol.

Coomassie gefärbtes SDS-Gel (15%) (a) und dazugehörige Western Blot-Analyse mittels Anti-His-Antikörper (b) der Solubilisierung des mHD5-Tetramers nach Zellaufschluss (Lysat: Spur 1 und Pellet: 2), Solubilisierung (Spur 3) und anschließende Fällung mit Isopropanol. Der Überstand der Isopropanol-Fällung zeigt den geringen Verlust des Zielproteins (Spur 4).

Das gefällte Protein wurde über Zentrifugation (8900 U/min, 4°C, 30 min) vom Isopropanol abgetrennt, mit Ethanol gewaschen und anschließend in 50%-iger Ameisensäure verdaut. Durch die Analyse über SDS-PAGE und RP-HPLC wurde der Verdau kontrolliert und nach max. 48 h abgebrochen. Abbildung 3.21 zeigt bei ca. 21 kDa eine Proteinbande des unverdauten mHD5-Tetramers zum Zeitpunkt der Zugabe von Ameisensäure (Spur 1).

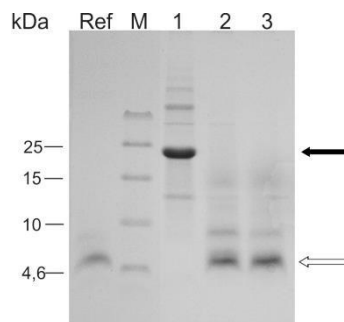


Abbildung 3.21

Verdau des mHD5-Tetramers mit Ameisensäure.

Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) des proteolytischen Verdaus von mHD5-Tetramer. Dargestellt ist das unverdaute Zielprotein zum Zeitpunkt der Zugabe von Ameisensäure (1) und 24 h (2) und 48 h (3) nach Inkubation. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, Ref: synth. HD5. Das unverdaute Protein ist durch den schwarzen Pfeil gekennzeichnet, das resultierende Zielpeptid P-mHD5-D durch den weißen Pfeil.

Ergebnisse

Bereits nach 24 h Inkubation konnte der vollständige Abbau des mHD5-Tetramers beobachtet werden (Spur 2). Resultierend aus dem Abbau des mHD5-Tetramers konnte das Zielpeptid P-mHD5-D (3,8 kDa) durch die Proteinbande auf der Höhe der Referenz nachgewiesen werden. Der Vergleich der Retentionszeiten des reduzierten synthetischen HD5 (20,990 min) mit der des Zielprodukts nach 48 h Inkubation (20,976 min) zeigen ebenfalls eine gute Korrelation (Abbildung 3.22).

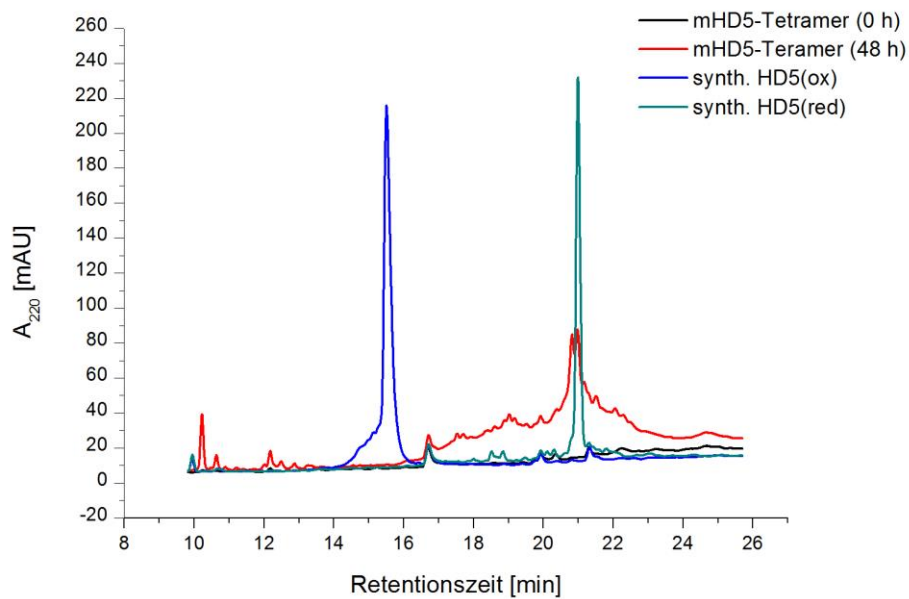


Abbildung 3.22

RP-HPLC des proteolytischen Verdaus von mHD5-Tetramer mit Ameisensäure.

Die Auftrennung erfolgte über eine TSKgel ODS-100V-Säule (3 μm , 4,6x150 mm, Tosoh Bioscience, Stuttgart). Die Säule wurde mit Lösungsmittel A (ddH₂O, 0,1% TFA) und B (ACN, 0,1% TFA) im Verhältnis 90:10 äquilibriert. Das Produkt wurde über einen linearen Gradienten des Lösungsmittels B (ACN, 0,1% TFA) über 40 min eluiert (10-60%). Die Detektion erfolgte über Absorption bei 220 nm. Dargestellt ist der Startpunkt des Verdaus von mHD5-Tetramer mit Ameisensäure (schwarz) sowie nach 48 h (rot). Der Verdau wurde über den Vergleich der Retentionszeiten des synthetischen HD5 in oxidierter (blau) und reduzierter Form (grün) kontrolliert.

Während zum Zeitpunkt der Ameisensäurezugabe kein Signal zwischen 10 und 26 min sichtbar ist, kann im Zuge des Verdaus die Zunahme des Peaks bei 21 min beobachtet werden und ein erfolgreicher Verdau bestätigt werden. Ausgehend von der denaturierten und reduzierten Form des mHD5-Tetramers liegt das Zielpeptid nach dem Verdau als denaturiertes, reduziertes P-mHD5-D vor, das sich neben der Retentionszeit in der Peakform

äußert. Der unvollständige Verdau, sichtbar durch die Bande bei ca. 8 kDa, konnte durch die Inkubation von 48 h (Spur 3) nicht vervollständigt werden (Abbildung 3.21). Der Verdau wurde nach 48 h abgebrochen und die Lösung mit ddH₂O verdünnt und über Sephadex G10 in Bindepuffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,15% Lauroylsarcosine, pH 8,3) umgepuffert.

3.1.9.1 Isolierung des reduzierten P-mHD5-D

Die Isolierung des Monomers P-mHD5-D, das denaturiert und reduziert vorlag, erfolgte über eine IMAC unter denaturierenden Bedingungen an einer 5 mL HisTrap FF Säule (GE Healthcare, Freiburg) (2.2.3.8). Abbildung 3.23 zeigt die Isolierung des Zielpeptids im Durchlauf durch die Abtrennung der bindenden, unvollständig verdauten Tetramer-Fragmente über SDS-PAGE und Western Blot-Analyse mittels Anti-HD5-Antikörper. Eine Proteinbande unterhalb von 10 kDa (a, Spur 1) zeigt das Zielpeptid nach Verdau mit Ameisensäure, vor der Aufreinigung über Affinitätschromatographie. Dies konnte über Western Blot jedoch nicht als mHD5 identifiziert werden (b, Spur 1).

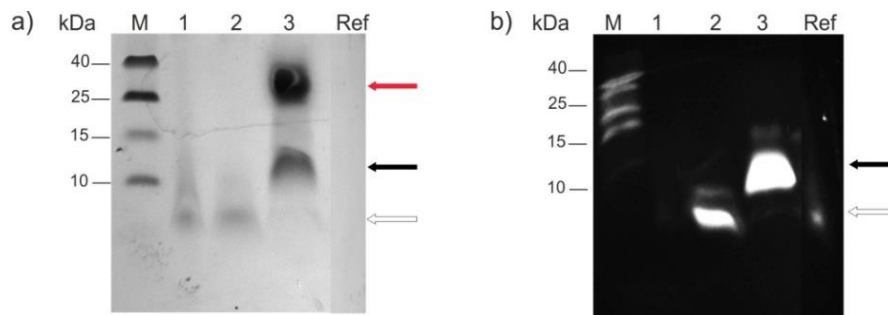


Abbildung 3.23

Aufreinigung des denaturiert-reduzierten P-mHD5-D über IMAC.

Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) **(a)** und dazugehörige Western Blot-Analyse mittels Anti-HD5-Antikörper **(b)** der Isolierung des P-mHD5-D über IMAC unter denaturierenden Bedingungen. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, Ref: synth. HD5, 1: Tetra-mHD5 verdaut über 48 h, 2: Durchlaufraktion, 3: Eluat.

Unverdautes mHD5-Tetramer ist durch einen roten Pfeil (ausgefüllt) gekennzeichnet, dessen Proteolyseprodukt mit einem Molekulargewicht von ca. 10-15 kDa mit einem schwarzen Pfeil (ausgefüllt). Der schwarze Pfeil (unausgefüllt) kennzeichnet das Zielpeptid P-mHD5-D.

Nach Probenauftrag über eine IMAC wurde das nicht-bindende Zielpeptid (P-mHD5-D) anhand der UV-Absorption bei 220 nm fraktioniert und analysiert. Die Überprüfung der

Ergebnisse

gebundenen Proteine (unverdautes mHD5-Tetramer und verdaute Tetramer-Fragmente) wurde durch Elution mit Elutionspuffer (0,3% Lauroylsarcosine, 20 mM Tris-HCl, 250 mM Imidazol, pH 7,2) ebenfalls kontrolliert. Abbildung 3.23 a zeigt auf Höhe von ca. 4,6 kDa eine schwache Proteinbande (Spur 2), die über die Detektion mit dem Anti-HD5-Antikörper dem proteolysierten P-mHD5-D zugeordnet werden kann. Über Tricin-SDS-Gelelektrophorese konnten im Eluat der IMAC zwei Proteinbanden beobachtet werden. Die Bande bei ca. 10- 15 kDa (Spur 3) passt auf mögliche mHD5-Fragmente durch unvollständigen Verdau des mHD5-Tetramers. Durch das Vorhandensein mehrerer Schnittstellen im Konstrukt können mehrere mögliche Produkte mit einer Masse von ca. 10 kDa entstehen wie z.B. ein mHD5-Trimer (ohne/mit Spacer-Resten) oder ein His-mHD5-Dimer (ohne/mit Spacer-Resten) (Abbildung 3.24). Die Proteinbande bei ca. 30 kDa konnte mittels spezifischen Anti-HD5-Antikörpers über Western Blot nicht als unverdautes mHD5-Tetramer (21 kDa) identifiziert werden.

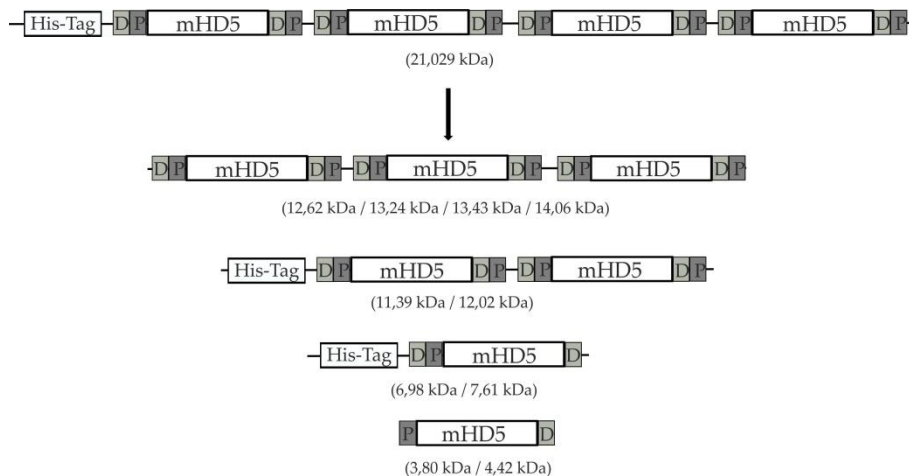


Abbildung 3.24

Darstellung des möglichen Produktspektrums nach saurer Hydrolyse von mHD5-Tetramern.

Zur Übersicht beinhaltet die Darstellung des möglichen Produktspektrums lediglich die Produkte deren Molekulargewicht den Proteinbanden in Abbildung 3.23 entsprechen (3-15 kDa). Die Molekulargewichte der entsprechenden Peptide wurden über Bioinformatics Resource Portal (ExPASyPeptide) anhand der Sequenz berechnet. Das erste Gewicht entspricht der Masse, die durch saure Hydrolyse an D bzw. P, das dem mHD5 am nächsten liegt, stattgefunden hat. Die zweite bis vierte angegebene Masse entspricht einer um die Sequenz von Spacer (PEDNGD bzw. PEDNGGSGS) verlängerten Sequenz.

Ergebnisse

Da die Bindung der Fragmente an eine Ni²⁺-Affinitätssäule ein His-Tag benötigen wird die Proteinbande bei ca. 10 kDa „His-mHD5-Dimer“ (ohne bzw. mit Spacer-Resten) mit einem Molekulargewicht von 11,39 kDa bzw. 12,02 kDa zugeordnet (Abbildung 3.23, Spur 3). Aufgrund der fehlenden Detektion des synthetischen HD5 sowohl im Tris-Tricin-Gel als auch im Western Blot zeigt sich dieser Nachweis nicht eindeutig. Die Analyse der Durchlaufaktion über LC-ESI-MS zeigte ähnlich wie bei der Aufreinigung des Fusionsproteins in 3.1.4.1 eine Summe an Massen kleinerer Fragmente (< 3 kDa). Das Zielpeptid P-mHD5-D konnte trotz positivem Western Blot mittels Anti-HD5-Antikörper massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Ein weiterer Versuch zur Isolierung des P-mHD5-D wurde über die Trennung durch Gelfiltration unternommen. Diese Strategie zur Aufreinigung des P-mHD5-D scheiterte letztendlich ebenfalls durch den fehlenden Nachweis der Masse über LC-ESI-MS.

3.2 Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 in *P. pastoris*

Die humanen α -Defensine 5 und 6 konnten über den Expressionswirt *E. coli* nur unter großem experimentellem und kostenintensivem Aufwand sowie hohen Ausbeuteverlusten in der Aufarbeitung hergestellt werden. *E. coli* zeigte sich durch die Ausbildung von *inclusion bodies* und den somit fehlenden posttranslationalen Modifikationen als auch die dadurch bedingte Anzahl der Reinigungsstufen limitierend für die Etablierung eines robusten, einfachen Herstellungsverfahrens für die humanen α -Defensine 5 und 6 in ausreichenden Mengen. *P. pastoris* dagegen ermöglicht neben der Ausbildung von posttranslationalen Modifikationen die extrazelluläre Sekretion des Zielpeptids in das Medium.^[111] Für die Gewinnung der α -Defensine 5 und 6, die in den epithelialen Paneth-Zellen des Dünndarms exprimiert werden, soll in dieser Arbeit der Expressionswirt *P. pastoris* ebenfalls untersucht und mit *E. coli* verglichen werden.

3.2.1 Plasmidkonstrukte zur Herstellung der Defensine in *P. pastoris*

Für die Expression der Gene der humanen α -Defensine 5 und 6 in *P. pastoris* lag der transformierte *P. pastoris* Stamm X-33 jeweils mit den Konstrukten pPICZ α A_HD5, pPICZ α A_mHD5 und pPICZ α A_mHD6 bereits aus eigenen Vorarbeiten vor.^[99] Der Vektor pPICZ α A verfügt über einen AOX-Promotor. Dieser ist in *P. pastoris* für die Regulierung des AOX1-Gens, welches für die Alkoholoxidase codiert, zuständig. Die Transkription der Gene, die unter die Kontrolle des AOX1-Promotors gestellt werden, wird durch Zugabe von Methanol induziert und kontrolliert. Durch den Einsatz des Vektors, der das α -Faktor-Prepropeptid aus *Saccharomyces cerevisiae* enthält, kann die Expression heterologer Proteine in das Medium erfolgen. Am C-Terminus des α -Faktor-Prepropeptids ermöglichen die Schnittstellen Kex2 (R-K) und Ste13 (E-A) die Abspaltung des Signalpeptids vom Protein durch die entsprechenden Signal-Peptidasen Kex2 und Ste13 im späten Trans-Golgi-Netzwerk. Dadurch kann das Zielprotein in das Medium sekretiert werden. Der größte Vorteil, den der Einsatz von *P. pastoris* bietet, ist die Möglichkeit die heterolog exprimierten Peptide in ihrer nativen Struktur zu erhalten.

Die Klonierung des Prepro-HD5 (HD5) und des reifen *mature*-HD5 (mHD5) erfolgten an den C-Terminus der α -Signalsequenz, direkt an die Schnittstelle Kex2.^[99] Da in der Literatur jedoch die Prozessierung der Ste13-Protease als ineffizient beschrieben wird^[112], wurde, um

Ergebnisse

die Zieleptide in ihrer nativen N-terminalen korrekten Sequenz zu erhalten, die Schnittstelle Ste13 entfernt.^[99] Abbildung 3.25 zeigt den schematischen Aufbau der Expressionskassette zur Expression der Prepro- (pPICZ α A_HD5) bzw. der *mature*-Form des HD5 (pPICZ α A_mHD5).

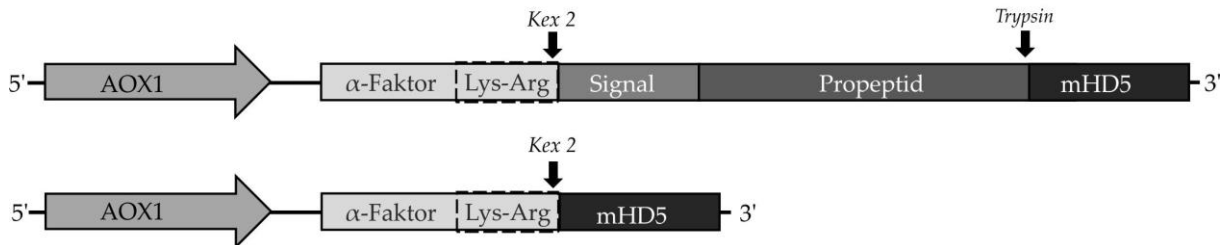


Abbildung 3.25 Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskassetten für Prepro-HD5 (HD5) und *mature*-HD5 (mHD5) im Expressionsvektor pPICZ α A unter Kontrolle des AOX1-Promotors.

Die *Kex2*-Protease spaltet im späten Trans-Golgi-Netzwerk das Zielpeptid mHD5 bzw. HD5 ab. Dieses sekretiert in das Medium. Die Expression des Prepro-HD5 erfordert eine *in vitro* enzymatische Abspaltung des Prosegments mit Trypsin während das mHD5 als reifes Defensin isoliert werden kann.

Erste Expressionsuntersuchungen der humanen α -Defensine 5 und 6, über die Sekretion der *mature* Peptide, zeigten bereits aus eigenen Vorarbeiten eine erfolgreiche Expression in *P. pastoris*, allerdings in sehr geringen Mengen.^[99] Zur Ausbeutesteigerung wurde daher in dieser Arbeit die Expression über Fed-Batch-Fermentationen in verschiedenen Maßstäben durchgeführt und untersucht.

3.2.2 Untersuchung der Prozessparameter der Fed-Batch-Fermentation von mHD5 in *P. pastoris* im 5 L-Maßstab

Für die Durchführung der Fermentationen wurde jeweils derselbe mHD5-Klon (Wildtyp Stamm X-33 transformiert mit pPICZ α A_mHD5), der die besten Ergebnissen in eigenen Vorarbeiten zeigte, verwendet. Die Insertion des *mHD5*-Gens wurde vor der Durchführung der Fermentation durch Isolierung der genomischen DNA (2.2.1.10) und anschließender Kolonie-PCR (2.2.1.5.2) überprüft.

Die Fermentation des humanen α -Defensins 5 in *P. pastoris* ist bereits in der Literatur mit einer Ausbeute von 165 mg/L Fermentationsbrühe mHD5_{crude} innerhalb einer Prozesszeit von vier Tagen dokumentiert.^[101] Um die Parameter, die bisher am Institut für *P. pastoris* Fermentationen in „Standardprozessen“ verwendet werden, für die Fermentation der Defensine zu untersuchen und für diesen Prozesses zu etablieren, wurde zunächst eine Fermentation im 4 L-Maßstab durchgeführt. Für die Expression des Gens, das für das humane α -Defensin 5 (*mHD5*) codiert, wurden in einem 7,5 L Labfors-Bioreaktor (Infors, Bottmingen, Schweiz) 4 L Basalsalzmedium mit der Kohlenstoffquelle Glycerin (5% v/v) mit einer Vorkultur auf eine Start OD₆₀₀ von 0,4 bei 30°C inokuliert. Über die Überwachung des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2), der proportional zur Gelöstsauerstoffkonzentration (DO-Wert) ist, wurde der Verlauf der Fermentation kontrolliert. Nach ca. 24 h erfolgte, nach Abnahme des pO_2 -Werts auf weniger als 5%, die Senkung der Prozesstemperatur auf 22°C. Das Wachstum der Zellen zeigte sich sehr langsam. Die Umstellung in den Fed-Batch-Prozess mit 16 g MeOH (6 ml/L PTM1-Lösung) konnte erst nach weiteren 5 h bei einer OD₆₀₀ von 80 erfolgen. Nach einer kurzen Umgewöhnungsphase der Zellen von Glycerin auf MeOH wurde der automatisierte Fütterungsimpuls so gewählt, dass der Fermentationsbrühe 0,5% (v/v) MeOH zugeführt wurde, sobald ein signifikanter Anstieg des pO_2 -Wertes auf ca. 30% zu detektieren war. Durch die Integration einer Waage mit der IRIS Kontrollsoftware (Infors, Bottmingen, Schweiz) wurde die Fütterung mit Methanol gesteuert. Die Kontrolle der Temperatur, des pH-Werts, der Antischaummittelzugabe wie auch der Belüftungsrate und der Rührerdrehzahl wurde ebenfalls mittels der IRIS Kontrollsoftware durchgeführt. Über die Bestimmung der optischen Dichte, wie auch der BFM und BTM, wurde das Wachstum der *Pichia*-Zellen verfolgt. Der Prozess konnte bei eingestellten Parametern über 311 h zur Anreicherung einer hohen Zelldichte (OD₆₀₀ 592; BFM: 465 g/L; BTM: 138 g/L)

Ergebnisse

betrieben werden. Die entsprechende Zunahme von optischer Dichte und korrelierender Biofeuchtmasse ist in Abbildung 3.26 dargestellt. Zur Analyse der Expressionsrate von rekombinanten mHD5 (rmHD5) wurden verschiedene Methoden wie Tricin-SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und RP-HPLC angewandt.

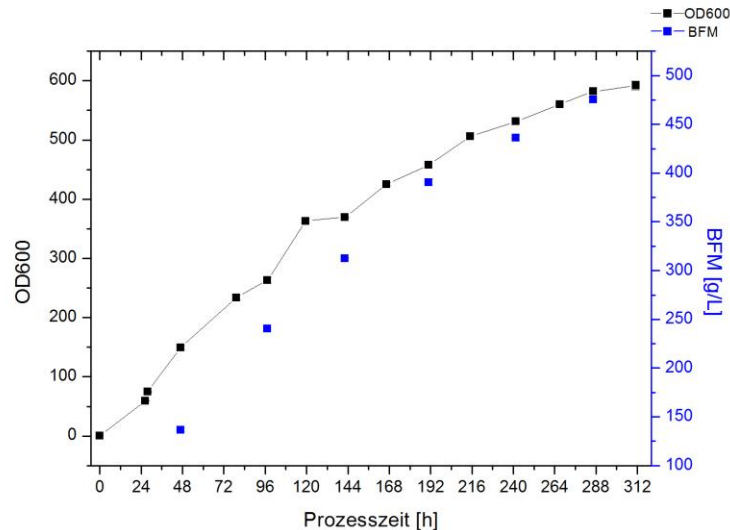


Abbildung 3.26

Wachstumsverlauf der Fed-Batch-Fermentation von mHD5 in *P. pastoris* X-33 im 4 L-Maßstab.

Dargestellt sind die Messpunkte der OD-Messung (schwarz) und der BFM-Bestimmung (blau) im Verlauf des Prozesses. Sowohl die OD- als auch BFM-Messpunkte stellen Messdaten aus Triplikaten dar.

Die Untersuchung des Fermentationsüberstandes zeigt die erfolgreiche Expression des rekombinanten mHD5 (rmHD5) in *P. pastoris*. In Abbildung 3.27 kann über das Tris-Tricin-Gel (a) und dem dazugehörigen Western Blot (b) die Zunahme des sekretierten rmHD5 (3,58 kDa) nach Induktion mit MeOH innerhalb der ersten 180 h Prozesszeit gezeigt werden. Bereits nach 24 h Expression sind auf der entsprechenden Höhe des synthetischen HD5 zwei Proteinbanden erkennbar, die jeweils durch den spezifischen Antikörper Anti-HD5 über einen Western Blot detektiert werden können (a und b). Vor Induktion mit MeOH ist keine Proteinbande entsprechend für rmHD5 im Fermentationsüberstand nachweisbar. Die spezifische Bindung des Anti-HD5-Antikörpers an das Peptid deutet, aufgrund der Doppelbande, auf eine verlängerte Sequenz z.B. durch eine O-Glykosylierung an Ser oder Thr bzw. auf eine verkürzte Form aufgrund von Instabilität hin. Oberhalb des Zielproteins sind lediglich ab einen Molekulargewichtsbereich von 25 kDa *Pichia*-eigene Proteine zu

Ergebnisse

beobachten. Das Zielpeptid rmHD5_{crude} konnte über die Sekretion in das Salzmedium bereits in einem relativen guten Reinheitsgrad erhalten werden (Abbildung 3.27 a).

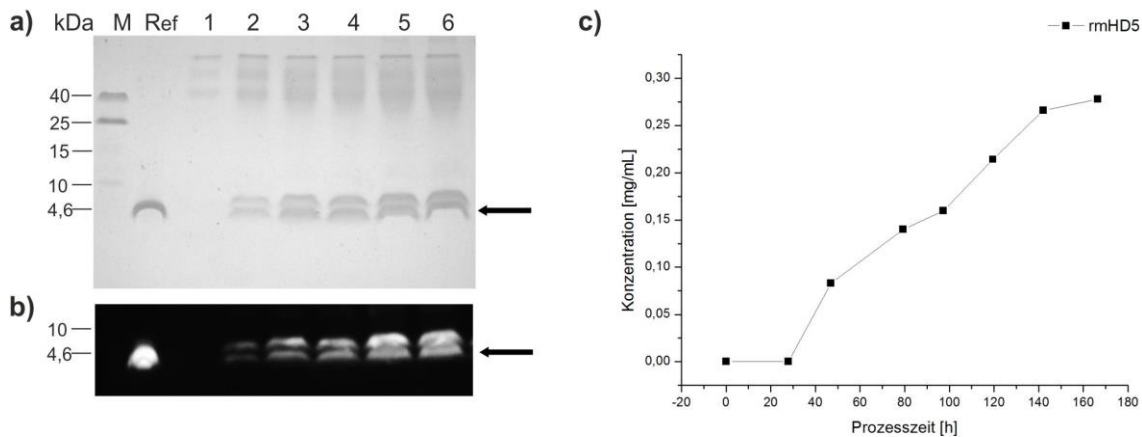


Abbildung 3.27

Expressionszunahme des rmHD5 in *P. pastoris*.

Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) (a) und Western Blot-Analyse mittels spezifischen Anti-HD5-Antikörper (b) des Fermentationsüberstandes vor Induktion mit MeOH (1) und 1-5 Tage nach Induktion (2-6). M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, Ref: synth. HD5.

c) Zunahme der Peptidkonzentration an rmHD5 im Fermentationsüberstand in Abhängigkeit der Prozesszeit. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels analytischer RP-HPLC (TSKgel ODS-100V 3 μ m, 4,6x150 mm, Tosoh Bioscience, Stuttgart) über einen linearen Gradienten 10-60% ACN (0,1% TFA) über 40 min. Mittels Kalibriergeraden ($R^2=0,9972$) des synthetischen HD5 erfolgte die Auswertung der Peptidkonzentration als Triplikat.

Die kontinuierliche Zunahme der Zelldichte im Verlauf der Expression führt zu einer entsprechenden Anreicherung des Zielprodukts im Fermentationsüberstand (Abbildung 3.27). Einen untergeordneten Einfluss hat dabei auch der Umstand, dass bei gleich bleibendem Fermentationsvolumen und steigender Zelldichte der Fermentationsüberstand aufkonzentriert wird. Die durch Anreicherung zunehmende Peptidkonzentration im Überstand wurde *via* analytische RP-HPLC bestätigt (2.2.4.3). Abbildung 3.27 c zeigt den Anstieg der Konzentration nach Induktion mit MeOH bis auf 280 mg/L Fermentationsüberstand innerhalb der ersten 166 h. Zum Prozessende (311 h) konnte das gesamte Fermentationsvolumen mit einem Volumen von 4,9 L geerntet werden. Nach der Zentrifugation für 30 min bei 15900 g und 4°C konnten insgesamt 3,18 L dunkelgrüner, klarer Fermentationsüberstand erhalten werden.

Die Durchführung des Fermentationsprozesses unter denselben Prozessbedingungen wurde zur Verifizierung wiederholt und lieferte für die Expressionsrate an rmHD5_{crude}

Ergebnisse

vergleichbare Werte. Die Gesamtausbeute über einen 4-5 L Prozess mit der Prozessdauer von 13-15 Tage lieferte insgesamt 2598-2897 mg rmHD5_{crude} (Tabelle 3.3). Aufgrund des schnelleren Wachstums der *Pichia*-Zellen im Wiederholungsprozess (Prozess II) erfolgte die Entnahme von Teilernten und Zugabe an frischem Medium in den Reaktor. Anhand Abbildung 3.28 ist das schnelle Wachstum der Zellen erkennbar. Bereits innerhalb von 144 h nahm die OD₆₀₀ auf über 500 zu. Durch Überführung des Fed-Batch-Prozesses in einen Repeated Fed-Batch-Prozess konnte die Fermentation bis zum Erreichen einer Zelldichte von 720 fortgeführt werden. Die Entnahme von Teilernten und die entsprechende Verdünnung der Fermentationsbrühe mit frischem Medium sind im Diagramm durch die abrupte Abnahme der OD-Messwerte zu erkennen.

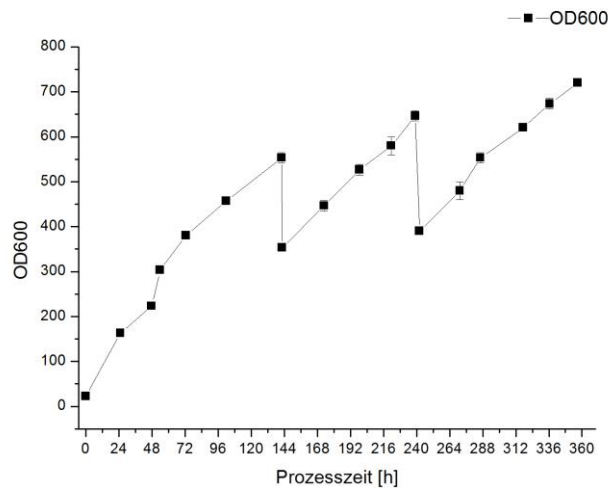


Abbildung 3.28

Wachstumsverlauf der Expression von rmHD5 in *P. pastoris* über einen Repeated Fed-Batch-Prozess im 5 L-Maßstab.

Der Prozess wurde durch Entnahme von Fermentationsbrühe und Zugabe frischen Mediums aufrecht erhalten. Die Abnahme der OD₆₀₀-Werte stellt die Zeitpunkte der Entnahme von Teilernten dar. Die Zugabe an frischen Medium zur Fermentationsbrühe resultierte in einer Verdünnung der Zelldichte.

3.2.2.1 Untersuchung der Prozessbedingungen des Capture-Schritts

Zur Isolierung des mittels des α -Faktor-Prepropeptids aus *S. cerevisiae* in das Medium sekretierten rmHD5 wurde der Überstand der Fermentationsbrühe verarbeitet. Die physikalischen Charakteristika des humanen α -Defensins 5, mit einer Größe von 3,58 kDa, und die gegebenen Eigenschaften des Expressionsüberstands, mit einem geringen *Pichia*-eigenen Proteinanteil, können dazu ausgenutzt werden ein einstufiges Reinigungsverfahren zu etablieren. *Pichia*-eigene Proteine zeigten im Tris-Tricin-Gel eine Molekulargewichtsverteilung von über 25 kDa, während unterhalb von 25 kDa nur die für rmHD5 korrespondierenden Proteinbanden vorhanden sind (Abbildung 3.27). Zur Abtrennung größerer Proteine im Capture-Schritt wurde daher die Porengröße der Membran für die Tangentialflussfiltration größer als das Molekulargewicht des Peptids ausgewählt. Der Einsatz einer 10 kDa-Membran und einer 30 kDa-Membran wurde im Zuge dessen untersucht. Ziel der Verwendung der 10 kDa-Membran war die Isolierung des rmHD5-Zielpeptids in hoher Reinheit um gegebenenfalls folgende Chromatographie-Schritte, die oft mit Ausbeuteverlusten verbunden sind, zu vermeiden. Über die größere Membran (30 kDa) sollte ein Großteil an Kontaminanten abgereichert und somit der folgende Chromatographie-Schritt vereinfacht werden. Beide Ansätze wurden jeweils im Probenvolumen von 2 L Überstände untersucht. Nach 10-facher Konzentrierung des Überstandes wurde das Konzentrat über eine Diafiltration (Diafiltrationsvolumen vierfach des Konzentratvolumens) umgepuffert (2.2.3.11).

Die Analyse der Konzentrate und Filtrate über Tricin-SDS-Gelelektrophorese zeigen, dass weder über die Wahl einer 10 kDa- noch einer 30 kDa-Membran das rekombinante Defensin im Filtrat nachweisbar ist (Abbildung 3.29). Anhand der erhaltenen Resultate wurde für das Reinigungsverfahren des rekombinanten humanen α -Defensins aus *Pichia*-Überständen für den Capture-Schritt der Einsatz einer 10 kDa-Membran gewählt um das Peptid für den folgenden Chromatographie-Schritt aufzukonzentrieren und den möglichen Verlust über das Filtrat dennoch gering zu halten.

Ergebnisse

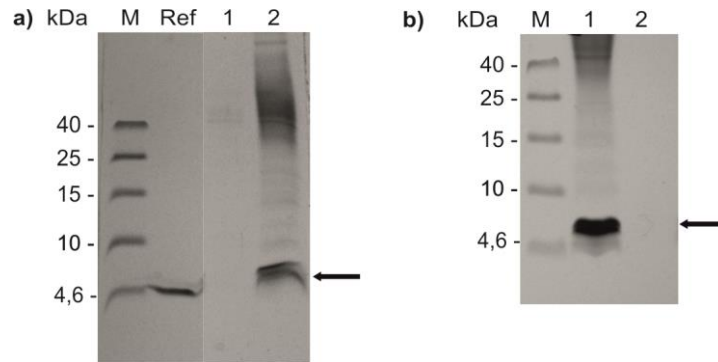


Abbildung 3.29

Coomassie gefärbte Tris-Tricin-Gele (16,5%) des Captures von rmHD5 (3,58 kDa) über eine (a) 10 kDa- und (b) 30 kDa-Membran.

- a) Konzentration des Fermentationsüberstandes in einer Tangentialflussfiltration über eine 10 kDa-Membran. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, Ref: synth. HD5, 1: Filtrat der 10 kDa-Membran, 2: Konzentrat der 10 kDa Filtration.
- b) Konzentrierung über eine 30 kDa-Membran. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, 1: Konzentrat der 30 kDa Filtration, 2: Filtrat der 30 kDa Filtration.

Um die Konzentration und Diafiltration höherer Fermentationsvolumina über eine 10 kDa-Membran zu vereinfachen und die Ablagerung von durch *P. pastoris*-Fermentationen gebildete Grünpartikeln an die Membran weitestgehend zu minimieren wurde für den Fermentationsprozess im größeren Maßstab (~30 L) die Filtration über eine 0,22 µm-Membran untersucht. Über diesen vorgeschalteten Filtrationsschritt konnten größere Restpartikel abgetrennt werden, die nach Zentrifugation im Überstand enthalten sind und in der Aufkonzentrierung störenden Einfluss auf den Prozessablauf haben könnten. Der Verlust des Zielproteins in diesem Prozessschritt zeigte sich mit 5% gering.

Tabelle 3.3 zeigt die Gesamtausbeuten des rmHD5_{crude} der zwei Prozesse. Die Reproduzierbarkeit des Fed-Batch-Prozesses konnte unter entsprechendes Einschreiten und Abändern der Bedingungen durch Entnahme von Teilernten dennoch gezeigt werden. Unabhängig vom Wachstum der Zellen konnte der Prozess in beiden Fällen über 13-15 Tage mit einer ähnlichen Ausbeute an rmHD5_{crude} durchgeführt werden. Die Gesamtausbeuten der jeweiligen Prozesse liegen mit 2897 mg und 2598 mg in einem vergleichbaren Bereich. Durch die Zugabe des frischen Mediums im Prozess II erhöht sich das Gesamtvolumen der Fermentationsüberstände und somit wird ein niedrigerer mg/L-Wert (458 mg/L) im Vergleich zu Prozess I (591 mg/L) erreicht.

Tabelle 3.3

Vergleich der Prozessausbeuten der Fed-Batch-Fermentation (4 L) und der Repeated Fed-Batch-Fermentation (5 L) von rmHD5 in *P. pastoris*.

Dargestellt sind die über RP-HPLC ermittelten rmHD5 Ausbeuten der Konzentrate nach Aufkonzentrierung und Diafiltration über eine 10 kDa-Membran. Der Repeated Fed-Batch-Prozess liefert, durch Austausch der Ernten mit frischem Medium und dadurch bedingten höheren Fermentationsvolumen geringere mg/L Werte. Die Berechnung erfolgt in Bezug auf die Volumina der erzielten Überstände. Die Gesamtausbeuten an rmHD5_{crude} der beiden Prozesse sind unter Einberechnung der entnommenen und konzentrierten Teilernten (Prozess II) vergleichbar.

	Volumen [mL]	rmHD5 [mg]	rmHD5 [mg/L]
<i>Fed-Batch-Prozess I</i>			
Fermentationsvolumen	4000		
Erntevolumen	4900		
Fermentationsüberstand	3180	n.b.	
Konzentrat (10 kDa)	348	2897 (± 14%)	591 (± 14%)
Filtrat (10 kDa)	4000	n.d.	
<i>Fed-Batch-Prozess II (Repeated)</i>			
Fermentationsvolumen	5000		
Überstand Teilernte I	1150	n.b.	n.b.
Konzentrat TE I (10 kDa)	100	113 (± 8%)	98 (± 8%)
Überstand Teilernte II	1420	n.b.	n.b.
Konzentrat TE II (10 kDa)	250	535 (± 11%)	377 (± 11%)
Erntevolumen	4500		
Fermentationsüberstand	3100	n.b.	n.b.
Konzentrat (10 kDa)	340	1951 (± 12%)	629 (± 12%)
<i>Prozessausbeute (Gesamt)</i>		2598 (± 11%)	458 (± 11%)

3.2.2.2 Aufreinigungsparameter für die Ionenaustauschchromatographie

Aufgrund der charakteristischen Eigenschaften des mHD5 und den resultierenden Ergebnisse der Tangentialflussfiltration wurde zur Aufreinigung des Peptids eine Säulenchromatographie als weiteren Prozessschritt für das Reinigungsverfahren eingesetzt. Dazu wurde entsprechend dem aus der Aminosäuresequenz des mHD5 berechneten pI von 8,96 der Einsatz eines Kationenaustauschers untersucht. Die Bindungseigenschaften des Peptids in einem pH-Wert Bereich von pH 7,2 bis pH 4,2 wurden an einer 1 mL Toyopearl SP-650M (Tosoh Bioscience, Stuttgart) überprüft. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten (15 CV) mit 1 mM NaCl des jeweiligen Puffers. Die Beurteilung der Bindungsstärke erfolgte anhand der UV-Absorption bei 220 nm und 280 nm.

Im neutralen pH-Wert Bereich (20 mM Tris-HCl, pH 7,2) zeigte sich die Bindung an das Säulenmaterial durch hohe Absorptionswerte (220 nm und 280 nm) im Durchlauf sehr gering. Eine Zunahme der Bindung konnte über eine Steigerung der Absorption bei 220 nm bei abnehmenden pH-Wert beobachtet werden. Während die Elution unter Einsatz des KPi-Puffers bei pH 5,5 eine geringe Steigerung zeigte, konnte über Minderung des pH-Wertes auf pH 4,5 (20 mM NH₄OAc) ein rapider Anstieg des 220 nm Absorption beobachtet werden. Durch den Einsatz von 20 mM NH₄OAc, pH 4,2 konnte der Eluatpeak weiter aufgetrennt werden.

Anschließend erfolgte die Entwicklung und Optimierung eines Stufengradienten unter Einsatz des NH₄OAc-Puffers (20 mM, pH 4,2). Über zwei Waschstritte (250 mM und 400 mM NaCl) konnten sowohl schwach als auch stärker bindenden Kontaminanten abgereichert werden. Durch Elution im hochmolaren Elutionspuffer wurde das rmHD5 schließlich isoliert. Die Screenings verschiedener Säulenmaterialien (ToyoScreen IEC Cation Mix Pack, 1 mL, Tosoh Bioscience) zeigte für das bereits eingesetzte SP-650M die besten Ergebnisse für die Bindung von rmHD5. Der Vergleich der Ausbeuten ist in Abbildung 3.30 gezeigt. Da im Falle des SP-650M sowohl die Ausbeute (bis um 60% höher) als auch die Wiederfindungsrate an rmHD5 am höchsten war, wurde für die Aufreinigung des rmHD5 dieses Säulenmaterial ausgewählt und eine entsprechende Säule mit Toyopearl SP-650M und einem Säulenvolumen von 111 mL (XK 26/40) gepackt.

Ergebnisse

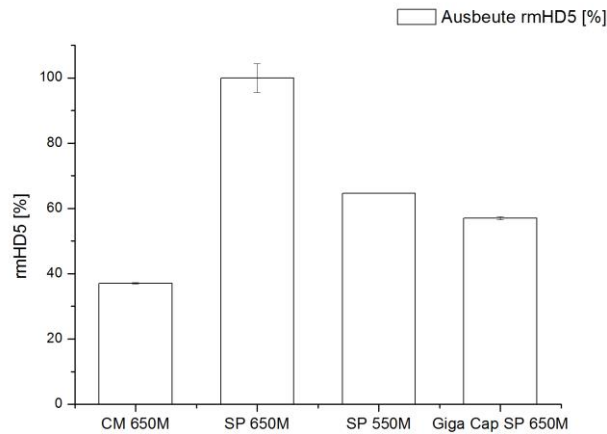


Abbildung 3.30

Screening des Säulenmaterials für die Aufreinigung von rmHD5 über Kationenaustauschchromatographie.

Ein Probenvolumen von 0,5 mL Konzentrat wurde jeweils auf die zu testende 1 mL Säule (ToyoScreen IEC Cation Mix Pack, 1 mL, Tosoh Bioscience, Stuttgart) mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Die Elution erfolgte unter Anwendung des optimierten Stufengradienten (25/40/100) mit dem Elutionspuffer (20 mM NH_4OAc , 1 M NaCl, pH 4,2). Die Auswertung der Bindungsstärke des rmHD5 erfolgte durch Vergleich der Dreifach-Peptidkonzentrationsbestimmung über RP-HPLC (TSKgel ODS-100V 3 μm , 4,6x150 mm, Tosoh Bioscience, Stuttgart). Die höchste Ausbeute wurde mit 100% gewertet und entsprechend zum Vergleich gegenüber den übrigen gegenübergestellt.

3.2.2.3 Produktion des rekombinanten humanen α -Defensins 5 im 25 L-Maßstab

Zur Untersuchung des Upscalings des Fermentationsprozesses für mHD5 in den 25 L-Maßstab wurden die Prozessparameter übernommen und für die Prozessdurchführung im Bioreaktor Bioengineering 42 L angepasst. Der sauerstofflimitierende Prozess wurde sowohl in 25 L als auch in 20 L Basalsalzmedium mit 5% (w/v) Glycerin als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Die Umstellung in den Fed-Batch-Prozess erfolgte entsprechend des jeweiligen Prozesses mit 100 g bzw. 80 g Methanol (6 ml/L PTM1-Lösung). Die Prozessparameter wurden mit einer Einstellung der Belüftungsrate mit 25 L/min und Rührerdrehzahl 550 U/min dem Prozess angepasst. Die Messwertanalyse und Untersuchung des Expressionsverlaufs erfolgte analog zur 4 L bzw. 5 L Fermentation.

Die Expression des mHD5 wurde im Fed-Batch-Prozess I (25 L Fermentation) insgesamt über 216 h verfolgt. Die automatische Fütterungsrate mit Methanol bei spontanem Anstieg der pO_2 -Werte über 30% mit 100 g Methanol führte zu einer täglichen Methanol-Zugabe von 2,4 L. Durch die kontinuierliche Entnahme von Teilernten, konnte das Fermentationsvolumen konstant gehalten und somit die Expression im Reaktor weiter ermöglicht werden.

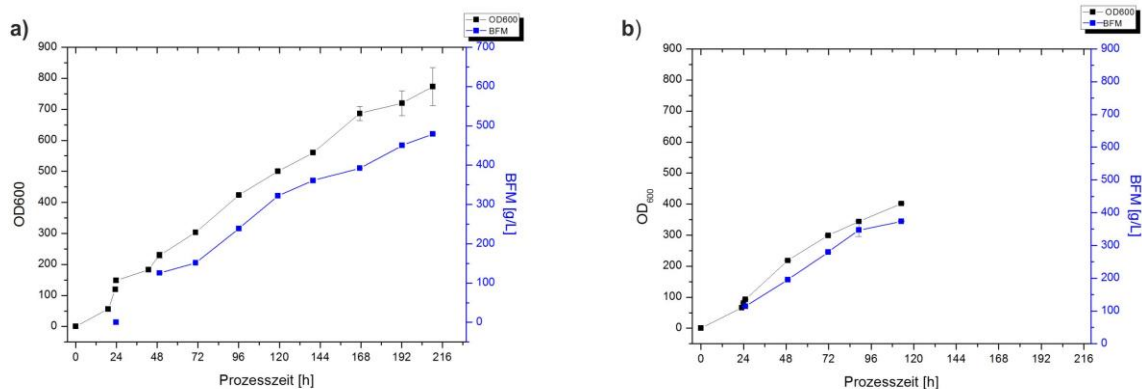


Abbildung 3.31 Wachstumsverlauf von *P. pastoris* während der Expression von mHD5 im 25 L-Maßstab (a) und 20 L-Maßstab (b).

Die Zunahme der optischen Dichte ist schwarz dargestellt, die der Biofeuchtmasse in blau. **a)** Fed-Batch-Prozess I zeigt die kontinuierliche Zunahme der Zelldichte. Nach 70, 96, 140 und 167 h erfolgten Teilernten um die Fermentation im 42 L Bioreaktor fortführen zu können. **b)** Im Fed-Batch-Prozess II wurde nach 113 h der Prozess beendet um den in *P. pastoris* Fermentationen gebildeten grünen Farbanteil gering zu halten.

Abbildung 3.31 a zeigt das kontinuierliche Wachstum der *Pichia*-Zellen durch die Zelldichtezunahme und einer korrelierender Biofeuchtmasse von 479 g/L innerhalb 216 h.

Ergebnisse

Nach 216 h wurde die gesamte Fermentationsbrühe (28,3 L) mit einer OD_{600} von 773 geerntet und die Zellen über Zentrifugation (15900 g, 30 min, 4°C) vom Überstand abgetrennt. Entsprechend der Zelldichte konnte eine Biotrockenmasse von 131 g/L erzielt werden. Der stark dunkelgrüne Fermentationsüberstand (18,03 L) der Ernte wurde weiter aufkonzentriert und diafiltriert während die Überstände der Teilernten nur zur theoretischen Gesamtausbeutebestimmung analytisch vermessen wurden.

Im analogen Fed-Batch-Prozess II wurden 20 L Fermentationsmedium zur Expression des humanen α -Defensins 5 ebenfalls unter den o.g. eingestellten Prozessparametern betrieben. Da die in *P. pastoris* Fermentationen gebildeten grünen Farbpigmente in der nachfolgenden Säulenchromatographie stören und somit die Chromatographie beeinflussen können, wurde durch die verkürzte Prozesszeit von 113 h versucht den Grünanteil möglichst gering zu halten.

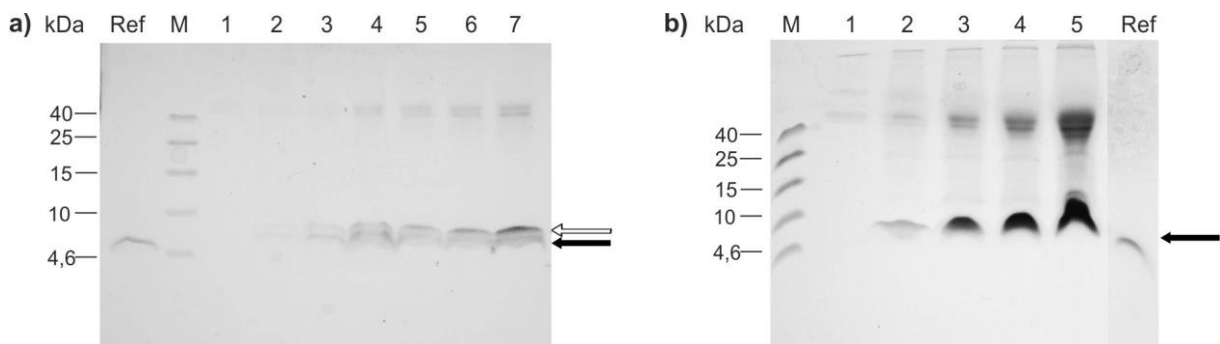


Abbildung 3.32

Coomassie gefärbte Tris-Tricin-Gele (16,5%) der Expression von mHD5 (3,58 kDa) in *P. pastoris* im 25 L-(a) und 20 L-Maßstab (b).

Die aufgetragenen Proben zeigen den Expressionsverlauf des mHD5 vor und nach Induktion mit Methanol. Nach 216 h bzw. nach 113 h wurde die gesamte Fermentationsbrühe geerntet. Das Zielpeptid ist jeweils durch einen schwarzen, ausgefüllten Pfeil markiert. Die etwas höher laufende Proteinbande ist mit einem schwarzen, unausgefüllten Pfeil markiert.

- a) M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, Ref: synth. HD5, 1: Fermentationsüberstand vor Induktion, 2-7: Fermentationsüberstand 1 bis 6 Tage nach Induktion mit Methanol.
- b) M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, Ref: synth. HD5, 1: Fermentationsüberstand vor Induktion, 2-5: Fermentationsüberstand 1 bis 4 Tage nach Induktion mit Methanol.

Ergebnisse

Die Zunahme der Farbpigmentanteile wurde im Verlauf der bisherigen Fermentationen in Abhängigkeit der Prozesszeit beobachtet. Abbildung 3.31 b zeigt den Wachstumsanstieg innerhalb 113 h auf eine OD₆₀₀ von 402 und einer entsprechenden Biofeuchtmasse von 378 g/L (BTM: 102 g/L). Trotz der kurzen Fermentationsdauer von 113 h (87 h nach Induktion) wurde ebenfalls ein grüner Überstand geerntet. Dieser zeigte sich aber deutlich klarer und heller. Durch die Übernahme der Prozessparameter aus den 5 L-Maßstab konnte die Expression des humanen α -Defensins 5 in den 20 L bis 25 L-Maßstab übertragen werden. Kontinuierliche analytische Messmethoden zeigen die erfolgreiche Sekretion des rmHD5 in den Überstand von *P. pastoris*. Anhand Abbildung 3.32 a und b ist eine deutliche Zunahme der Proteinbande auf etwa der Höhe der HD5-Referenz nach Induktion mit Methanol zu beobachten. Ähnlich wie in der Expression im 5 L-Maßstab kann im Prozess I das Vorhandensein einer Doppelbande beobachtet werden, wobei mit steigender Prozesszeit die Zunahme der höheren Bande stärker erscheint (Abbildung 3.32 a). Der Nachweis über Western Blot bestätigte wie zuvor die Spezifität des mHD5 für beide Banden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu kann, aufgrund der schlechten Auftrennung über Gel-Elektrophorese, für den Prozess II (Abbildung 3.32 b) keine eindeutige Doppelbande erkannt werden. Die Zunahme des sekretierten rmHD5 im Überstand wurde durch parallele Bestimmung der Peptidkonzentration und Ausbeutebestimmung über RP-HPLC bestätigt. Während die Expressionsrate von rmHD5 in der 20 L Fermentation anfangs höher erscheint konnte im 25 L Prozess, über die Entnahme von Teilernten, eine längere Prozesszeit von 216 h ermöglicht werden, so dass es zu einer Anreicherung des Zielpeptids im Überstand kam. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration und der rmHD5-Konzentration in den Konzentraten nach Tangentialfiltration über eine 10 kDa-Membran liefert für den kurzen 20 L Maßstab-Prozess eine Gesamtausbeute von 318 mg/L rmHD5_{crude}. Die PeptidAusbeute im Überstand der 25 L Fermentation, die über 216 h unter Entnahme von Teilernten lief, lag durch die längere Expressionszeit mit 660 mg/L rmHD5_{crude} deutlich höher. Abbildung 3.33 zeigt den Vergleich der Gesamtausbeuten an rmHD5_{crude} und Gesamtproteine im Konzentrat beider Prozesse. Durch Verdopplung der Prozesszeit konnte, mit einer ähnlichen täglichen Ausbeute von 68-73 [mg/L]/d rmHD5_{crude} in beiden Prozessen, ebenfalls die Verdopplung der Ausbeute entsprechend gezeigt werden. Im Zuge der Expression des mHD5 ist die Zunahme der *Pichia*-eigenen Proteine ebenfalls nachweisbar.

Ergebnisse

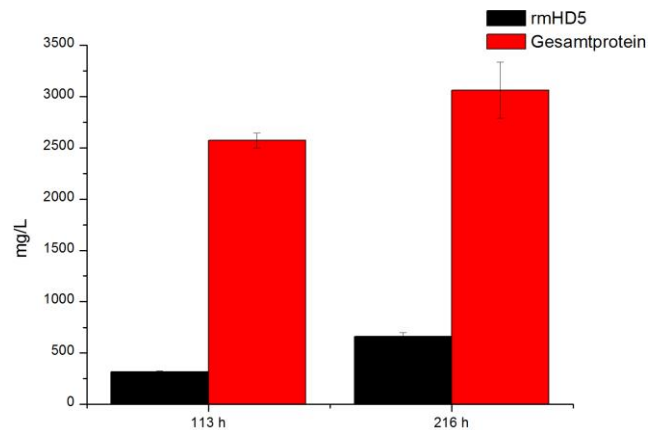


Abbildung 3.33

Vergleich der Gesamtausbeute der sekretierten und aufkonzentrierten rmHD5_{crude} und Gesamtproteine nach 113 h bzw. 216 h Fermentationen in *P. pastoris*.

Die Ausbeuten beziehen sich auf den Peptid- und Proteingehalt im Konzentrat des Überstandes. Die Peptidkonzentrationsbestimmung des rmHD5 erfolgte mittels RP-HPLC ($R^2=0,9977$, kalibriert mit synthetischem HD5), die Gesamtproteinkonzentration mittels BCA ($R^2=0,9929$, kalibriert mit BSA). Im Fed-Batch-Prozess I (216 h) wurden nach 70, 96, 140 und 167 h Teilernten entnommen. Diese wurden nicht über eine Tangentialflussfiltration konzentriert und fließen daher nicht in die Ausbeutedarstellung mit ein. Im Fed-Batch-Prozess II (113 h) wurden keine Teilernten entnommen. Die Gesamtausbeuten des rmHD5 (schwarz) bzw. der Gesamtproteine (rot) beziehen sich auf die Ausgangsvolumina der jeweiligen Fermentationsüberstände, die ankonzentriert wurden (Prozess I: 18,030 L; Prozess II: 18,373 L).

Ausgehend von den Vorversuchen wurde für die Isolierung des rmHD5 aus den *Pichia*-Überständen der Produktionsläufe (20 L- und 25 L-Maßstab) zunächst eine Filtration der jeweiligen Überstände in einer Tangentialflussfiltration über eine Membran (0,22 μm) durchgeführt. Anschließend wurde das rmHD5 im Filtrat (0,22 μm) über einen Konzentrations- und Diafiltrationsprozess über eine 10 kDa-Membran aufkonzentriert und umgepuffert. Der Nachweis der Wiederfindungsrate und Ausbeuteverluste des rmHD5 im Prozessschritt Filtration wurde lediglich für Prozess II durchgeführt. Nach Zentrifugation konnte der Überstand über eine Pelicon Mini Cassette (0,22 μm , 0,093 m^2) mit einer Ausbeute von 90 % filtriert und grobe Pigmentpartikel, die im Retentat erkennbar waren, leicht entfernt werden (Tabelle 3.4). Das klare grünliche Filtrat wurde im Anschluss über eine 10 kDa-Membran 10-fach aufkonzentriert und diafiltriert (2.2.3.11). Abbildung 3.34 zeigt die Expression des rmHD5, die Filtration und Isolierung über Tangentialflussfiltration. Durch

die Detektion des Peptids mit dem spezifischen Anti-HD5-Antikörper kann die erfolgreiche Expression des Peptids in den Fraktionen über Western Blot nachgewiesen werden.

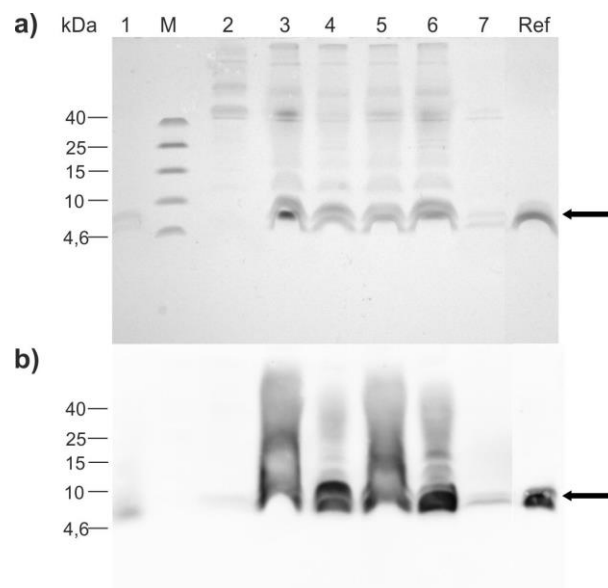


Abbildung 3.34

Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) (a) und Western Blot (b) der Fermentation und Capture des rmHD5 im 20 L-Maßstab.

Aufgetragen sind die Überstände vor und 4 Tage nach Induktion (Ernte), sowie die Proben des Aufarbeitungsprozesses über Tangentialflussfiltration (0,22 μm und 10 kDa-Membran). Der Nachweis über Western Blot erfolgte unter Verwendung des spezifischen Anti-HD5-Antikörpers.

M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder; Ref: synth. HD5, 1: NaOH-Waschschrift der 0,22 μm -Membran, 2: rmHD5 0 d vor Induktion, 3: rmHD5 4 d nach Induktion (Ernte), 4: Konzentrat (0,22 μm Filtration), 5: Filtrat (0,22 μm Filtration), 6: Konzentrat (10 kDa), 7: Filtrat (10 kDa). Für die Detektion Spur 1 und 7 wurde jeweils 1 mL über den Evaporator 50-fach aufkonzentriert und aufgetragen.

Der Verlust von ca. 6% im Filtrationsschritt konnte durch einen Kontrollwaschschrift der 0,22 μm -Membran mit 100 mM NaOH und anschließenden Aufkonzentrieren der zu analysierenden Probe über die Detektion einer Proteinbande auf Höhe des synthetischen HD5 nachgewiesen werden (Abbildung 3.34, Spur 1). Eine minimale Detektion einer Proteinbande auf Höhe der Referenz im Filtrat der 10 kDa-Membran deutet auf einen leichten Verlust des Peptids hin. Dies konnte aufgrund der hohen Verdünnung über RP-HPLC nicht eindeutig quantifiziert werden. Das rmHD5 konnte im Konzentrat nach Aufkonzentrierung und Diafiltration über eine 10 kDa-Membran mit einer Ausbeute von 318 mg/L nachgewiesen werden (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 Zusammenfassung der Gesamtexpressionsausbeute des rmHD5_{crude} im 20 L-Maßstab und der Ausbeuteverluste des Capture-Prozessschritts.

Die Peptidkonzentrationsbestimmung erfolgte über RP-HPLC ($R^2=0,9977$). Dargestellt sind die Ausbeuten in den Überständen bzw. in den Konzentraten nach Aufkonzentrierung und Diafiltration über eine 10 kDa-Membran. Die theoretische rmHD5 Konzentration im Filtrat (0,22 μm) ergibt sich nach Abzug des rmHD5 Anteils im Retentat (0,22 μm). Die Bestimmung der rmHD5 im Filtrat stellt den Messwert einer Einfachbestimmung dar (*). Die Berechnung der Gesamtausbeute rmHD5 [mg/L] wurde bezüglich des Fermentationsendvolumens von 26 L bzw. des Fermentationsüberstandes von 18,373 L berechnet.

	rmHD5 [mg]	rmHD5 [mg/L] <i>Fermentation</i>	rmHD5 [mg/L] <i>Überstand</i>	Ausbeute [%]	Wiederfindung [%]
Fermentationsüberstand	5474 ($\pm 2\%$)	211	298		
Konzentrat (0,22 μm)	239 ($\pm 1\%$)		13		
<i>Filtrat (0,22 μm)^{theoretisch}</i>	5235	201	285		
Filtrat (0,22 μm)	4908*	189	267		
<i>Filtration</i>				90	94
Konzentrat (10 kDa)	5840 ($\pm 1\%$)	225	318	119	
Filtrat (10 kDa)	<i>n.d.</i>				
<i>Konzentration & Diafiltration</i>					119

Insgesamt konnten durch den Übertrag der Prozessbedingungen aus den 4 bis 5 L-Maßstab in den größeren Maßstab Gesamtausbeuten von 318 mg/L (113 h) bzw. durch Verdopplung der Prozesszeit entsprechend 660 mg/L (216 h) an rekombinanten mHD5 (rmHD5_{crude}) im Konzentrat gewonnen werden. Tabelle 3.5 gibt die Ausbeuten des rmHD5_{crude} im 25 L-Maßstab wieder. Zur Aufreinigung des sekretierten und aufkonzentrierten rmHD5 wurde nur das Konzentrat der Tangentialflussfiltration (10 kDa-Membran) verwendet.

Tabelle 3.5 Tabellierte Zusammenfassung der Prozessausbeuten für die Herstellung von rmHD5 in *P. pastoris* im 25 L-Maßstab.

Die Peptidkonzentrationsbestimmung erfolgte über RP-HPLC ($R^2=0,9977$). Dargestellt sind die Ausbeuten in den Überständen bzw. in den Konzentraten nach Aufkonzentrierung und Diafiltration über eine 10 kDa-Membran. Die theoretische Gesamtausbeute des Prozesses wurde unter Einberechnung der rmHD5-Ausbeuten in den Teilernten dargestellt. Diese wurden in der Weiterverarbeitung nicht einbezogen, so dass der tatsächliche Gewinn das Konzentrat des Ernteüberstandes mit 11895 mg darstellt.

	Volumen [mL]	rmHD5 [mg]	rmHD5 [mg/L]
Fermentationsvolumen	25 000		
Teilerntevolumen I	4000		
Überstand Teilernte I	3200	234 ($\pm 24\%$)	73 ($\pm 24\%$)
Teilerntevolumen II	2000		
Überstand Teilernte II	1550	160 ($\pm 12\%$)	103 ($\pm 11\%$)
Teilerntevolumen III	2000		
Überstand Teilernte III	1400	275 ($\pm 8\%$)	196 ($\pm 8\%$)
Teilerntevolumen IV	4000		
Überstand Teilernte IV	2550	689 ($\pm 6\%$)	270 ($\pm 6\%$)
Erntevolumen	28300		
Fermentationsüberstand	18030	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
Filtrat (0,22 μm)	17850	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
Konzentrat (10 kDa)	1500	11895 ($\pm 5\%$)	660 ($\pm 5\%$)
<i>Theo. Gesamtprozessausbeute</i>	26730	13253 ($\pm 8\%$)	496 ($\pm 8\%$)

3.2.2.4 Kationenaustauschchromatographie zur Reinigung des rmHD5

Im Zuge des Screenings zum Säulenmaterial und zu den Puffereigenschaften wurden durch Voruntersuchungen bereits die Parameter der Aufreinigung des rmHD5 über Kationenaustauschchromatographie festgelegt (3.2.2.2). Die Aufreinigung des rekombinanten humanen α -Defensins 5 erfolgte an einem FPLC-System (Äkta Explorer 100, GE Healthcare, Freiburg) über eine XK 26/40 Säule, gepackt mit Toyopearl SP-650M (CV=111 mL) (2.2.3.12). Da die Säulenkapazität für die Aufreinigung der jeweiligen gesamten Fermentationsüberstände zu gering war, musste die Aufreinigung in mehreren Chargen à 50 mL Probenvolumen (Konzentrat) erfolgen. Das von *P. pastoris* sekretierte Zielpeptid wurde bereits über den Capture-Prozessschritt 10-fach aufkonzentriert und über Diafiltration für die Säulenchromatographie in 20 mM NH₄OAc, pH 4,2 umgepuffert (2.2.3.11). Bei einer Flussrate von 5 mL/min erfolgte die Äquilibration der Säule mit Ammoniumacetat-Puffer (20 mM, pH 4,2) und der Probenauftrag des grünlichen Konzentrats. Abbildung 3.35 zeigt die schrittweise Aufreinigung des Peptids einer Charge über einen optimierten Stufengradienten in einer Kationenaustauschchromatographie. Durch Waschen mit dem Äquilibrationpuffer konnten unspezifisch gebundene Proteine sowie die von *P. pastoris* Fermentationen bedingten grünen Farbpigmente von der Säule verdrängt werden. Über die Erhöhung der Ionenstärke (250 mM NaCl, 3 CV) konnte die Abtrennung des Großteils schwächer bindenden Kontaminanten erfolgen (Spur 3). In einem zweiten Waschschrift (400 mM NaCl, 3 CV) ist die Ionenstärke bereits so hoch, dass ebenfalls das Defensin in der Waschfraktion wiedergefunden wird (Spur 4). Während dieser Schritt in einen Teilverlust des Zielprodukts resultiert, ermöglicht er gleichzeitig die vollständige Entfernung stärker bindender Rest-Kontaminanten. Durch die abschließende Elution des rmHD5 über 4 CV Elutionspuffer (20 mM NH₄OAc, 1 M NaCl, pH 4,2) konnte das rekombinante humane α -Defensin 5 in einer sehr hohen Reinheit gewonnen werden (Spur 5).

Ergebnisse

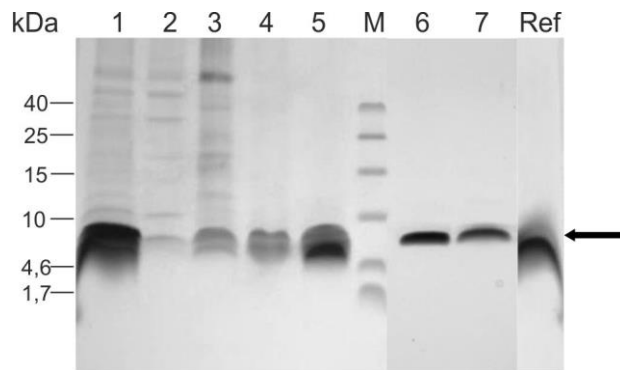


Abbildung 3.35

Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) der Aufreinigung des rmHD5 über Ionenaustauschchromatographie (Toyopearl SP-650M) und anschließender Entsalzung (Sephadex G10).

Aufgetragen sind neben der aufgetragenen Probe (Konzentrat) (1) die Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie (2-5) und des entsalzten Peptids (6-7).

M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder; Ref: synth. HD5, 1: rmHD5-Konzentrat (10 kDa), 2: Durchlaufraction, 3: Fraktion Waschschrift I (150 mM NaCl), 4: Fraktion Waschschrift II (400 mM NaCl), 5: Eluat rmHD5, 6: Durchlaufraction der Entsalzung rmHD5, 7: lyophilisiertes rmHD5.

Die Fraktionierung des rekombinanten humanen α -Defensins 5 erfolgte anhand der Absorption bei 220 nm. Über Tricin-SDS-Gelelektrophorese, RP-HPLC und BCA-Analyse wurden die Fraktionen auf ihre Ausbeute und Reinheit hin überprüft. Die Analyse des Eluats über Gelelektrophorese liefert eine reine Proteinbande auf der Höhe der Referenzprobe (Abbildung 3.35, Spur 5). Das Vorhandensein eines leichten „Schattens“ könnte die Doppelbande andeuten.

Zur Lagerung des rmHD5 erfolgte im Anschluss an die Elution die Entsalzung. Dazu wurden verschiedene Verfahren untersucht. Aufgrund der großen Volumina der Eluatfraktionen mehrerer Chargen sollte die Entwicklung eines zeit- und kostensparenden Entsalzungsprozesses unter Berücksichtigung einer möglichen Aufkonzentrierung erfolgen. Die der Ionenaustauschchromatographie gegenläufige Hydrophobe Interaktionschromatographie wurde durch Screening verschiedener HIC-Säulenmaterialien (ToyoScreen HIC Mix Pack, 5 mL, Tosoh Bioscience, Stuttgart) untersucht. Keine der Gelmaterialien zeigte sich jedoch für die Entsalzung bezüglich der Ausbeute vielversprechend (Daten nicht gezeigt). Die Dialyse gegen das 100-fache Volumen eines neutralen Puffers (20 mM NaPi, pH 7,2) sowie gegen ddH₂O wurden unter stufenweisen Minderung der Salzkonzentration durchgeführt. Keine der durchgeführten Entsalzungsmethoden zeigte sich erfolgreich. Die häufig auftretende Bildung von Präzipitaten konnte weder durch den Zusatz von Salz,

Ergebnisse

Variation der Puffersubstanz noch durch pH-Wert Änderung unterbunden werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Entsalzung über die Säulenchromatographie untersucht. Die Entsalzung über ein Gelfiltrationsmaterial führt zu einer Verdünnung der Probe und somit zur Generierung größerer Volumina. Durch den Einsatz eines volatilen Ammoniumacetat-Puffers, der bereits als Äquilibrationpuffer in der Ionenaustauschchromatographie eingesetzt wurde, konnte sowohl die Entsalzung über Sephadex G10 als auch die anschließende Aufkonzentrierung über Gefriertrocknung zu einem salzfreien Pulver erfolgreich durchgeführt werden.

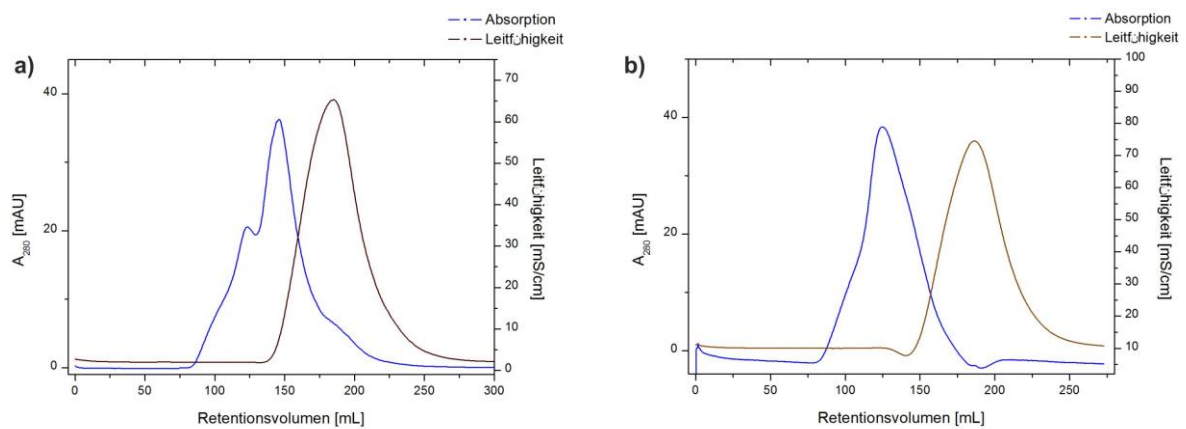


Abbildung 3.36 Entsalzung des rmHD5 über Sephadex G10 mit 20 mM NH₄OAc (a) und 100 mM NH₄OAc (b).

Die Entsalzung der Eluatfraktion des Kationenaustauschers wurde chargenweise (10-15% CV) über eine XK 50/20 Sephadex G10 (CV=275 mL) mit volatilem Ammoniumacetat-Puffer durchgeführt. Die Entsalzung mit 20 mM NH₄OAc-Puffer (pH 4,2) führt zu einer teilweisen „Co-Elution“ des Produkt- und Salzpeaks (a) während der Einsatz eines höhermolaren Puffers zu einer besseren Trennung der Peaks führt (b).

Zur Entsalzung des Eluats wurde in einer XK 50/20-Säule das Sephadex G10 (CV=275 mL) mit volatilem Äquilibrationpuffer (20 mM NH₄OAc, pH 4,2) äquilibriert. Die Entsalzung erfolgte jeweils mit einem Probenvolumen von 10-15% des Säulenvolumens, einer Flussgeschwindigkeit von 10 mL/min und die Fraktionierung anhand des UV-Signals bei 220 nm. Das Chromatogramm der Entsalzung von rmHD5 mit 20 mM NH₄OAc zeigte eine schlechte Trennung des Produktpeaks vom Salzpeak (Abbildung 3.36 a). Die „Co-Elution“ des Produkt- und Salzpeaks führt ebenfalls zu einer verlustreichen Entsalzung. Durch die Erhöhung der Ionenstärke (100 mM Ammoniumacetat-Puffer) konnte dieser Verlust weitestgehend vermieden werden und Ausbeuten, abhängig vom Probenvolumen, über 90%

erzielt werden. Durch anschließende Gefriertrocknung (2.2.3.13) wurde das rmHD5 als weißes pulveriges Lyophilisat erhalten und weiter charakterisiert. Tabelle 3.6 zeigt die Gesamtausbeute der einzelnen Aufarbeitungsprozesse bezogen auf die Gesamtausbeute der 20 L Fermentation nach Aufreinigung des rmHD5. Die Berechnung erfolgte anhand der Peptidkonzentrationsbestimmung über RP-HPLC. Die Gesamtausbeute von 48 – 49% wurde durch Vermessung weiterer Chargen bestätigt, ebenso für die Aufreinigung des rmHD5 ausgehend des 25 L-Ansatzes.

Tabelle 3.6 Zusammenfassung der Gesamtprozessausbeute und der einzelnen Prozessschritte der Aufreinigung des rmHD5.

Die Peptidkonzentrationsbestimmung erfolgte über RP-HPLC ($R^2=0,9977$). Dargestellt sind die entscheidenden Probenfraktionen, die zur Aufreinigung verwendet werden. Ausbeuten in den Überständen, Konzentraten und Fraktionen wurden anhand der Peptidkonzentrationsbestimmung über RP-HPLC für die Charge einer Aufreinigung bestimmt und auf das Gesamtvolumen der Fermentation umgerechnet.

	rmHD5 [mg]	rmHD5 [mg/L] <i>Fermentation</i>	rmHD5 [mg/L] <i>Überstand</i>	Ausbeute [%]	Wiederfindungsrate [%]
Fermentationsüberstand	5474 ($\pm 2\%$)	211	298		100
Filtrat (0.22 μm)	(4908)			94	90
Konzentrat (10 kDa)	5866 ($\pm 1\%$)			120	120
Kationenaustauscher (Toyopearl SP-650M)	3292 ($\pm 2\%$)			56	95
Entsalzung (Sephadex G10)	2672 ($\pm 0,2\%$)	103	145	81	97
<i>Gesamtausbeute</i>				49	

Durch die Optimierung des Stufengradienten konnte rmHD5 erfolgreich über ein zweistufiges Reinigungsverfahren (Konzentration & Diafiltration (1), Ionenaustauschchromatographie (2)) in hoher Reinheit gewonnen werden. Das reine humane α -Defensin 5 konnte mit einer Prozessausbeute von 49% mit 145 mg/L aus dem *Pichia*-Überstand aufgereinigt werden. Die entsprechende Ausbeute der Fermentation im 25 L-Maßstab über 216 h wurden ebenfalls über die Quantifizierung mittels RP-HPLC bestimmt und lag mit 660 mg/L rmHD5_{crude} und 323 mg/L an aufgereinigtem rmHD5 höher.

Im Zuge der Aufreinigung einer Vielzahl von Chargen verschiedener Fermentationen konnte teilweise ein leicht grünliches Lyophilisat als Endprodukt beobachtet werden. Die Konsistenz des Lyophilisats war im Vergleich aller vorherigen Chargen fester und ließ sich nicht mehr vollständig in ddH₂O lösen. Während bisher die Einwaage von Lyophilisat und

Ergebnisse

anschließender Proteinkonzentrationsbestimmung über BCA sehr gut korrelierten, konnte bei einigen Chargen dies nicht bestätigt werden. Die Einwaage zeigte sich fünf-fach höher als die Proteinkonzentrationsbestimmung über BCA bzw. teilweise zehnfach höher als nach RP-HPLC. Die in *P. pastoris* Fermentationen gebildeten grünen Farbpigmente zeigten sich somit nicht nur problematisch für die exakte Einwaage des Peptids sondern auch in der Konzentrationsbestimmung mit BCA und in ihrer Löslichkeit. Daher wurde zur Bestimmung der Peptidkonzentration, sofern möglich, wenn nicht anders vermerkt über RP-HPLC durchgeführt. Die Problematik des verbleibenden Grünanteils konnte weder durch die Fermentation des rmHD5 in einem kurzen Fermentationsprozess (113 h) noch durch Erneuerung des Säulenmaterials gelöst werden. Die Überprüfung von Prozessparameter (Verweilzeit auf der Säule, Flussgeschwindigkeiten der Waschschrte) zeigte keine Lösung dieses Problems. Zur weiteren Charakterisierung des Peptids wurden daher lediglich Lyophilisate jener Chargen eingesetzt, die keinen Grünanteil zeigten, sehr gut in ddH₂O löslich waren und die Überprüfung der Peptidkonzentrationen mit der Ist-Einwaage korrelierten.

3.2.2.5 Charakterisierung des aufgereinigten rmHD5

Zur Charakterisierung des aufgereinigten, lyophilisierten rmHD5 wurde das Peptid in ddH₂O auf eine Endkonzentration von 1 mg/mL gelöst und sowohl die Retentionszeit als auch die Reinheit über analytische RP-HPLC mit der synthetischen Referenz verglichen. Die Trennung von 10 µL Peptidlösung erfolgte über eine C18-Säule (Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4,6x150 mm, Agilent) mit einem linearen Gradienten von 10-60% Acetonitril (0,1% TFA) über 40 min mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min (2.2.4.4). Anhand des Chromatogramms konnte die Detektion des rmHD5 bei 220 nm beobachtet werden. Die hohe Reinheit des Peptids konnte sowohl anhand des Tris-Tricin-Gels (Abbildung 3.35, Spur 6 und 7) als auch durch die analytische RP-HPLC (Abbildung 3.37) bestätigt werden. Das Vorhandensein eines kleinen Vorpeaks deutet auf eine minimale Verunreinigung hin, die durch Gelelektrophorese nicht beobachtet werden kann. Der Vergleich der Retentionszeit des rekombinant hergestellten Peptids beträgt 12,96 min und stimmt mit der des synthetischen Peptids (13,13 min) gut überein.

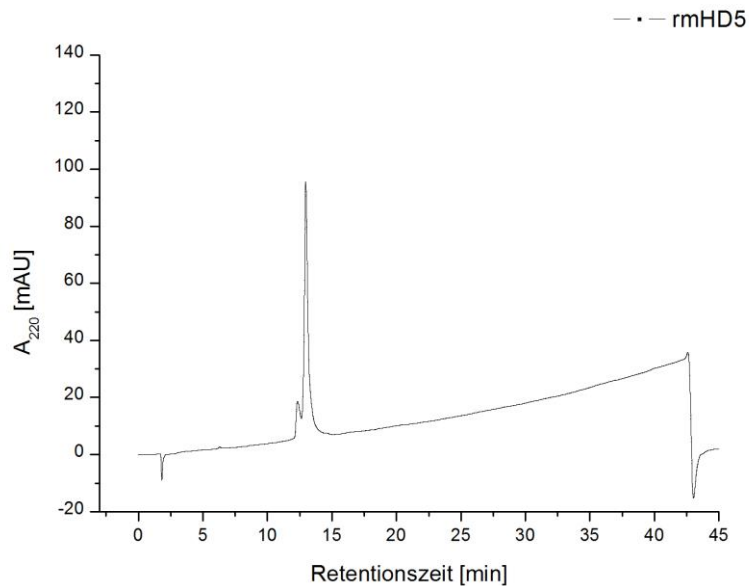


Abbildung 3.37

Analytische RP-HPLC des aufgereinigten und lyophilisierten rmHD5.

Die Auftrennung erfolgte über RP-HPLC (Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4,6x150 mm, Agilent). Die Säule wurde mit Lösungsmittel A (ddH₂O, 0,1% TFA) und B (ACN, 0,1% TFA) im Verhältnis 90:10 äquilibriert. Das Produkt wurde über einen linearen Gradienten des Lösungsmittels B (ACN, 0,1% TFA) über 40 min eluiert (10-60%). Die Detektion erfolgte bei über Absorption bei 220 nm.

Ergebnisse

Die Reinheit des rekombinant hergestellten und aufgereinigten mHD5 ist ebenfalls mit der des kommerziellen Peptids vergleichbar (Abbildung 3.38 a). Wie bereits durch die geringe Abweichung der Retentionszeit erkennbar, ist auch bei genauerer Betrachtung der Peaks eine leichte Verschiebung der Peakflächen zu beobachten (Abbildung 3.38 b). Der massenspektrometrische Nachweis des Lyophilisats rmHD5 erfolgte über LC-ESI-MS (Life Science Center, Universität Hohenheim) und bestätigt die erfolgreiche Herstellung des Peptids mit der Masse 3580,63 Da. Während im Massenspektrum des synthetischen HD5 (3580,62 Da) (Abbildung 6.1) keine weiteren Verunreinigungen zu erkennen sind, zeigt das Spektrum des rmHD5 13 Nebenprodukte (Abbildung 3.39). Die Analyse der Massen schließt das Vorhandensein von Oligomeren bzw. glykosylierten rmHD5 aus und deutet aufgrund der Massendifferenz (284,18 Da bis 1497,80 Da) auf 13, durch jeweils unterschiedlicher Anzahl zusätzlicher Aminosäuren, verschieden verlängerte rmHD5-Sequenzen hin. Das Massenspektrum des LC-ESI-MS liefert anhand der Ionensignale eine Hauptkomponente mit der Masse 4608,15 Da.

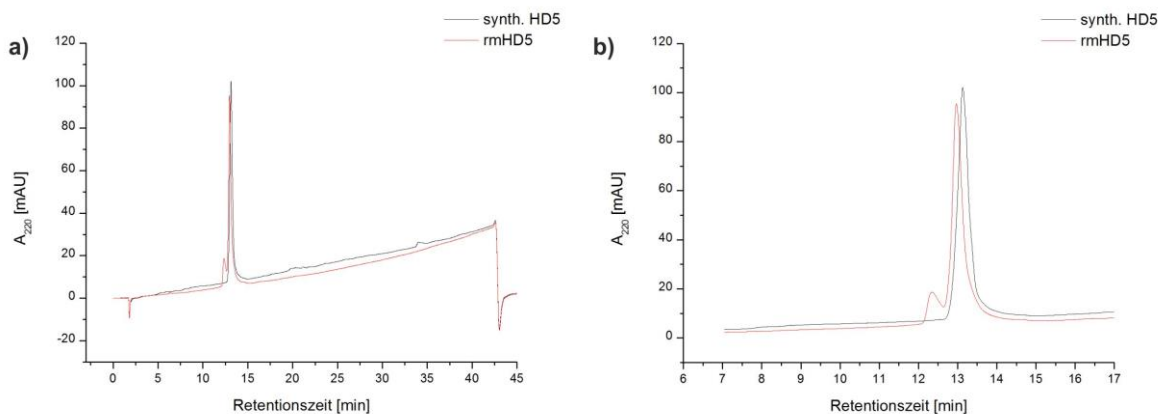


Abbildung 3.38

Vergleich der über RP-HPLC aufgetrennten rmHD5 mit synthetischem HD5 (a) und Ausschnitt aus dem Chromatogramm zur Darstellung der Retentionszeitabweichung (b).

Die Auftrennung erfolgte über eine C18-Säule (Eclipse XDB-C18, 5 μ m, 4,6x150 mm, Agilent). Die Säule wurde mit Lösungsmittel A (ddH₂O, 0,1% TFA) und B (ACN, 0,1% TFA) im Verhältnis 90:10 äquilibriert. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten (10-60%) des Lösungsmittels B (ACN, 0,1% TFA) über 40 min und bei 220 nm.

Ergebnisse

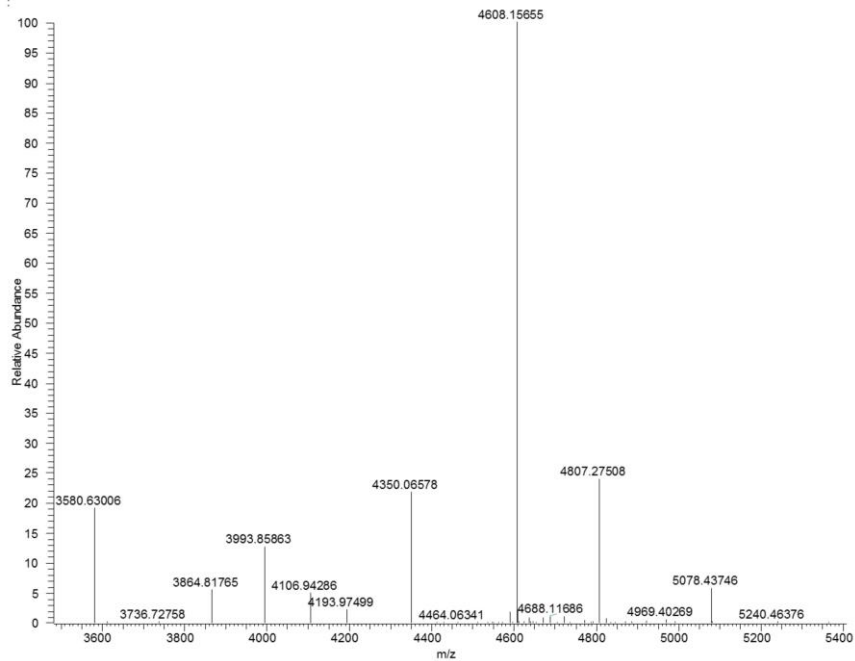


Abbildung 3.39

Massenspektrometrischer Nachweis des rmHD5 über LC-ESI-MS.

Die Messung und Darstellung der Abbildung erfolgte durch das Life Science Center, Universität Hohenheim (Stuttgart). Im höher molekularen Massenspektrum des rmHD5 (3580 Da) kann eine Serie an Massen identifiziert werden, die aufgrund der Massendifferenz auf eine verlängerte Aminosäuresequenz des mHD5 deuten. Als Hauptprodukt wird das Peptid der Masse 4608 Da nachgewiesen.

Die Differenz des Hauptnebenproduktes mit einer Masse von 4608,15 Da beträgt zum Hauptprodukt 1027,52 Da und kann exakt der Summe der neun Aminosäuren (EEGVSLEKR) am C-Terminus des α -Faktor-Prepropeptids aus *S. cerevisiae* zugeordnet werden. Die weiteren Nebenprodukte bilden weitere verlängerte rmHD5-Peptide mit 1 bis 15 zusätzliche N-terminale Aminosäuren des α -Faktor-Prepropeptids. Zur Verifizierung der Aminosäuren erfolgte eine Peptid-Massen-Fingerprint-Analyse (Life Science Center, Universität Hohenheim, Stuttgart), die diese Ergebnisse bestätigten. Zur Veranschaulichung der Zusammensetzung der Peptide dient die folgende Abbildung 3.40.

Ergebnisse



Abbildung 3.40 Übersicht der verlängerten Aminosäuresequenzen des falsch prozessierten rekombinanten rmHD5.

Das Zielpeptid mHD5 ist rot dargestellt, die Aminosäuren verbleibend aus der Kex2-Schnittstelle in blau. Die aus der Signalsequenz stammenden Aminosäuren sind grün dargestellt. Die verschiedenen Produkte sind den Massen zugeordnet. Das Hauptprodukt zeigt im Vergleich zum Zielprodukt mHD5 9 extraterminale Aminosäuren, resultierend aus der Signalsequenz (EEGVSLE) und der Kex2-Schnittstelle (KR).

Trotz der spezifischen und korrelierenden Nachweise des rmHD5 über Tricin-SDS-Gel-Elektrophorese und Western Blot-Analyse sowie RP-HPLC, konnte das rekombinante α -Defensin 5 basierend auf dem Massenspektrogramm nicht als das Hauptprodukt nachgewiesen werden.

Das Nebenprodukt mit der Masse 4608,15 Da zeigt sich als das Hauptprodukt des entsprechenden Peaks bei 12,96 min (Abbildung 3.37). Eine Quantifizierung der Anteile ist nicht möglich.

3.2.3 Untersuchung möglicher Strategien zur Vermeidung der Fehlprozessierung

Zur Vermeidung der Fehlprozessierung von N-terminalen Aminosäuren an rmHD5 wurde im Vorfeld die Klonierung des Konstruktes unter Deletion der Ste13-Proteaseschnittstelle durchgeführt. Durch die Deletion der Ste13-Schnittstelle sollte das native Zielpeptid ohne N-terminale Aminosäuren erhalten werden können. In keiner der durchgeführten (insgesamt vier Prozesse) konnte dies beobachtet werden. Zur Vermeidung der Fehlprozessierung wurde sowohl der Einfluss von Prozessparameter als auch der Einfluss des nativen Prosegments auf die Prozessierung untersucht. Darüber hinaus wurde die Trennung der Nebenprodukte über Säulenchromatographie bzw. *in vitro* Proteolyse weiter verfolgt.

3.2.3.1 Untersuchung des Einflusses von Prozessparameter auf die Prozessierung

3.2.3.1.1 Temperatursenkung

Die Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Prozessierung wurde unter denselben Bedingungen im 4 L-Maßstab in Basalsalzmedium mit 5% (w/v) Glycerin bei pH 5,0 und 30°C durchgeführt (2.2.3.9.1). Da durch eine niedrige Temperatur das Zellwachstum und die Expression verlangsamt werden, wurde nach der Temperatursenkung auf 22°C zunächst die Zelldichte durch Fütterung mit Glycerin auf eine OD₆₀₀ von ca. 300 erhöht. Die Fütterung von 98% Glycerin erfolgte zu 20 g/h (insgesamt 370 g). Nach weiterer Senkung der Temperatur auf 17°C wurde bei einer OD₆₀₀ ~330 die Expression des Gens, codierend für *mHD5*, durch Induktion mit Methanol initiiert. Die Induktion erfolgte mit 16 g MeOH (6 ml/L PTM1-Lösung). Die weiteren Prozessparameter wurden entsprechend der vorherigen Fermentationen übernommen. Nach insgesamt 170 h konnte bei einer OD₆₀₀ ~643 die Ernte erfolgen.

Ergebnisse

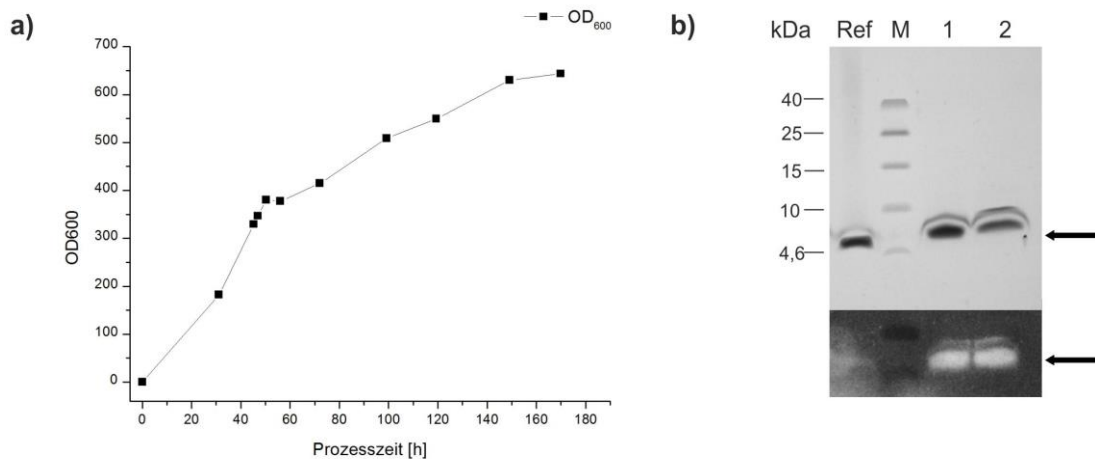


Abbildung 3.41

Wachstumsverlauf der Fermentation von rmHD5 in *P. pastoris* bei 17°C und Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) und Western Blot-Analyse des aufgereinigten rmHD5.

- a) Darstellung der Zunahme der Zelldichte. Nach 23 h erfolgte die Senkung der Temperatur auf 22°C und die Fütterung mit 98% Glycerin. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 300 wurde die Temperatur auf 17°C gesenkt und die Induktion mit Methanol erfolgte nach insgesamt 48 h Prozesszeit. Der Prozess wurde nach 170 h beendet.
- b) Tris-Tricin-Gel (16,5%) und dazugehöriger Western Blot mittels Anti-HD5-Antikörper zeigen das aufgereinigte rmHD5. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder; Ref: synth. HD5, 1: Eluat des Kationen-austauschers, 2: Durchlauf fraktion der Entsalzung rmHD5.

Trotz der Temperatursenkung konnte durch die Zugabe von Glycerin und Prozessanpassung innerhalb von 170 h eine hohe Zelldichte und Biofeuchtmasse von 400 g/L erzielt werden (Abbildung 3.41 a). Nach Zentrifugation und Capture-Schritt des rmHD5 über Tangentialflussfiltration (2.2.3.11) wurde nach Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie (2.2.3.12) das aufgereinigte Peptid weiter auf die Prozessierung hin untersucht. Anhand der Abbildung 3.41 b kann gezeigt werden, dass der Prozess zur Expression des rmHD5 in *P. pastoris* ebenfalls bei 17 °C erfolgreich durchgeführt werden konnte. Das Vorhandensein eines Vorpeaks im RP-HPLC-Chromatogramm deutete erneut auf das Vorhandensein eines Peptids größerer Masse bzw. mehrerer Produkte hin, das schließlich durch die massenspektrometrische Analyse über LC-ESI-MS bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Durch die Senkung der Temperatur konnte die Fehlprozessierung nicht beeinflusst bzw. vermieden werden.

3.2.3.1.2 Einfluss von Medium und Sauerstoffbegasung

Zur Untersuchung des Einflusses des Mediums auf die Prozessierung des Peptids wurde im Vergleich zu BSM das Komplexmedium BMGY eingesetzt. Dieses besitzt durch den Anteil an Hefeextrakt viele Aminosäure, die als Bausteine in der Prozessierung entscheidend sein könnten. Beide Fermentationsprozesse zur Expression des Gens, codierend für das *mHD5*, in *P. pastoris* wurden unter sauerstofflimitierenden Bedingungen durchgeführt (2.2.3.9.2). Um einen Einfluss der Sauerstofflimitierung auf die Fehlprozessierung auszuschließen wurde jeweils in zwei weiteren Ansätzen der Gelöstsauerstoffgehalt im Prozess erhöht. Da eine Steigerung des Gelöstsauerstoffgehalts durch die Erhöhung der Rührerdrehzahl, aufgrund schädigender Wirkung durch Scherkräfte auf die Zellen, nicht möglich ist, wurden die Prozesse mit Sauerstoff begast. Dazu wurde reiner Sauerstoff über eine Gasmixstation in die Zuluft des Reaktors gemischt. Um die Prozesse direkt miteinander zu vergleichen, wurden vier 0,6 L-Ansätze (M1-M4) in Multifors-Bioreaktoren parallel betrieben. Tabelle 3.7 zeigt die Übersicht der verschiedenen Ansätze in den Reaktoren M1 bis M4.

<u>Reaktor</u>	<u>Medium</u>	<u>Sauerstoffbegasung</u>
M1	BSM	-
M2	BSM	ja
M3	BMGY	-
M4	BMGY	ja

Tabelle 3.7 Übersicht der verschiedenen Fermentationsansätze in den Multifors Reaktoren M1-M4.

Die Fermentationsprozesse M1 und M3 wurden unter sauerstofflimitierenden Bedingungen betrieben und unterscheiden sich im eingesetzten Medium (Basalsalzmedium oder Komplexmedium). Die Reaktoren M2 und M4 wurden jeweils zusätzlich mit reinem Sauerstoff begast und sind nicht sauerstofflimitierende Prozesse.

Ergebnisse

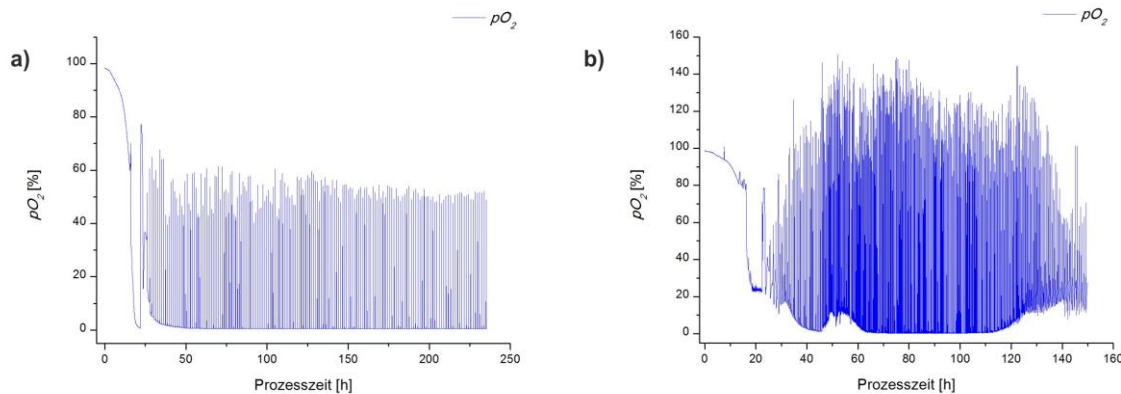


Abbildung 3.42

Sauerstofflimitierende und nicht-limitierende Fermentation von mHD5 in *P. pastoris* X-33 zur Untersuchung des Sauerstoffeinflusses auf die Prozessierung des rmHD5.

Nach vollständigem Verbrauch des Glycerins in der Batch-Phase erfolgt die Umstellung mit pO_2 -gesteuerter Methanol-Zufuhr in einen Fed-Batch-Prozess. Der pO_2 -Wert wurde in Echtzeit gemessen (blau). Die automatische Zugabe von Methanol erfolgte über die Software gesteuerte Feed Pumpe bei einem pO_2 -Wert von 40% (DO-spikes). Der Reaktor M1 wurde unter sauerstofflimitierenden Bedingungen betrieben (a), Reaktor M2 unter Sauerstoffbegasung (b). Die Begasung mit reinem Sauerstoff (bis 100%) führt zu einer starken Bioaktivität der Zellen, so dass die Fütterungsimpulse nah aufeinander folgen.

Die übrigen Parameter der 5 L-Prozessverfahren wurden entsprechend übernommen und gegebenenfalls für den 1 L-Bioreaktor angepasst. Die Umstellung in den Fed-Batch-Prozess erfolgte analog für M1 und M2 bei $OD_{600} \sim 100$. Da das Glycerin in M3 und M4 bereits bei einer OD_{600} von ~ 50 vollständig verstoffwechselt war wurden die BMGY-Ansätze bereits bei dieser optischen Dichte mit Methanol induziert. Die Temperatursenkung auf 23°C aller Fermenter erfolgte im Zuge der Induktion. Die Sauerstoffbegasung von M2 und M4 wurde zunächst über eine Sauerstoffzufuhr von 50% reinen Sauerstoff in die Zuluft eingestellt. Das schnelle Wachstum der Zellen unter Sauerstoffzufuhr führte zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch, so dass der Gasmix schrittweise von 60 auf 100% reinen Sauerstoff erhöht wurde. Durch die dadurch bedingte erhöhte Fütterungsrate, mussten vier (M4) bzw. sechs (M2) Teilernten entnommen werden. Durch die starke biologische Aktivität der Zellen in M2 und M4 wurde zudem die Kühlung des Reaktors erschwert und zeigte sich für die Durchführung dieses Prozesses nicht unproblematisch.

Ergebnisse

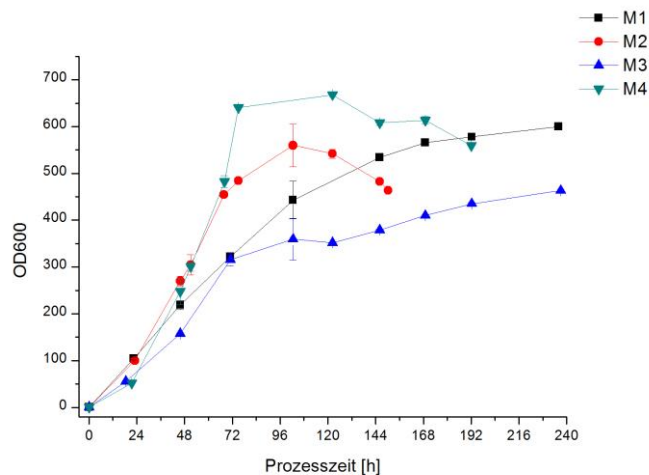


Abbildung 3.43

Wachstumsverläufe der Expression mHD5 in *P. pastoris* in Minimal- und Komplexmedium mit und ohne Sauerstoffbegasung.

Expression in Basalsalzmedium ohne Sauerstoffbegasung (M1, schwarz) wurde über 236 h, mit Sauerstoffbegasung (M2, rot) über 150 h durchgeführt. Die Expression des mHD5 erfolgte parallel in Komplexmedium ohne Sauerstoffbegasung für 237 h (M3, blau) und mit Sauerstoffbegasung (M4, grün) für 192 h. In den Fermentationen ohne Sauerstoffbegasung musste eine Teilernte jeweils erfolgen, in denen mit Sauerstoffbegasung insgesamt 6 Teilernten (M2) bzw. 4 Teilernten (M4). Nach einer steilen Zunahme der optischen Dichte in M2 und M4 kann eine Abnahme beobachtet werden. Aufgrund möglicher Zellschädigung durch die Sauerstoffbegasung mit reinem Sauerstoff wurden die Prozesse bereits früher beendet.

Abbildung 3.43 zeigt den starken Anstieg der Fermentations-Ansätze unter Sauerstoffbegasung innerhalb von 75 h auf OD₆₀₀ 485 (M2) bzw. 641 (M4). Nach einer maximalen Zelldichte von 560 innerhalb 103 h (M2) bzw. 668 in 122 h (M4) ist für beide Fermentationen im Wachstumsverlauf eine Abnahme der Zelldichte zu beobachten. Dieser Verlauf in beiden Prozessen deutet auf einen negativen Einfluss der Sauerstoffbegasung auf das Wachstum hin. Da durch die reine Sauerstoffbegasung und somit stark oxidativen Eigenschaften eine Zellschädigung nicht auszuschließen ist, wurden die Fermentationen nach 150 h (M2) bzw. 192 h (M4) beendet, die Fermentationsüberstände nach Zentrifugation geerntet und über eine Tangentialflussfiltration aufkonzentriert (2.2.3.11). Insgesamt zeigen sich die Fermentationsverläufe unabhängig vom eingesetzten Medium (M1 und M3 bzw. M2 und M4), jedoch abhängig von der Sauerstoffzumischung (M1 und M2 bzw. M3 und M4). Zur Aufkonzentrierung der Überstände wurden pro Ansatz die Überstände der Teilernten zusammen mit dem der Ernte vereint und aufgearbeitet. Die Analyse des rekombinanten Peptids rmHD5 über RP-HPLC sowie dessen Konzentrationsbestimmung lieferten ähnliche

Ergebnisse

Ergebnisse bezüglich der Peakform. Die Auftrennung über RP-HPLC zeigt in allen vier Fällen eine leichte Verschiebung der Retentionszeit im Vergleich zur HD5-Referenz und deutet bereits erneut auf die Fehlprozessierung in allen Ansätzen hin. Dies wurde weiter über MALDI-TOF-Analyse (Life Science Center, Universität Hohenheim, Stuttgart) bestätigt (Abbildung 3.44). Die über Kationenaustauschchromatographie aufgereinigten Produkte zeigen alle dasselbe Hauptnebenprodukt, das im synthetischen HD5 nicht beobachtet wird. Weder der Einsatz des aminosäurereichen Komplexmediums noch die zusätzliche Sauerstoffbegasung scheinen für die Prozessierung des mHD5 einen Einfluss zu haben.

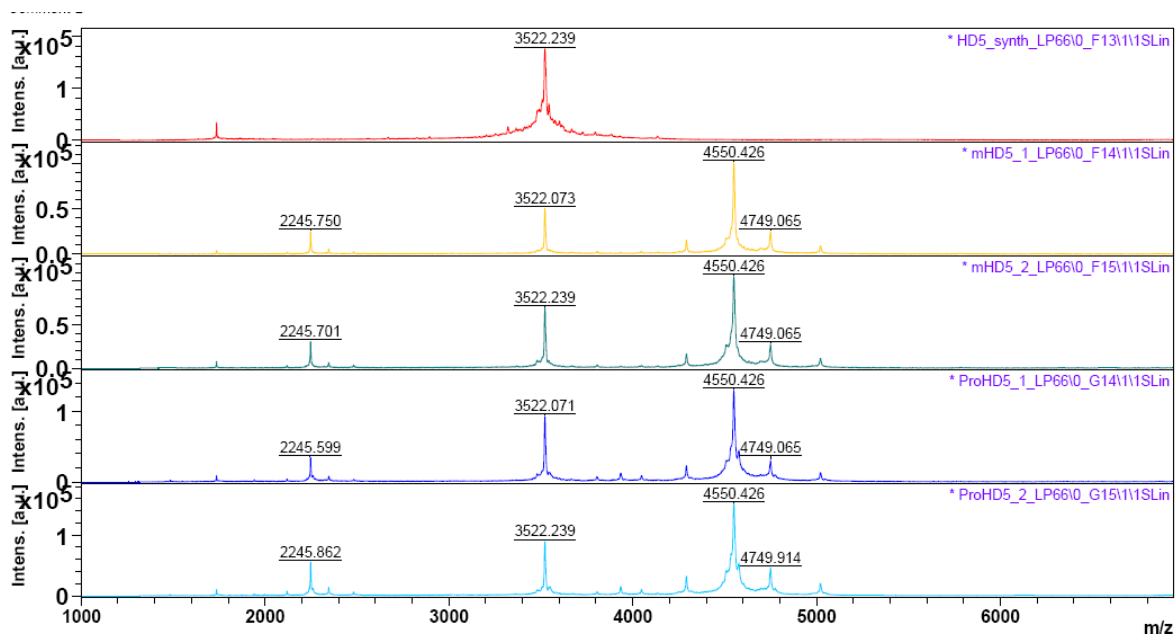


Abbildung 3.44

Massenspektrometrische MALDI-TOF-Analyse der exprimierten und aufgereinigten Produkte der Fermentation von rmHD5 in *P. pastoris* in Basalsalzmedium und Komplexmedium unter bzw. ohne Sauerstoffbegasung.

Die Messungen und Darstellung der Abbildung erfolgten durch das Life Science Center, Universität Hohenheim. Dargestellt sind die Massenspektren der rmHD5 Peptide der verschiedenen Fermentationsansätze M1 (gelb), M2 (grün), M3 (blau) und M4 (türkis). Zur Überprüfung der Fehlprozessierung wurde der Vergleich zum synthetischen mHD5 (3580 Da) herangezogen. Im höher molekularen Massenspektrum des rmHD5 (3580 Da) kann jeweils das Hauptnebenprodukt der Masse 4608 Da nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Durch die Konzentrationsbestimmung der über Tangentialflussfiltration aufkonzentrierten Überstände unterschiedlicher Ansätze wurde jeweils die Gesamtausbeute von M1-M4 bestimmt und die Prozesse diesbezüglich verglichen. Die höchste Ausbeute konnte über den bisher eingesetzten sauerstofflimitierenden Prozess in BSM mit 258 mg/L Überstand erreicht werden. Eine Sauerstoffbegasung wirkte sich in diesem Fall für die Ausbeute negativ aus (141 mg/L). Wird jedoch die Raum/Zeit-Ausbeute zum Vergleich beider Prozesse herangezogen, so liefern die Fermentationen ähnliche Ergebnisse (23-26 mg/L pro Tag) (Abbildung 3.45, b). Trotz der ähnlichen Ausbeute pro Tag kann unter Sauerstoffbegasung der Prozess aufgrund der vermutlich schädigenden Wirkung auf die Zellen jedoch nicht über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Mit einer Ausbeute von lediglich 146 mg/L (15 mg/L pro Tag) bzw. unter Sauerstoffbegasung 99 mg/L (12 mg/L pro Tag) zeigte sich die Fermentation von mHD5 in Komplexmedium deutlich geringer im Vergleich zu der in Basalsalzmedium. Der negative Effekt der Sauerstoffbegasung auf die Ausbeute bestätigte sich ebenfalls in M4. Die Untersuchung der Prozessbedingungen zeigt einen deutlichen Einfluss des Mediums auf die Expressionsrate und somit auf die Gesamtausbeute von rmHD5. Die Ausbeute in Basalsalzmedium ist im Vergleich zum Komplexmedium signifikant höher. Für die Prozessierung des rmHD5 scheint weder die Wahl des Mediums noch der Gelöstsauerstoffgehalt im Fermenter eine Rolle zu spielen.

Ergebnisse

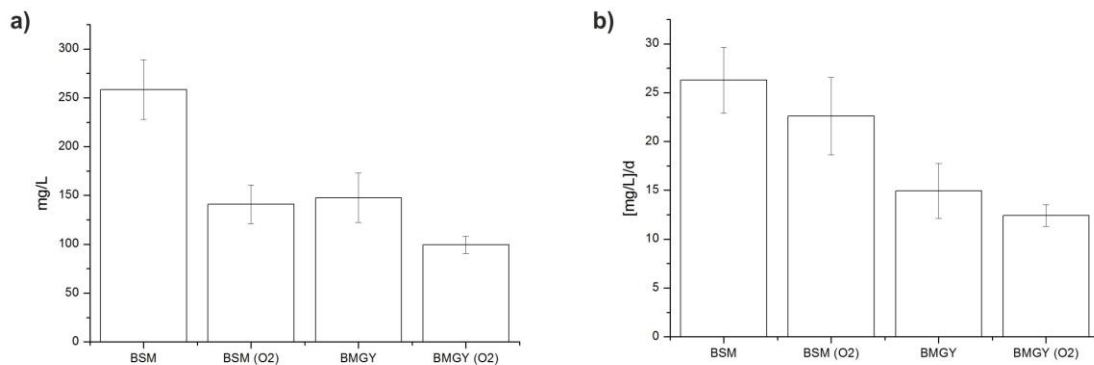


Abbildung 3.45

Gesamtprozessausbeuten an rmHD5_{crude} im Konzentrat der Überstände aus Fermentationsprozessen zur Untersuchung des Einflusses von Medium und Sauerstoffbegasung auf die Produktverteilung.

- Darstellung der Gesamtausbeuten an rmHD5_{crude} über den ganzen Prozess. Die Berechnung der Peptidmenge erfolgte anhand Vermessung der Konzentrate nach Tangentialflussfiltration über RP-HPLC. Es erfolgte die Konzentrierung der Überstände aller Teilernten zusammen mit der der Ernte. Die Berechnung mg/L bezieht sich dabei auf die jeweiligen Volumina der Gesamtüberstände, die im Zuge der Fermentationen erhalten und aufgearbeitet wurden.
- Darstellung der täglichen Gesamtausbeuten an rmHD5_{crude} der jeweiligen Prozesse. Anhand der Gegenüberstellung wird der Einfluss des Mediums auf die Ausbeute gezeigt.

3.2.3.2 Untersuchung des Einflusses des nativen Prosegments

Für die korrekte Faltung des humanen Defensins spielt das native Prepro-Peptid eine wichtige Rolle. Das humane α -Defensin 5 wird als eine unprozessierte, inaktive Pro-Form in den epithelialen Paneth-Zellen des Dünndarms gebildet und in den Granulen gespeichert.^[42] Durch die enzymatische Spaltung mit Hilfe des co-lokalisierten Trypsins wird die aktive antimikrobielle Form (mHD5) freigesetzt und in das Lumen sekretiert.^[36] Daher wurde über eine weitere Fermentation des mHD5, als Prepro-HD5, untersucht, ob das native Prosegment am N-Terminus des mHD5 einen entscheidenden Einfluss auf die Prozessierung haben könnte. Durch den anschließenden Einsatz von Trypsin soll die enzymatische Spaltung zur aktiven Form mHD5 *in vitro* erfolgen und auf ihre Sequenz hin überprüft werden.

Der bereits aus eigenen Vorarbeiten vorhandene transformierte Stamm, der das Plasmid pPICZ α A_HD5 trägt wurde vor der Durchführung der Fermentation auf dessen Gen-Insertion hin überprüft (2.2.1.10, 2.2.1.5.2). Die Durchführung des Fermentationsprozesses erfolgte analog zu vorherigen Fermentationen im 4 L Maßstab bei 22°C (2.2.3.9.1). Die Prozesszeit betrug insgesamt 288 h. Die Analyse der Fermentation erfolgte entsprechend über Tris-Tricin-Gele, Western Blot und RP-HPLC. Keine der angewandten Methoden zeigte den Nachweis einer erfolgreichen Expression des rekombinanten Prepro-HD5. Der Fermentationsüberstand zeigte im Vergleich zu anderen Prozessen eine klare bräunliche Farbe und war nicht grün. Trotz erfolgloser Nachweise wurde die Aufreinigung des proteolysierten Prepro-HD5 versucht. Dazu wurde zunächst für eine Reinigungscharge 50 mL Konzentrat (10 mg/mL Gesamtprotein) der Ernte in einem Dialyseschlauch (Spectra/Por 1, MWCO = 1 kDa, Spectrum Angeles, USA) gegen das 200-fache Volumen an Dialysepuffer (20 mM NH₄OAc, pH 8,0) über 10 h im Kühlraum umgepuffert um den enzymatischen Verdau mit Trypsin am pH-Optimum zu gewährleisten. Nach Erreichen des pH-Wertes wurde die Probe mit 4 mL Trypsin (0,1 mg/mL) versetzt und über Nacht bei RT *in vitro* bei pH 8,0 verdaut. Die Produktbildung des prozessierten rmHD5 wurde über Tricin-SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

Ergebnisse

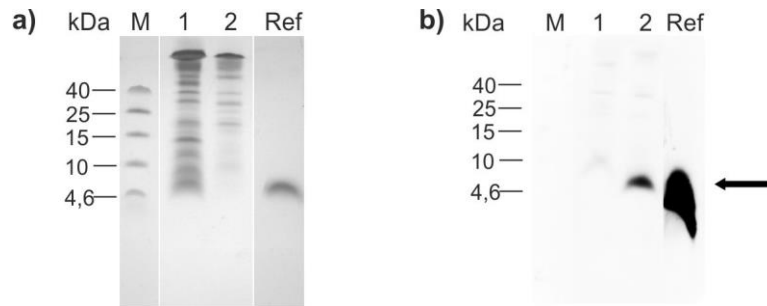


Abbildung 3.46 Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) (a) und Western Blot (b) des proteolytischen Verdaus von Prepro-HD5 mit Trypsin.
M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, Ref: synth. HD5, 1: Retentat, 2: Retentat mit Trypsin verdaut.

Abbildung 3.46 zeigt den *in vitro* Verdau des Prepro-HD5 mit der Protease Trypsin. Über Gelelektrophorese kann weder das Vorhandensein des Prepro-HD5 vor Proteolyse (a, Spur 1) noch rmHD5 nach Verdau mit Trypsin (a, Spur 2) erkannt werden. Lediglich über Western Blot-Analyse konnte unter Verwendung des spezifischen Anti-HD5-Antikörpers prozessiertes rmHD5 als Produkt identifiziert werden. Die Detektion des Prepro-HD5 kann dennoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Eine leichte Detektion einer Proteinbande bei ca. 15 kDa und das folglich vorhandene Produkt gibt den Hinweis auf die erfolgreiche Expression des Prepro-HD5, wenn auch in geringer Ausbeute. Zur Reinigung und Untersuchung des prozessierten rmHD5 erfolgte die Aufreinigung über Kationenaustauscher (2.2.3.12). Dazu wurde der pH-Wert für die Chromatographie über die Dialyse gegen das 200-fache Volumen an Äquilibrationpuffer eingestellt. Die Fraktionen wurden anhand des UV-Signals bei 220 nm gesammelt und weiter über analytische Messmethoden auf die Prozessierung hin untersucht. Abbildung 3.47 zeigt die Reinigung des rmHD5. Die Analyse des Retentats vor und nach *in vitro* Proteolyse zeigt bei dieser erneuten Western Blot-Analyse im Gegensatz zur Abbildung 3.46 keine Detektion auf Höhe des synthetischen HD5 mit spezifischen Antikörper (b, Spur 2) sondern eine schwache Detektion einer Proteinbande auf Höhe von ca. 10 kDa, die zu unverdaulichem Prepro-HD5 passen würde.

Ergebnisse

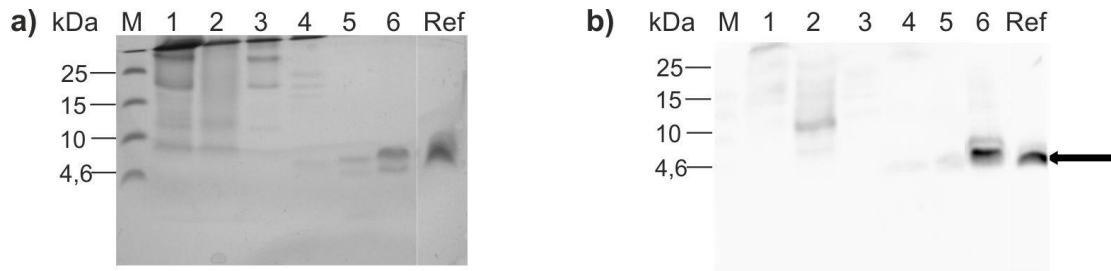


Abbildung 3.47

Coomassie gefärbtes Tris-Tricin Gel (16,5%) (a) und Western Blot (b) der Aufreinigung des proteolytisch *in vitro* verdauten Prepro-HD5 mit Trypsin. Die Aufreinigung erfolgte mit 20 mM NH₄OAc, pH 4,2 über Toyopearl SP-650M (CV=111 mL) mit einem Stufengradient 25/40/100. Die Fraktionen wurden ca. 20-fach aufkonzentriert. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, Ref: synth. HD5, 1: Retentat Pro-HD5, 2: Retentat Prepro-HD5 verdaut, 3: Durchlauf, 4: Fraktion 1 (25%), 5: Fraktion 2 (40%), 6: Fraktion 3 (100%).

In der Eluat-Fraktion der Kationenaustauschchromatographie (Spur 6) kann über das Tris-Tricin-Gel eine Proteinbande auf der Höhe der Referenz detektiert werden, die durch Western Blot als mHD5 verifiziert werden kann. Die Doppelbande deutet bereits erneut auf das Vorhandensein einer Fehlprozessierung hin, die schließlich über MALDI-TOF bestätigt wurde. Eine Fehlprozessierung durch die Expression als Prepro-HD5 konnte über diese Strategie ebenfalls nicht unterbunden werden. Da die Expression des Prepro-HD5 eine, kaum nachweisbare Ausbeute erzielte, erwies sich der Einfluss des Prosegments in diesem als Fall gering.

3.2.3.3 Versuche zur chromatographischen Trennung fehlprozessierter rmHD5-Peptide

Da die Versuche zur Vermeidung von Nebenprodukten durch Optimierung von Fermentationsprozessparametern keine Erfolge zeigten, wurde für die Gewinnung des reinen rmHD5 das aufgereinigte Produkt weiter verarbeitet. Die verlängerte Aminosäuresequenz am N-Terminus weist auf eine unvollständige Proteolyse im Zuge der Sekretion von *P. pastoris* in das Medium hin. Daher wurde zunächst die *in vitro* Proteolyse mit der kommerziellen Kex2-Protease (PreproTech) zur Abspaltung der N-terminalen Überhänge versucht. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Diese Strategie erwies sich ebenfalls als erfolglos (Daten nicht gezeigt).

Die Nebenprodukte und das Zielpeptid rmHD5 unterscheiden sich durch die unterschiedliche Anzahl zusätzlicher Aminosäuren am N-Terminus des Peptids sowohl in ihrem Molekulargewicht als auch in ihrer Hydrophobizität und ihrem isoelektrischen Punkt (Tabelle 3.8). Diese Eigenschaften können dazu genutzt werden um die Produkte im Zuge des Reinigungsverfahrens voneinander zu trennen.

Tabelle 3.8 Aminosäuresequenzen, Molekulargewichte und isoelektrische Punkte der fehlprozessierten rmHD5-Peptide.

Die Berechnung der isoelektrischen Punkte erfolgte anhand der Aminosäuresequenz über ExPASy PeptideMass Rechner (SIB Bioinformatics Resource Portal). ΔMW stellt die Massendifferenz zum Zielpeptid rmHD5 dar. Ziel- und Hauptnebenprodukt sind hervorgehoben dargestellt.

Produkt	MW (kDa)	ΔMW	<i>pI (theo.)</i>
SAIAKEEGVSLEKR-rmHD5	5,078	1,498	8,91
AKEEGVSLEKR-rmHD5	4,807	1,227	8,92
EEGVSLEKR-rmHD5	4,608	1,028	8,68
GVSLEKR-rmHD5	4,350	0,770	9,18
SLEKR-rmHD5	4,193	0,613	9,18
LEKR-rmHD5	4,106	0,526	9,18
EKR-rmHD5	3,993	0,413	9,18
KR-rmHD5	3,864	0,284	9,43
R-rmHD5	3,736	0,156	9,21
rmHD5	3,580		8,96

Ergebnisse

Anhand dieser Unterschiede ergeben sich folgende einsetzbare Chromatographien: Ionenaustauschchromatographie, Hydrophobe Interaktionschromatographie bzw. Reversed Phase Chromatographie und Größenausschlusschromatographie (SEC). Da über den bereits eingesetzten Kationenaustauscher durch einen linearen Gradienten keine sichtbar weitere Auftrennung des Peaks möglich war (Daten nicht gezeigt), wurde der Einsatz hochauflösender Chromatographiemedien untersucht (TSKGel SP-NPR, 2,5 μm , 4,6x35 mm; TSKGel SP-5PW, 10 μm , 7,5 mm x 7,5 cm; TSKGel SP-NPR, 2,5 μm , 4,6x35 mm). Keines dieser Medien mit den Porengrößen 3,0 μm und 10 μm bewirkte unter Einsatz der Puffer im pH-Bereich von 4,2 bis 7,2 eine sichtbare chromatographische Trennung (Daten nicht gezeigt). Ebenso war der Versuch einer Optimierung des Gradienten mittels analytischer RP-HPLC (3 μm) erfolglos. Weder der Einsatz hochauflösender Kationenaustauscher noch RP-HPLC führte zu einer Trennung der unterschiedlichen Nebenprodukte.

Aufgrund der sehr ähnlichen Molekulargewichte und dadurch resultierenden maximalen Massendifferenz (Δ 1,498 kDa) zeigt sich die Trennung über Größenausschlusschromatographie schwierig. Trotz der Problematik wurde die Trennung der Nebenprodukte über eine präparative Gelfiltration unter Einsatz von Sephacryl S-200 (XK 16/100; CV=197 mL) untersucht. Dazu wurde das aufgereinigte lyophilisierte rmHD5 in ddH₂O aufgenommen (14 mg/mL). Die Verwendung eines „grünlichen“ Lyophilisats sollte darüber hinaus Aufschluss über eine mögliche Abtrennung der grünen Farbpigmente über Gelfiltration geben. Nach Abtrennung des unlöslichen Anteils des eingesetzten Lyophilisats wurde der Überstand weiter verwendet. Nach Äquilibrierung der Säule mit 100 mM NH₄OAc (pH 4,2) wurde 1 mL der Peptidlösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min auf die Säule aufgetragen. Die Fraktionierung der Peaks erfolgte anhand der UV-Absorption bei 280 nm. Anhand des Chromatogramms kann im höheren Molekulargewichtsbereich das Vorhandensein von Aggregaten gezeigt werden, die den Hauptbestandteil des Produkts ausmachen. Der grüne Farbpigmentanteil konnte durch die grünliche Farbe in der Aggregat-Fraktion (74-82 mL) beobachtet werden (Abbildung 3.48). Durch die Verwendung von 100 mM NH₄OAc-Puffer konnte die ionische Interaktion der Peptide mit dem Säulenmaterial soweit minimiert werden um diese von der Säule zu „eluiieren“. Die Interaktion zwischen rmHD5 und dessen Nebenprodukte mit dem Säulenmaterial resultierte in einem verzögerten Elutionsprofil, das außerhalb des Kalibrierbereichs der Gelfiltrationssäule lag. Dies wird durch den Vergleich des UV-Signals

Ergebnisse

mit der Leitfähigkeit deutlich. Daher kann trotz Kalibrierung anhand der SEC nicht auf die Molekulargewichte der Peptide geschlossen werden.

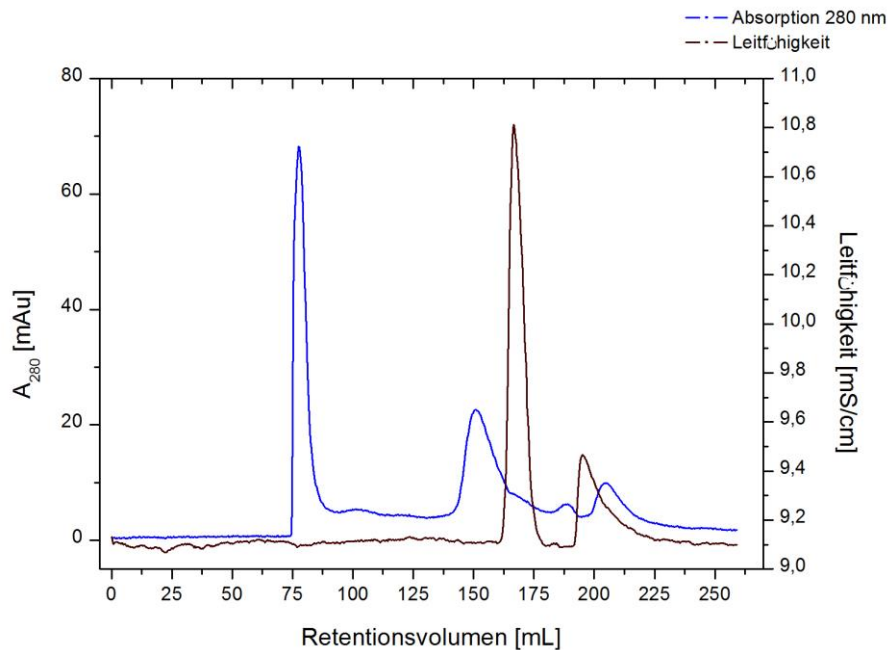


Abbildung 3.48

Trennung fehlprozessierter rmHD5-Peptide über die präparative SEC.

Aufgereinigtes und lyophilisiertes (grünlich) rmHD5 wurde in ddH₂O gelöst (14 mg/mL). Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation entfernt. Der leicht grünliche Überstand wurde zur Auftrennung über SEC auf eine Sephacryl S-200 (XK 16/100, SV=197 mL) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min mit 100 mM NH₄OAc (pH 4,2) aufgetragen.

Folgende Fraktionierung erfolgte anhand der Absorption bei 280 nm: Fraktion 1-8 (74-82 mL), Fraktion 70-89 (144-163 mL), Fraktion 90-95 (164-169 mL), Fraktion 110-119 (184-193 mL), Fraktion 126-132 (200-208 mL).

Abbildung 3.49 zeigt das Vorhandensein von rmHD5 in allen Fraktionen, wobei die Proteinbanden der Fraktionen 1-95 des Retentionsvolumens 74-169 mL (Spur 2-4) höher als die Proteinbande der Referenz laufen. Im Gegensatz dazu zeigen die Fraktionen des niedermolekularen Bereichs (Spur 5-6) ein geringeres Molekulargewicht anhand des Vergleichs der Proteinbanden. Dies wird durch die Massenspektrometrie bestätigt (Abbildung 3.50). Während die Fraktionen 110-119 mit einem Retentionsvolumen von 184-193 mL noch einen geringen Anteil des Hauptnebenproduktes zeigen (Spur 5), kann in den Fraktionen 126-132 kleineren Molekularbereichs (200-208 mL) das rmHD5 ohne sichtbare Nebenprodukte erhalten werden (Spur 6).

Ergebnisse

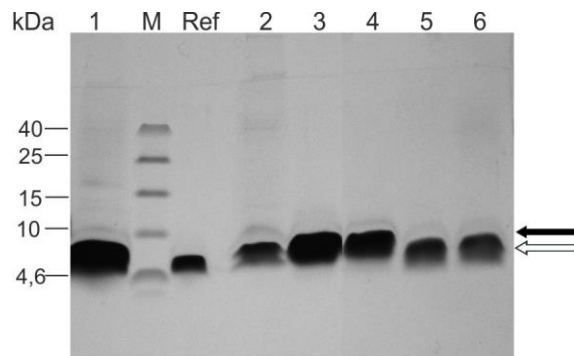


Abbildung 3.49 Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) der Auftrennung des aufgereinigten rmHD5 über Sephacryl S-200.

Proben der Fraktionen wurden 1:30 aufkonzentriert. Ref: synth. HD5, M: Low Range Multicolor Protein Ladder; 1: Überstand Lyophilisat Lösung 2: Fraktion 1-8 (74-82 mL), 3: Fraktion 70-89 (144-163 mL), 4: Fraktion 90-95 (164-169 mL), 5: Fraktion 110-119 (184-193 mL), 6: Fraktion 126-132 (200-208 mL).

Trotz der Schwierigkeit konnte das Hauptnebenprodukt somit zu einem geringen Anteil vollständig von rmHD5 abgetrennt werden. Die Abtrennung der weiteren Nebenprodukte kann anhand MALDI-TOF-Analyse nicht eindeutig gezeigt werden. Da der Hauptanteil des rmHD5 durch Aggregatbildung in den Fraktionen 1-8 (74-86 mL) verloren wird und die Trennung für eine präparative Isolierung der richtig prozessierten Form nicht rentabel ist, wurde eine Quantifizierung nicht durchgeführt. Die Abtrennung der grünen Farbpigmente über Gelfiltration war bedingt durch die Co-Elution der HD5-Aggregate nicht erfolgreich.

Ergebnisse

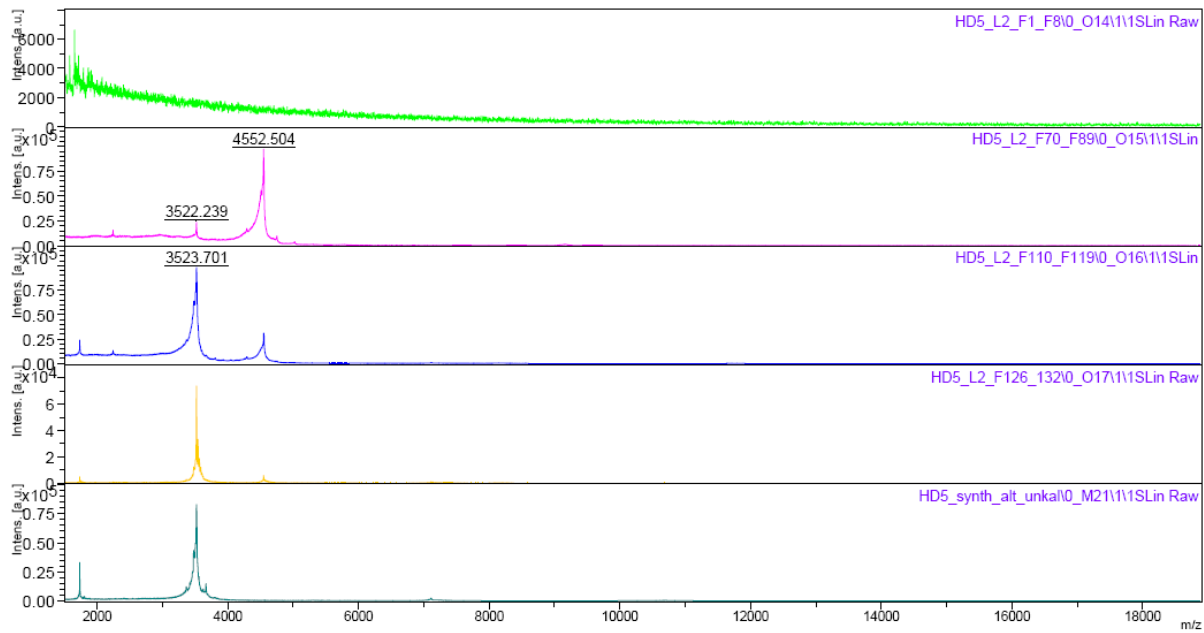


Abbildung 3.50

Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF der Fraktionen der Größenausschlusschromatographie zur Trennung fehlprozessierter rmHD5.

Die Messungen und Darstellung der Abbildung erfolgten durch das Life Science Center, Universität Hohenheim (Stuttgart). Dargestellt sind die Massenspektren der Fraktionen der Trennung fehlprozessierter rmHD5-Peptide durch Gelfiltration und der Referenz synth. HD5 (dunkelgrün). Fraktion 1-8 (74-82 mL) kann im Bereich 2000 bis 18000 Da aufgrund von Aggregaten höheren Molekulargewichts nicht nachgewiesen werden (grün). Fraktion 70-89 (144-169 mL) wurden zur MALDI-TOF-Analyse gemeinsam vermessen (pink). Hauptbestandteil dieser Fraktionen ist das Hauptnebenprodukt mit einer Masse 4552 Da. Die Fraktion 110-119 (184-193 mL) zeigt bereits einen Hauptanteil an rmHD5 mit einem Restanteil an Nebenprodukt (blau). Die Fraktion 126-132 (200-208 mL) stellt das isolierte rmHD5, abgetrennt von Nebenprodukten (gelb), dar.

3.2.4 Antimikrobielle Aktivität des rmHD5

Das humane α -Defensin 5 zeigt sowohl gegen *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* als auch gegen *Candida albicans* ein breites antimikrobielles Spektrum.^[113] Da die untersuchten Fermentationsprozesse unter Variation verschiedener Parameter bzw. die präparative Isolierung der einzelnen fehlprozessierten Produkte zur Gewinnung des reinen rmHD5 erfolglos war, wurde zum Nachweis der Bioaktivität die antimikrobielle Aktivität des vorhandenen Lyophilisats untersucht. Dieses setzt sich sowohl aus rmHD5 als auch aus verschiedenen verlängerten rmHD5-Sequenzen zusammen (Tabelle 3.8).

Zur Analysierung der Bioaktivität des rekombinanten rmHD5 wurden verschiedene Stämme, die zur Verfügung standen, getestet. Als erstes Indiz einer Bioaktivität wurde zunächst eine Übernachtskultur des zu testenden Stammes (*E. coli* K12, *E. coli* DH5 α , *Staphylococcus carnosus* TM300, *Micrococcus luteus*) auf eine OD₆₀₀ ~0,05-0,1 überimpft und mit einer Konzentrationsreihe 0-500 μ g/mL rmHD5 versetzt und bei 37°C mit 500 U/min über Nacht inkubiert. Die Bestimmung der optischen Dichte gab einen ersten Hinweis auf die Bioaktivität. Während die Abnahme der optischen Dichte der Stämme *E. coli* K12, *E. coli* DH5 α auch bei einer Konzentration von 500 μ g/mL kaum bzw. nicht zu belegen war (Daten nicht gezeigt), konnte lediglich in den Stämmen *S. carnosus* TM300 und *M. luteus* eine deutliche Abnahme mit Zunahme der eingesetzten rmHD5-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 3.51 a, Abbildung 3.52 a). Als Positivkontrolle wurde das synthetische HD5 (EMC microcollections, Tübingen) ebenfalls auf seine Aktivität gegenüber *E. coli* K12, *E. coli* DH5 α , *S. carnosus* TM300 und *M. luteus* getestet. Die antimikrobiellen Eigenschaften des rekombinanten mHD5 zeigten sich ähnlich zu den des synthetischen HD5. Das synthetische HD5 wies weder gegenüber *E. coli* K12 noch *E. coli* DH5 α eine sichtbare und messbare Abnahme der optischen Dichte auf (Daten nicht gezeigt), während eine Hemmung des Zellwachstums bei *S. carnosus* TM300 und *M. luteus* gezeigt werden konnte.

Abbildung 3.51 a zeigt die Hemmung des Zellwachstums von *M. luteus* in HNB-Medium bei 37°C über Nacht mittels rekombinanten und synthetischem HD5. Anhand des direkten Vergleichs zeigen beide eingesetzten Peptide ähnliche bioaktive Eigenschaften im entsprechenden Konzentrationsbereich. Bereits unterhalb einer Peptidkonzentration von 15-20 μ g/mL zeigen das rekombinante und synthetische Peptid eine deutliche antimikrobielle Aktivität. Zur Visualisierung der Hemmwirkung des humanen α -Defensins

Ergebnisse

5 ist in Abbildung 3.51 b eine Kultivierung des Stammes mit 20 µg/mL rmHD5 und synthetischem HD5 gegenüber der Negativkontrolle gezeigt. Beide Ansätze mit HD5 (rekombinant und synthetisch) zeigen im Vergleich zur Negativkontrolle keine Trübung und somit eine Wachstumshemmung.

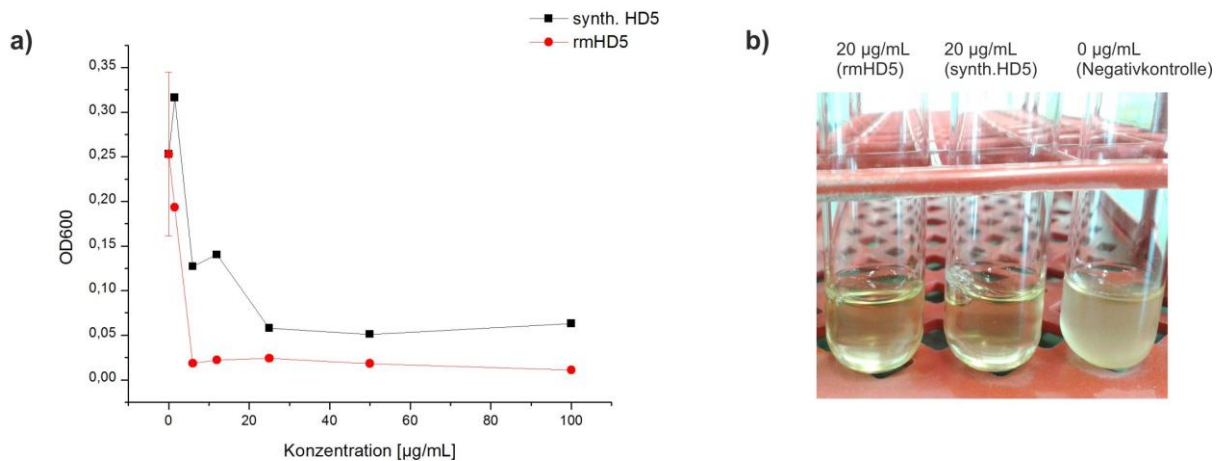


Abbildung 3.51

Antimikrobielle Aktivität des synthetischen und rekombinanten humanen α -Defensins 5 gegen *M. luteus*.

- a)** Messung der optischen Dichte (Trübung) zum Nachweis der Hemmung des Zellwachstums durch das humane α -Defensins 5. Eine Übernachtskultur des Stammes *M. luteus* wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,1 überimpft. In einer Mikrotiterplatte erfolgte die Verdünnung mit einer 10x Stocklösung (1 mg/mL) an Peptid. Durch eine 1:1 Verdünnung erfolgte durch vorgelegte Kultur eine Verdünnungsreihe an rmHD5 und synth. HD5 in *M. luteus*. Die Mikrotiterplatten wurden mit einem sterilen Deckel geschlossen und bei 37°C mit 500 U/min über Nacht inkubiert. Die Messung wurde als Duplikat durchgeführt, die Messpunkte stellen teilweise jedoch aufgrund teilweiser nicht auswertbarer Werte Einfachbestimmungen dar.
- b)** Visualisierung der antimikrobiellen Aktivität bei 20 µg/mL Defensinkonzentration (rmHD5 und synth. HD5) gegenüber *M. luteus*. Eine Übernachtskultur mit 2 mL HNB-Medium wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,1 überimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde die Kultur ohne Zugabe von antimikrobiellem Peptid inkubiert.

Abbildung 3.52 zeigt die antimikrobielle Aktivität des rekombinanten und synthetischen HD5 gegenüber dem Stamm *S. carnosus*. Mit zunehmender Peptidkonzentration weist sowohl das rekombinante als auch das synthetische HD5 eine Hemmung des Zellwachstums von *S. carnosus* auf. Dabei ist die Bioaktivität der Positivkontrolle und der rekombinanten Probe vergleichbar. Eine deutliche Abnahme des Zellwachstums durch die Abnahme der

Ergebnisse

optischen Dichte ist in beiden Fällen innerhalb der Konzentration von 0 $\mu\text{g/mL}$ bis 20 $\mu\text{g/mL}$ deutlich zu beobachten.

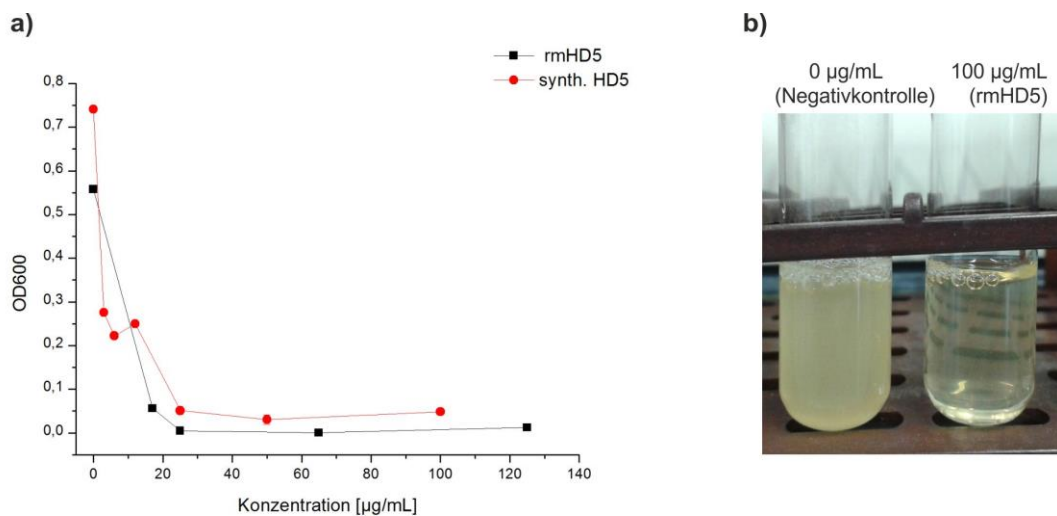


Abbildung 3.52

Antimikrobielle Aktivität des synthetischen und rekombinanten humanen α -Defensins 5 gegen *S. carnosus* TM300.

- Messung der optischen Dichte (Trübung) zum Nachweis der Hemmung des Zellwachstums von *S. carnosus* durch HD5. Eine Übernachtskultur des Stammes *S. carnosus*, überimpft in MHB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1, wurde in einer Mikrotiterplatte mit verschiedenen Konzentrationsverdünnungen an rmHD5 und synth. HD5 bei 37°C inkubiert. Die Messung wurde als Duplikat durchgeführt, die Messpunkte stellen jedoch Einfachbestimmungen dar.
- Visualisierung der antimikrobiellen Aktivität bei 100 $\mu\text{g/mL}$ Defensinkonzentration. Zum Nachweis der antimikrobiellen Aktivität des rmHD5 gegenüber *S. carnosus* wurde die 2 mL-Kultur in MHB-Medium mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ an HD5 bei 37°C über Nacht inkubiert. Als Negativkontrolle wurde die Kultur ohne Zugabe von rmHD5 inkubiert.

Zum weiteren Nachweis und zum Vergleich der antimikrobiellen Eigenschaften des rmHD5 zum synthetischen HD5 gegenüber *S. carnosus* TM300 und *M. luteus* wurde die CFU (*colony forming unit*)-Methode angewandt (2.2.4.5). Da die Trübungsmethode aufgrund der zum Teil hohen Verdunstungsrate der Proben (Inkubation 24 h von 100 μL -Volumina) nur eine Einfachbestimmung auswertbare Messwerte lieferte und zum anderen über die Trübungsmethode Zellbestandteile in Lösung miterfasst werden, wurde über die Bestimmung der Kolonieformenden Einheiten die Aktivität der Peptide weiter untersucht und nachgewiesen. Das Pellet einer Übernachtskultur von *S. carnosus* in MHB-Medium wurde nach Zentrifugation in sterilem 10 mM NaPi pH 7,2 auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,05

Ergebnisse

aufgenommen und resuspendiert. In einer Mikrotiterplatte wurde unter Einsatz einer 10x Stocklösung (6 mg/mL) an rekombinanten rmHD5 eine 1x Suspension in *S. carnosus* (OD₆₀₀: 0,05) hergestellt. Die Stocklösung des eingesetzten synthetischen HD5 betrug 1 mg/mL. Die Mikrotiterplatte wurde mit einem sterilen Deckel geschlossen, die Proben bei 37°C für 1 h bei 500 U/min inkubiert und anschließend ausplattiert. Die Abnahme der Koloniebildende Einheiten pro mL in Abhängigkeit der eingesetzten Peptidkonzentration sind in Abbildung 3.53 dargestellt. Anhand der Abnahme der CFU/mL des synthetischen und rekombinanten mHD5 kann die antimikrobielle Aktivität des humanen α -Defensin 5 gegen *S. carnosus* bestätigt werden.

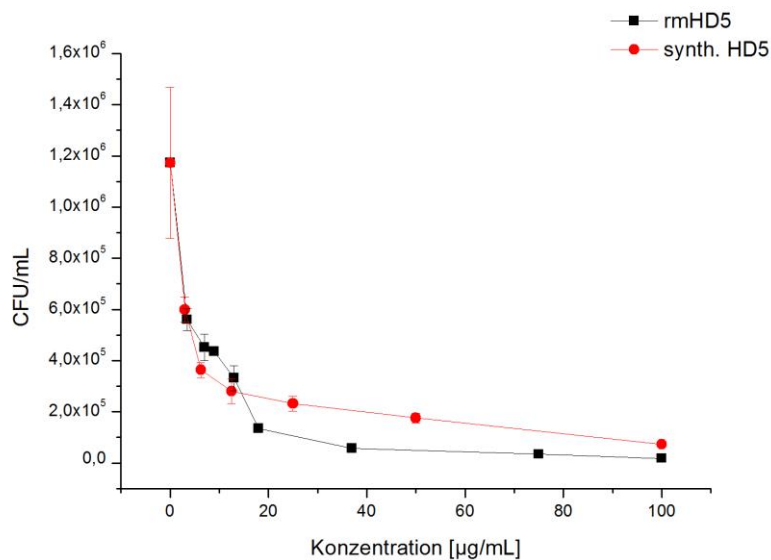


Abbildung 3.53

Antimikrobielle Aktivität des synthetischen und rekombinanten humanen α -Defensins gegen *S. carnosus* TM300.

Die Messung der CFU/mL erfolgte nach Inkubation der *S. carnosus* Zellen (OD₆₀₀ ~0,05) in NaPi (10 mM, pH 7,2) bei 37 °C mit unterschiedlichen Konzentrationen an synthetischen (rot) und rekombinanten HD5 (schwarz). Jeder Konzentrationsmesswert stellt den Mittelwert aus Quadruplikaten dar.

Sowohl das synthetische als auch das rekombinante Defensin zeigen wie in der angewendeten Trübungsmethode ein vergleichbares Aktivitätsspektrum. Während die Bioaktivität des synthetischen mHD5 im Bereich unterhalb von 15 µg/mL noch etwas stärker (CFU/mL: 2,63E+05) als das rekombinante Defensin (CFU/mL: 3,32E+05) ist, zeigt das rekombinante humane α -Defensin 5 mit steigender Konzentration eine Abnahme bis auf 1,81E+04 CFU/mL bei 100 µg/mL (synth. HD5: 1,94E+05). Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der Trübungsmessung. Die Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten wurde

Ergebnisse

ebenfalls für *M. luteus* in HNB-Medium durchgeführt. Eine Abnahme der Koloniebildenden Einheiten mit steigender Peptidkonzentration konnte sowohl für das synthetische als auch für das rekombinante Defensin beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die antimikrobielle Aktivität der Defensine liegt einer ionischen Wechselwirkung zwischen den kationischen Peptiden und der negativ geladenen Membran zugrunde. Durch eine Erhöhung der Ionenstärke bis auf 150 mM NaCl konnte eine Abnahme der antimikrobiellen Aktivität gegenüber *Listeria monocytogenes* und *Salmonella typhimurium* durch Porter *et al.* nachgewiesen werden.^[41] Der Einfluss von Salz auf die Aktivität des rmHD5 wurde im Rahmen dieser Arbeit gegenüber dem Stamm *S. carnosus* getestet. Durch die Inkubation des zu testenden Peptids rmHD5 mit Zusatz von 150 mM NaCl konnte dessen antimikrobielle Aktivität gegenüber *S. carnosus* geschwächt werden.

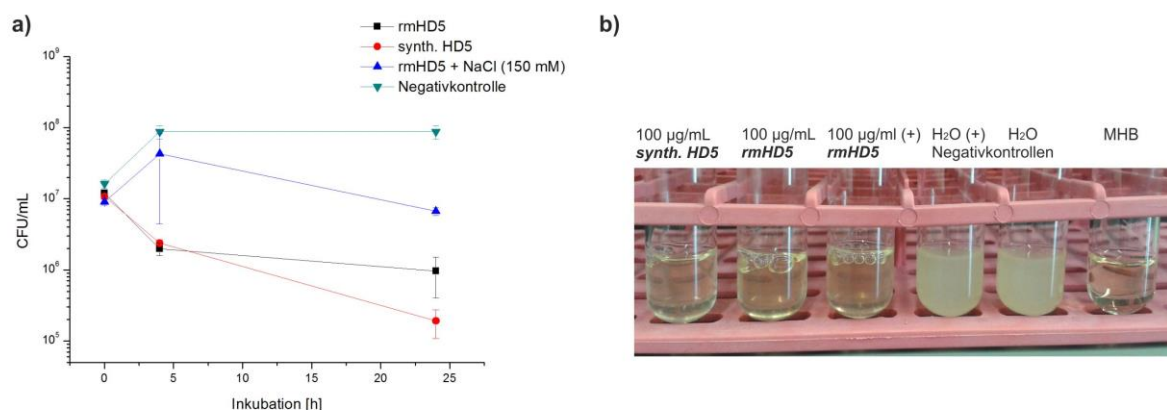


Abbildung 3.54

Antimikrobielle Aktivität des synthetischen und rekombinanten humanen α -Defensins gegen *S. carnosus* TM300 in MHB-Medium über 24 h in An- und Abwesenheit von Salz.

- a) Messung der CFU/mL von *S. carnosus* nach Inkubation mit rmHD5 und synth. mHD5 über 24 h. Die Messung der CFU/mL erfolgte nach Inkubation der *S. carnosus* Zellen ($OD_{600} \sim 0,1$) in 2 mL-MHB-Medium bei 37 °C mit 100 µg/mL synth. HD5 (rot), 100 µg/mL rmHD5 (schwarz) und ohne Peptid (grün). Durch den Zusatz von 150 mM NaCl zu 100 µg/mL rmHD5 (blau) wird der Einfluss der Ionenstärke auf die antimikrobielle Aktivität gezeigt. Die Durchführung der CFU/mL-Bestimmung erfolgte als Duplikat.
- b) Ansätze zur Messung der CFU/mL nach 24 h. Die dargestellten Ansätze zeigen die Kulturen vor Bestimmung der CFU/mL. Anhand der nicht vorhandenen Trübung in den Ansätzen mit HD5 ist die antimikrobielle Aktivität erkennbar, ebenso nach Zusatz von NaCl. Das Symbol (+) weist auf die Zugabe von NaCl mit einer Endkonzentration von 150 mM hin.

Ergebnisse

Abbildung 3.54 a zeigt die CFU/mL nach 0 h, 4 h, und 24 h Inkubation von *S. carnosus* in MHB-Medium mit 100 µg/mL synthetischem HD5 (rot), 100 µg/mL rekombinantes HD5 (schwarz), 100 µg/mL rekombinantes HD5 unter Zusatz von 150 mM NaCl (blau) und der Negativkontrolle. Abbildung 3.54 a und b zeigen die antimikrobielle Aktivität des rmHD5 unter An- und Abwesenheit von 150 mM NaCl. Durch die Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten kann gezeigt werden, dass die Ionenstärke die antimikrobielle Aktivität des rmHD5 herabsetzt aber nicht inhibiert. Im Gegensatz zur CFU/mL Bestimmung in NaPi, in der das Wachstum durch die Entnahme von Nährmedium bereits stagniert und lediglich die Zellen „überleben“ oder durch HD5 angegriffen werden, wurde diese Messung in Nährmedium durchgeführt. Die Bestimmung der CFU/mL erfolgte bei 0 h, 4 h und 24 h Inkubation. Innerhalb der ersten 4 h zeigt das rekombinante mHD5 ein ähnliches Aktivitätsspektrum wie die untersuchte Positivkontrolle. Nach insgesamt 24 h Inkubation kann mittels synthetischen HD5 eine stärkere Hemmung des Zellwachstums beobachtet werden.

3.2.4.1 Circular dichroism Spektroskopie des rmHD5

Das rekombinante und aufgereinigte rmHD5, exprimiert in *P. pastoris*, wurde weiter einer CD-Spektroskopie unterzogen, um dessen vorliegende Struktur und Einfluss von SDS auf dessen Sekundärstruktur zu überprüfen (2.2.4.6). Das CD-Spektrum des rmHD5_{ox}, gelöst in ddH₂O zeigt eine negative Bande bei 198 nm und eine positive Bande bei ca. 230 nm (Abbildung 3.55). Das Peptid liegt in wässriger Lösung als Random-Coil-Struktur vor. Durch die Zugabe von SDS (1%), das die Bakterienmembran nachahmen soll, kann eine leichte Verschiebung der negativen Bande zu 202 nm beobachtet werden. Weiterhin kann eine Verschiebung der Elliptizität (mDeg) beobachtet werden. Diese Änderungen deuten auf eine Zunahme der Sekundärstruktur, der β -Faltblattstruktur, in Anwesenheit des negativ geladenen SDS hin.

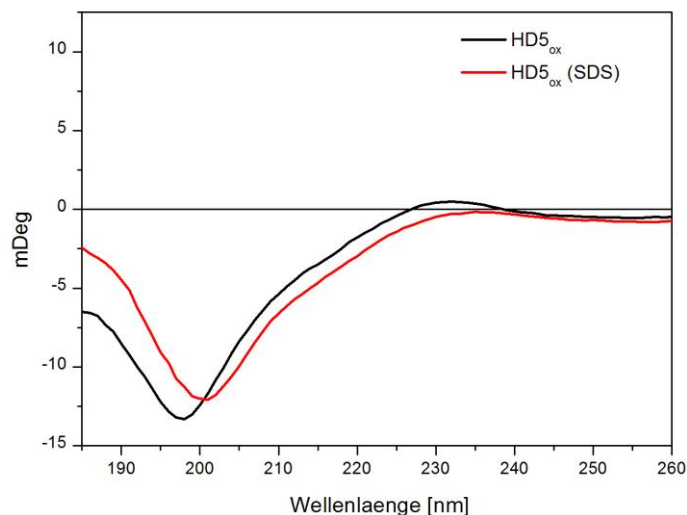


Abbildung 3.55

CD-Spektrum des rekombinanten humanen α -Defensins in Ab- und Anwesenheit von SDS (1%).

Die Durchführung der Aufnahme des Spektrums erfolgte am Institut für Mikrobiologie (Universität Hohenheim, Stuttgart) mit der Unterstützung von Herrn Dr. S. Leptihn.

3.2.5 Fed-Batch-Fermentation von mHD6 in *P. pastoris*

Trotz der Herausforderungen in der Herstellung des humanen α -Defensins 6 in *E. coli* ist *bis dato* dessen Produktion ausschließlich in diesem Expressionswirt beschrieben. Bisher ist die Expression von mHD6 in *P. pastoris* in der Literatur nicht dokumentiert. In eigenen Vorarbeiten konnte eine erfolgreiche Expression des mHD6 in *P. pastoris* lediglich über Western Blot-Analyse nachgewiesen werden.^[99] Die Untersuchung und Etablierung eines Fermentationsprozesses und Reinigungsverfahrens für mHD6 soll im Rahmen dieser Arbeit erfolgen. Dafür wurden entsprechend den Fermentationsbedingungen von mHD5 die Prozessparameter für die Expression von mHD6 übernommen.

3.2.5.1 Integration des mHD6-Gens in die genomische DNA

Für die Fermentationen des humanen α -Defensins 6 in *P. pastoris* wurde ein frisch transformierter *P. pastoris* Stamm eingesetzt. Dazu wurde das Plasmid pPICZ α A_mHD6^[99] in frische kompetente *P. pastoris*-Zellen transformiert. Zur Integration des mHD6-Gens in die genomische DNA der Hefe erfolgte, nach Anreicherung und Isolierung der DNA über Mini-Präparation (2.2.1.1) und Restriktionsverdau mit *Pme*I (2.2.1.2), die Transformation in *P. pastoris* X-33 (2.2.1.9). Die Transformanten wurden über YPDS_{Zeo}-Platten selektiert und die erfolgreiche Integration, nach Isolierung der genomischen DNA (2.2.1.10), über Kolonie-PCR nachgewiesen (2.2.1.5.2). Unter Verwendung der sequenzspezifischen Primer mHD6_*Xho*I_f und mHD6_*Xba*I_r konnte die Insertion des mHD6-Gens mit einer Größe von ca. 122 bp in allen untersuchten Klonen erfolgreich nachgewiesen werden (Abbildung 3.56). Der Klon 1, der das mHD6-Gen integriert hat, wurde in 10 mL YPP_{Zeo}-Medium überimpft und für die Fermentation eingesetzt.

Ergebnisse

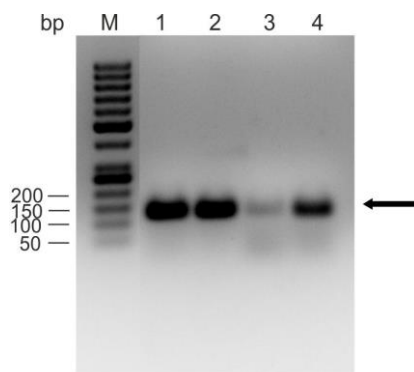


Abbildung 3.56 Agarosegel der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Insertion des *mHD6*-Gens in die genomische DNA von *P. pastoris*.

Dargestellt ist die Überprüfung der Gen-Insertion des *mHD6*-Gens mit einer Größe von ca. 122 bp in *P. pastoris* X-33. Die Kolonie-PCR erfolgte unter Verwendung der Primer *mHD6_XhoI_f* und *mHD6_XbaI_r* und der *Taq*-Polymerase. Als Template wurde die isolierte genomische DNA der *mHD6*-rekombinanten *P. pastoris* Klone eingesetzt. M: GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 1-4: Klone 1-4.

3.2.5.2 Etablierung des Fermentationsprozesses

Zur Etablierung der Prozessbedingungen wurde die Fermentation im 4 L-Maßstab in einem 7,5 L-Bioreaktor (Infors, Bottmingen, Schweiz) durchgeführt. Eine 5 mL Vorkultur einer frisch transformierten Einzelkolonie von *P. pastoris*, die das Konstrukt *pPICZ α A_mHD6* enthielt, diente zum Animpfen von 200 mL *YPP_{zeo}*-Medium der Vorkultur II. Im Bioreaktor wurden 4 L Basalsalzmedium mit 5% (w/v) Glycerin als Kohlenstoffquelle bei pH 5,0 und 30°C mit der Vorkultur II auf die Start OD_{600} von 0,4 inokuliert. Über die kontinuierliche Abnahme des pO_2 -Werts (DO-Wert) konnte der Verbrauch der Kohlenstoffquelle Glycerin beobachtet werden (Abbildung 3.57). Da nach 23 h der DO-Wert unter 5 % lag, wurde die Prozesstemperatur auf 22°C gesenkt um einen bessere Sauerstofflöslichkeit zu erzielen. Anhand des pO_2 -Verlaufs kann nach weiteren 2 h der vollständige Verbrauch des Glycerins durch den starken Anstieg des DO-Wertes beobachtet werden. Daraufhin wurde der Prozess auf eine Fed-Batch-Fermentation mit MeOH als Kohlenstoffquelle und Induktor umgestellt. Die Induktion erfolgte mit 16 g MeOH (6 ml/L PTM1-Lösung). Der Fütterungsimpuls wurde so gewählt, dass den Zellen 0,5% (v/v) MeOH zugeführt wurde, sobald ein signifikanter Anstieg des DO-Wertes auf ca. 30% zu verzeichnen war. Der pH-Wert wurde über die Zugabe von NH_4OH (25%) und H_3PO_4 (10%) konstant gehalten. Mit einer Rührerdrehzahl von 800 U/min und einer Belüftungsrate von 8 L/min konnte der Prozess über 215 h

aufrechterhalten werden. Der Fermentationsprozess wurde für die Herstellung von mHD6 als Duplikat durchgeführt. Beide Fermentationsprozesse waren miteinander vergleichbar.

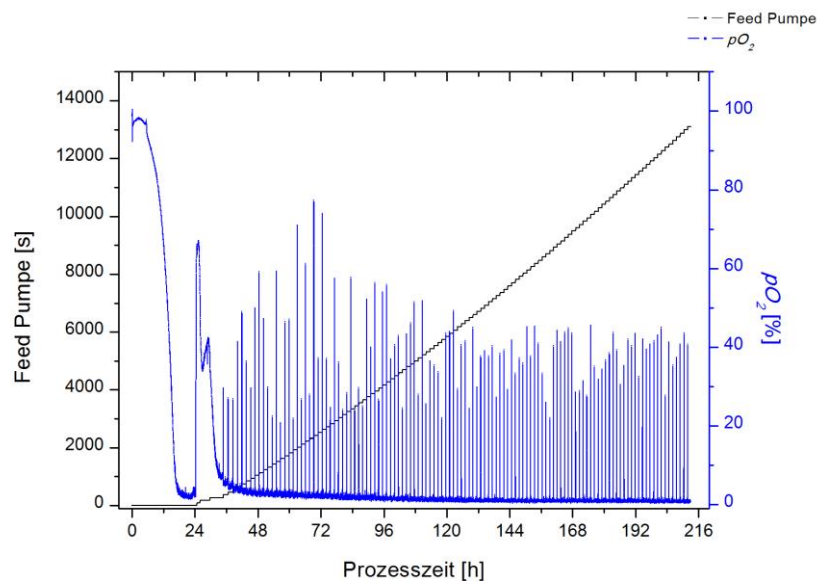


Abbildung 3.57

Fermentation von mHD6 in *P. pastoris* X-33 im 4 L-Maßstab.

Nach Verbrauch der Kohlenstoffquelle Glycerin in der Batch-Phase erfolgt die Umstellung mit pO_2 -gesteuerter Methanol-Zufuhr in einen Fed-Batch-Prozess. Der Sauerstoffpartialdruck pO_2 wurde in Echtzeit gemessen (blau). Über die Regelung durch die IRIS Software erfolgte die automatische Zugabe von Methanol über die Feed Pumpe (schwarz) bei einem pO_2 -Wert von 30% (DO-spikes).

Im Zuge des Fermentationsprozesses erfolgte sowohl die Messung der optischen Dichte als auch die Bestimmung der Biofeucht- und Biotrockenmasse. Abbildung 3.58 zeigt die korrelierende Zunahme der optischen Dichte und BFM in Abhängigkeit der Prozesszeit. Die Überprüfung der Expression erfolgte sowohl über Tris-Tricin-Gele und Western Blot-Analyse als auch über RP-HPLC. Anhand der Auftrennung des Fermentationsüberstandes über die analytische RP-HPLC konnte die erfolgreiche Expression des rekombinanten mHD6 durch die Übereinstimmung der Retentionszeiten des rekombinanten mHD6 und des synthetischen HD6 nachgewiesen werden (Abbildung 3.59 a). Durch entsprechende Integration der Peakfläche kann die Konzentrationszunahme in Abhängigkeit der Prozesszeit gezeigt werden (Abbildung 3.59 b).

Ergebnisse

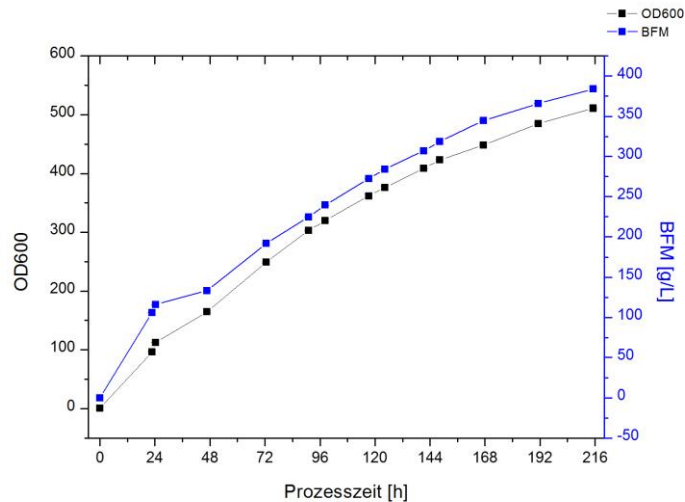


Abbildung 3.58

Wachstumsverlauf der Expression von mHD6 in *P. pastoris*.

Anhand des Wachstumsverlaufs ist die kontinuierliche und korrelierende Zunahme der optischen Dichte und der BFM dargestellt. Die Messpunkte der OD₆₀₀-Werte sind schwarz dargestellt, die der BFM-Bestimmung in blau. Die Messungen erfolgten jeweils im Zuge der gesamten Prozesszeit als Triplikate.

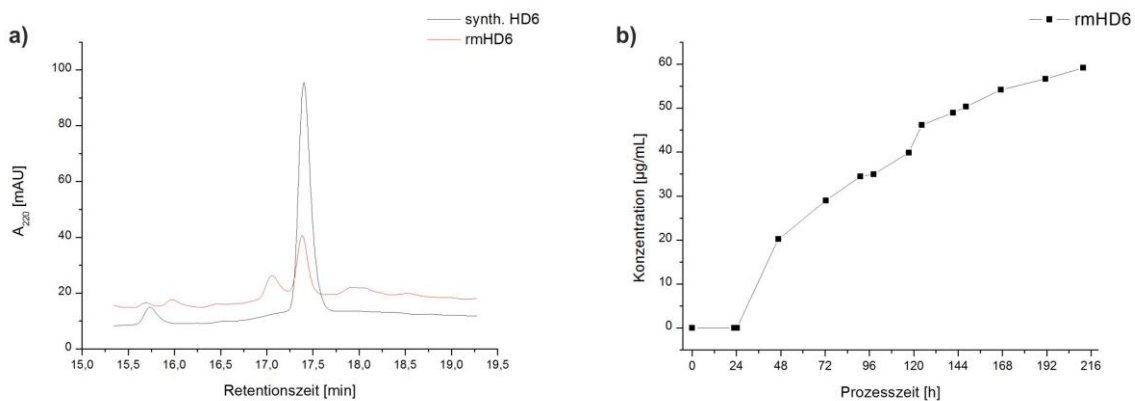


Abbildung 3.59

Nachweis der Expression von mHD6 und Zunahme der mHD6-Konzentration in *P. pastoris* X-33 über RP-HPLC.

- Der Nachweis der mHD6-Expression im Fermentationsüberstand erfolgte über die Auftrennung über RP-HPLC (TSKgel ODS-100V 3 µm, 4,6x150 mm, Tosoh Bioscience, Stuttgart). Die Säule wurde mit Lösungsmittel A (ddH₂O, 0,1% TFA) und B (ACN, 0,1% TFA) im Verhältnis 90:10 äquilibriert und über einen linearen Gradienten (10-60%) des Lösungsmittels B (ACN, 0,1% TFA) über 40 min eluiert. Die Detektion und der Vergleich zur Referenz (synth. HD6) erfolgte bei 220 nm.
- Die Zunahme der rmHD6-Konzentration ist in Abhängigkeit der Prozesszeit dargestellt. Die Messung der Peptidkonzentration im Überstand der Fermentation erfolgte ebenfalls über die Integration der Peakfläche (Kalibriergerade des synth. HD6, R²=0,9992) in der RP-HPLC.

Der Prozess wurde bis zum Erreichen einer Zelldichte von 511 (entsprechend der Biofeuchtmasse von 384 g/L und der Biotrockenmasse von 111 g/L) aufrechterhalten. Nach einer Prozessdauer von insgesamt 215 h wurde der Prozess beendet und der Überstand geerntet. Das Erntevolumen von 4,5 L wurde bei 17500 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Zur effizienteren Entfernung des Grünanteils, gebildet bei der *P. pastoris* Fermentation, wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der grünliche Überstand, der das Zielpeptid enthält, wurde anschließend konzentriert. Insgesamt konnten 60 mg/L mHD6_{crude} erfolgreich angereichert und eine Gesamtausbeute von 185 mg rekombinanten mHD6_{crude} (rmHD6) erzielt werden.

3.2.5.3 Capture zur Isolierung des rmHD6

Da das Zielpeptid rmHD6 in das Medium sekretiert wurde, erfolgte zunächst in einer Tangentialflussfiltration als Capture-Schritt eine Konzentrierung des Überstandes (2.2.3.11). Die Wahl des Einsatzes einer 10 kDa-Membrankassette zur Filtration des Überstandes und anschließender Konzentrierung des Filtrats über ein Hohlfasermodule (Quikstand, 1400 cm², 1 kDa) zeigte sich für die Isolierung des Peptids als nicht geeignet. Trotz des Einsatzes einer Membran mit dreifach größerer Porengröße konnte mHD6, ähnlich wie mHD5, nur zu einem Minimalanteil bzw. kaum detektierbaren Anteil im Filtrat nachgewiesen werden. Analog zur Aufarbeitung des humanen α -Defensins 5 wurde daher für die Aufarbeitung von rmHD6, trotz des geringen Molekulargewichtes von 3,7 kDa, eine 10 kDa-Membran (OMEGA, Millipore) ausgewählt. Nach 10-facher Aufkonzentrierung des Überstandes erfolgte die Diafiltration mit dem 4-fachen Volumen des Konzentrates an 20 mM NH₄OAc, pH 4,2. Nach erneuter Aufkonzentrierung des Konzentrats auf das Totvolumen von 100 mL wurde die Membran viermal mit 50 mL gewaschen. Das Konzentratvolumen von 310 mL wurde anschließend über Tris-Tricin-Gele und RP-HPLC analysiert. Abbildung 3.60 a zeigt die Übereinstimmung der Retentionszeiten des, über RP-HPLC aufgetrennt, synthetischen HD6 (17,33 min) und dem Konzentrat (17,38 min). Ein entsprechendes Tris-Tricin-Gel der Auftrennung des Konzentrats zeigt eine Proteinbande im Molekulargewichtsbereich von ca. 10 kDa an, welches um das 2,7-fache größer ist als das theoretische Molekulargewicht des humanen α -Defensins 6 (3,7 kDa) (Abbildung 3.60 b).

Ergebnisse

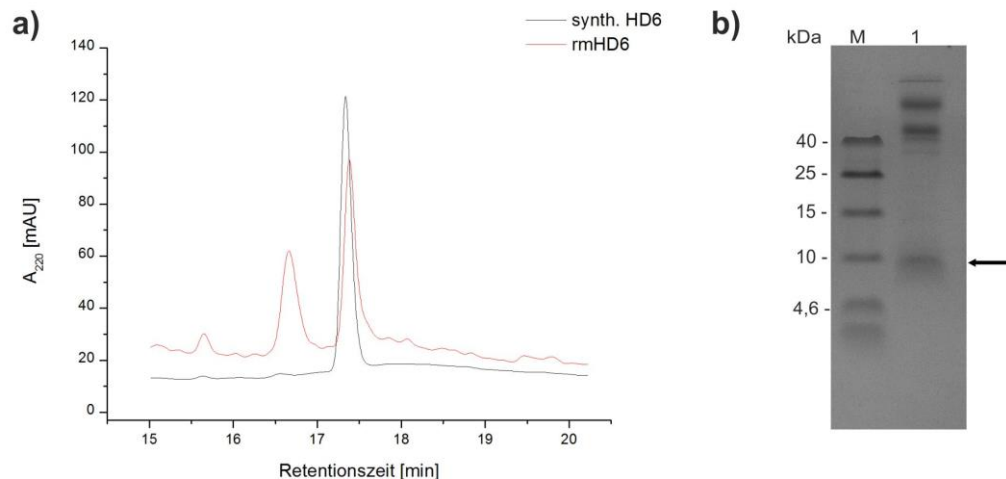


Abbildung 3.60

Nachweis des rmHD6 im Konzentrat des Fermentationsüberstandes.

- a)** Ausschnitt des RP-HPLC Chromatogramms der Fraktionierung von rmHD6 zum massenspektrometrischen Nachweis über MALDI-TOF. Die Auftrennung erfolgte über eine TSKgel ODS-100V-Säule (3 μ m, 4,6x150 mm, Tosoh Bioscience, Stuttgart) über einen linearen Gradienten (10-60%) des Lösungsmittels B (ACN, 0,1% TFA) über 40 min. Der Peak, detektiert bei 220 nm und korrespondierend für rmHD6 (rot), im Bereich 17-18 min wurde fraktioniert, das Lösungsmittel über einen EvaporatorGenevac abgedampft und die Masse über MALDI-TOF (Life Science Center, Universität Hohenheim, Stuttgart) analysiert.
- b)** Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) des mHD6-Konzentrats des Fermentationsüberstandes nach Diafiltration über eine 10 kDa-Membran. M: Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder, 1: mHD6-Konzentrat. Das Zielpeptid ist durch einen schwarzen Pfeil markiert.

Da weder über SDS-PAGE noch über Western Blot das synthetische HD6 detektiert werden konnte und rmHD6 über die Western Blot-Analyse keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, erfolgte der spezifische Nachweis des rekombinanten Defensins über die Massenspektrometrie am Life Science Center (Universität Hohenheim, Stuttgart). Dazu wurde das Konzentrat über RP-HPLC aufgetrennt (2.2.4.4), der Peak im Retentionsbereich von 17 und 18 min fraktioniert und anschließend über MALDI-TOF analysiert (Abbildung 3.61). Das rekombinant hergestellte rmHD6 konnte mit einer Masse von 3706,47 Da erfolgreich nachgewiesen werden (synth. HD6: 3706,57 Da).

Ergebnisse

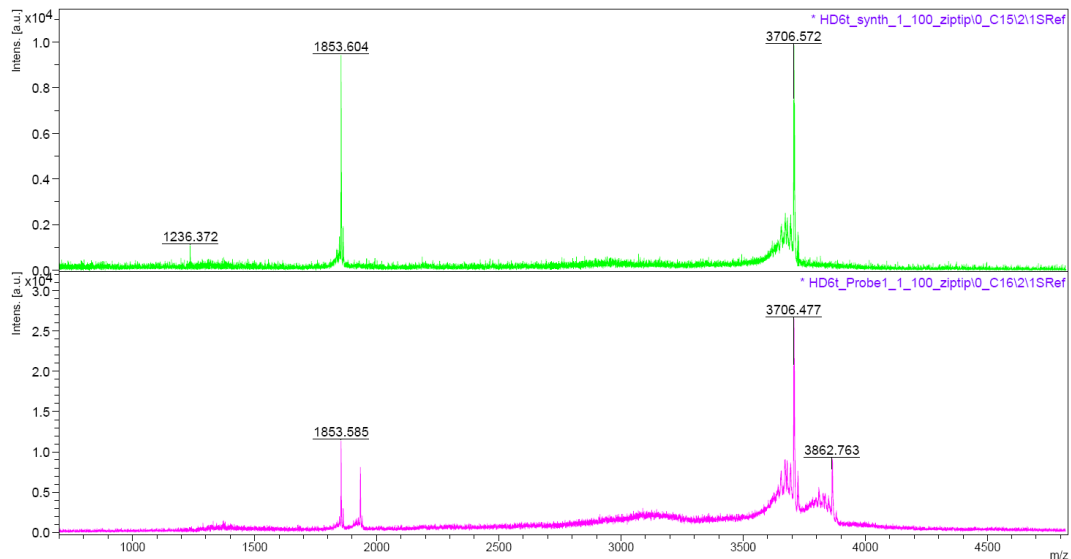


Abbildung 3.61

Nachweis des rmHD6 im Konzentrat des Fermentationsüberstandes über MALDI-TOF.

Die Durchführung der Messungen und die Darstellung der Abbildung erfolgten durch das Life Science Center, Universität Hohenheim. Dargestellt ist das Massenspektrum des synthetischen HD6 (grün) und das des rmHD6 (pink). Die Probe rmHD6 wurde durch Auftrennung des Konzentrats über RP-HPLC und anschließender Peakfraktionierung für den Nachweis über Massenspektrometrie vorbereitet (Abbildung 3.60).

3.2.5.4 Aufreinigung des rmHD6 über Kationenaustauschchromatographie

Analog zur Aufreinigung des humanen α -Defensins 5 wurde für die Aufreinigung des rmHD6, mit einem theoretischen pI von 8,3 der Einsatz eines Kationenaustauschers untersucht. Durch die Diafiltration gegen den Äquilierungspuffer (20 mM NH_4OAc , pH 4,2) wurde die Probe bereits für den Chromatographieschritt vorbereitet (3.2.5.3). Eine Toyopearl SP-650M Säule (CV=5,1 mL; Tosoh Bioscience, Stuttgart) wurde mit 5 CV Bindepuffer (20 mM NH_4OAc , pH 4,2) äquilibriert. Die Aufreinigung des rmHD6 erfolgte chargenweise. Der Probenauftrag von insgesamt 10 mL Konzentrat erfolgte bei einer Flussrate von 5 mL/min. Unspezifisch gebundene *Pichia*-eigene Proteine wurden mit 10 CV Bindepuffer von der Säule gewaschen. Über einen optimierten Stufengradienten wurden anschließend schwach bindende Proteine bei einer NaCl-Konzentration von 150 mM entfernt. Mit dem Elutionspuffer (20 mM NH_4OAc , 1 M NaCl, pH 4,2) wurde das Zielpeptid mit 5 CV von der Säule eluiert. Anhand des detektierten UV-Signals bei 220 nm wurden die Fraktionen vereinigt und anschließend über Tricin-SDS-Gelelektrophorese und RP-HPLC auf die Reinheit und Konzentration analysiert. Abbildung 3.62 zeigt eine Proteinbande bei ca. 8-10 kDa und minimale Verunreinigungen im höheren Molekulargewichtsbereich (Spur 2). Die Analyse des synthetischen HD6 zeigt ebenfalls leichte Verunreinigungen im Molekulargewichtsbereich von 15 kDa und höher (Spur Ref).

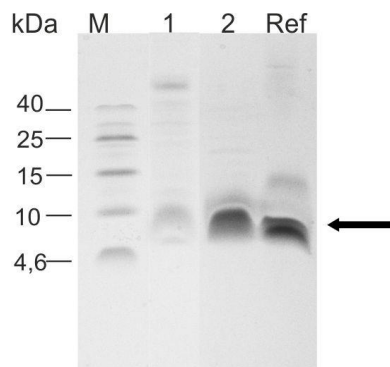


Abbildung 3.62

Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) der Aufreinigung des rmHD6 über Ionenaustauschchromatographie (Toyopearl SP-650M).

Aufgetragen sind neben der Konzentrat-Probe (1) die Eluat-Fraktion der Kationenaustauschchromatographie (2) und als Referenz der synth. HD6 (Ref). Als Proteinstandard wurde der Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder verwendet.

Ergebnisse

Der Vergleich der Proteinbande mit der Referenz zeigt die erfolgreiche Aufreinigung des Peptids rmHD6 bereits durch den Einsatz eines einzigen Reinigungsschritts. Der Nachweis der Retentionszeiten von rmHD6 und dem synthetischen Peptid nach Auftrennung über RP-HPLC war ebenfalls erfolgreich. Die Integration der Peakfläche der Reinigungsstufe der Kationenaustauschchromatographie lieferte eine Ausbeute von 30 mg/L (\pm 2%) aufgereinigtem rmHD6 (Tabelle 3.9). Die Entsalzung des rmHD6 erfolgte analog zu der des rmHD5. Dazu wurde das Eluat über Sephadex G10 (CV=250 mL) analog zur Entsalzung des rmHD5, der volatile Puffer NH_4OAc , pH 4,2 mit einer höheren Molarität (100 mM) eingesetzt, um ionische Interaktionen zwischen Peptid und Säulenmaterial zu minimieren und die Ausbeute zu steigern. Die Fraktionierung erfolgte nach Anstieg des UV-Signals bei 280 nm, die vereinigten Fraktionen wurden mit Flüssigstickstoff schockgefroren und über Gefriertrocknung aufkonzentriert (2.2.3.13). Durch den Einsatz des höher molaren Ammoniumacetat-Puffers konnte rmHD6 nach der Entsalzung mit einer guten Ausbeute und Wiederfindungsrate von 80% gewonnen werden. Durch das entwickelte und eingesetzte Reinigungsverfahren (analog zu rmHD5) konnte das gereinigte und entsalzte rmHD6 erfolgreich mit 27 mg/L Fermentationsüberstand und einer Gesamtausbeute von 45% gewonnen werden. In Tabelle 3.9 sind die Ausbeuten der einzelnen Aufarbeitungsschritte in einer Übersicht dargestellt. Das resultierende weiße Pulver wurde anschließend in ddH₂O, mit einer sehr guten Löslichkeit, aufgenommen und über RP-HPLC und LC-ESI-MS (Life Science Center, Universität Hohenheim, Stuttgart) charakterisiert.

Ergebnisse

Tabelle 3.9 Übersicht der Ausbeute des sekretierten rmHD6 in *P. pastoris*, sowie die Gesamtausbeute nach Konzentration & Diafiltration und Säulenchromatographie. Dargestellt sind die einzelnen Aufarbeitungsschritte: Capture-Schritt, Kationenaustauscher und Entsalzung. Die Wiederfindungsraten und Ausbeuten sind pro Reinigungsschritt dargestellt. Die Gesamtausbeute bezieht sich auf die Ausgangsmenge im Fermentationsüberstand. Die Angabe rmHD6 [mg] beschreibt die Gesamtmenge an Defensin des Fermentationsprozesses, rmHD6 [mg/L] errechnet sich durch die Gesamtmenge pro Liter Fermentationsüberstand.

	Volumen [mL]	rmHD6 [mg]	rmHD6 [mg/L]	Ausbeute [%]	Wiederfindungsrate [%]
Fermentationsvolumen	4000				
Erntevolumen	4500				
Fermentationsüberstand	3100	185 (± 1%)	60 (± 1%)	100	
Konzentrat (10 kDa)	310	158 (± 9%)	51 (± 9%)	85	
Filtrat (10 kDa)	2742	11	3	6	
<i>Konzentrierung & Diafiltration</i>					91

	rmHD6 [mg]/CIEX	rmHD6 [mg]	rmHD6 [mg/L]	Ausbeute [%]	Wiederfindungsrate [%]
Konzentrat (10 kDa)	5,1	158		100	
Durchlauf	4,1 (± 4%)	127 (± 4%)	41	80	
Fraktion 1 (150 mM NaCl)	0,41 (± 3%)	13 (± 3%)	4,1	8	
Eluat	3,0 (± 2%)	94 (± 2%)	30	59	
<i>Kationenaustauscher (SP-650M)</i>					148

	rmHD6 [mg]/Entsalzung	rmHD6 [mg]	rmHD6 [mg/L]	Ausbeute [%]	Wiederfindungsrate [%]
Eluat	2,5	94		100	
Durchlauf	2,3 (± 1%)	83 (± 1%)	27	88	
<i>Entsalzung (Sephadex G10)</i>					88
Gesamtausbeute				45	

3.2.5.5 Charakterisierung des humanen α -Defensins 6

Die Auftrennung über analytischer RP-HPLC liefert für das lyophilisierte rmHD6 ein zum synthetischen HD6 vergleichbares Spektrum (Abbildung 3.63). Die Retentionszeit von 16,79 min korreliert gut mit der der Referenz (16,81min). Wie bereits am Tris-Tricin-Gel beobachtet werden konnte, finden sich sowohl im Chromatogramm des aufgereinigten als auch des synthetischen HD6 leichte Verunreinigungen. Während die Verunreinigung des synthetischen HD6 durch eine deutliche Bande bei 15 kDa erkennbar ist (Abbildung 3.62) und sich chromatographisch bei einer Retentionszeit von ca. 9 min (Abbildung 3.63) befindet, ist der Teil der Verunreinigung des rekombinant hergestellten HD6 weitestgehend auf den Retentionsbereich des Zielpeptids begrenzt. Der hohe Durchlaufpeak der RP-HPLC kann auf mögliche Restbestandteile von Salzen in der Konzentration des Entsalzungspuffers zurückgeführt werden.

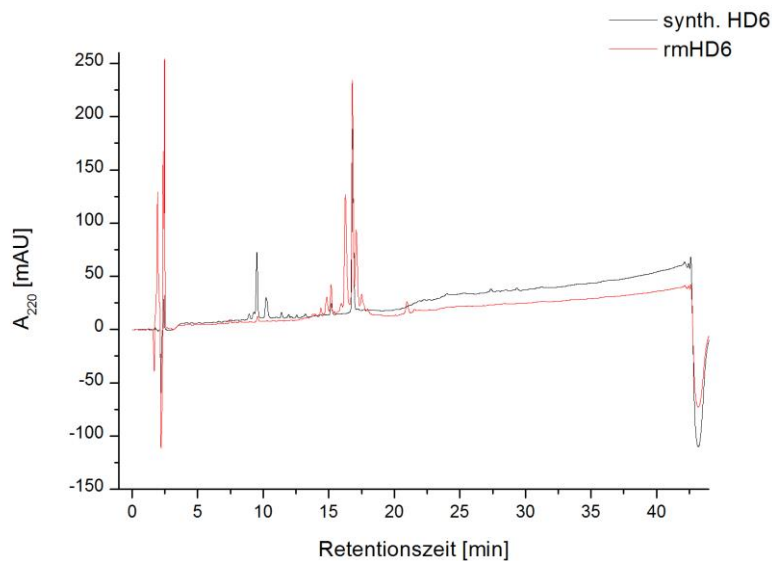


Abbildung 3.63

Auftrennung des aufgereinigten rekombinanten (rmHD6) und des synthetischen HD6 über RP-HPLC.

Die Auftrennung der Peptide erfolgte über RP-HPLC (TSKgel ODS-100V, 3 μ m, 4,6x150 mm, Tosoh Bioscience). Das rmHD6-Lyophilisat wurde in ddH₂O vollständig auf eine Konzentration von 1 mg/mL gelöst und auf die mit Lösungsmittel A (ddH₂O, 0,1% TFA) und B (ACN, 0,1% TFA) im Verhältnis 90:10 äquilibrierte Säule aufgetragen. Das Produkt wurde über einen linearen Gradienten (10-60%) des Lösungsmittels B (ACN, 0,1% TFA) über 40 min eluiert. Die Detektion erfolgte über die Absorption bei 220 nm.

Ergebnisse

Bei genauerer Betrachtung der Peaks im Bereich der Retentionszeit von ca. 17 min wird erkennbar, dass der Hauptpeak (rot) mit dem des synthetischen (schwarz) sehr gut übereinstimmt (Abbildung 3.64). Die analytische Trennung über die C18-Säule (TSKgel ODS-100V, 3 μm , 4,6x150 mm, Tosoh Bioscience, Stuttgart) zeigt für das rmHD6-Produkt eine weitere Auftrennung der Peaks. Ähnlich wie bei rmHD5, liegt die Vermutung auch hier nahe, dass die Verunreinigungen bzw. Nebenprodukte durch eine mögliche Fehlprozessierung in *P. pastoris* herrühren.

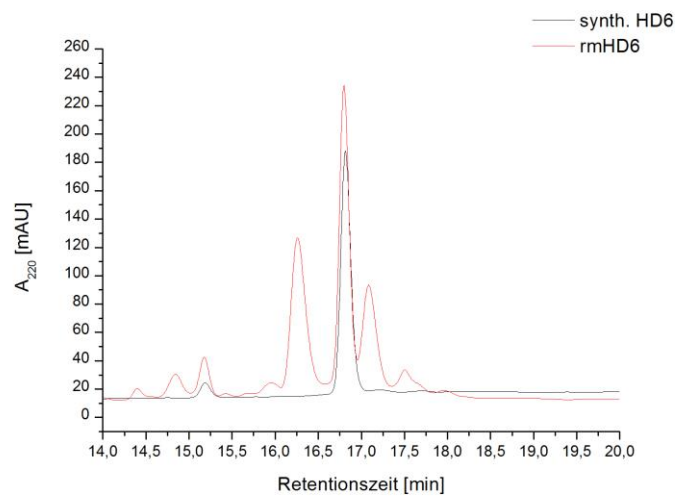


Abbildung 3.64 Ausschnitt aus dem RP-HPLC-Chromatogramm (Abbildung 3.63) zur Veranschaulichung der Auftrennung des rmHD6 .

Der massenspektrometrische Nachweis erfolgte über LC-ESI-MS (Life Science Center, Universität Hohenheim). In Übereinstimmung mit der RP-HPLC konnte über LC-ESI-MS das rmHD6 mit einer Masse von 3706.50 Da identifiziert werden (Abbildung 3.65; vgl. synth. HD6: 3706.50 Da, Abbildung 6.2). Wie bereits aus Abbildung 3.64 ersichtlich, zeigen sich massenspektrometrisch zwei Nebenprodukte mit einer relativ ähnlichen Masse wie das Zielprodukt. Die Differenz des Nebenproduktes mit einer Masse von 4734,03 Da zum Hauptprodukt beträgt 1027,53 Da. Wie anhand des RP-HPLC Chromatogramms bereits vermutet, stimmt die Differenz exakt mit den neun C-terminalen Aminosäuren (EEGVSLEKR) des α -Faktor-Prepropeptids aus *S. cerevisiae*, die im Zuge der Konstruktbildung pPICZalphaA_mHD6, unter Deletion der Schnittstelle (EAEA) für die Ste13-Protease, am N-Terminus des humanen α -Defensins 6 kloniert wurden, überein. Das

Ergebnisse

Nebenprodukt mit der Masse 3862,60 Da differiert vom Hauptprodukt mit der Masse 156,10 Da, welche der Aminosäure Arginin der Kex2-Schnittstelle (K-R) zugeordnet werden kann.

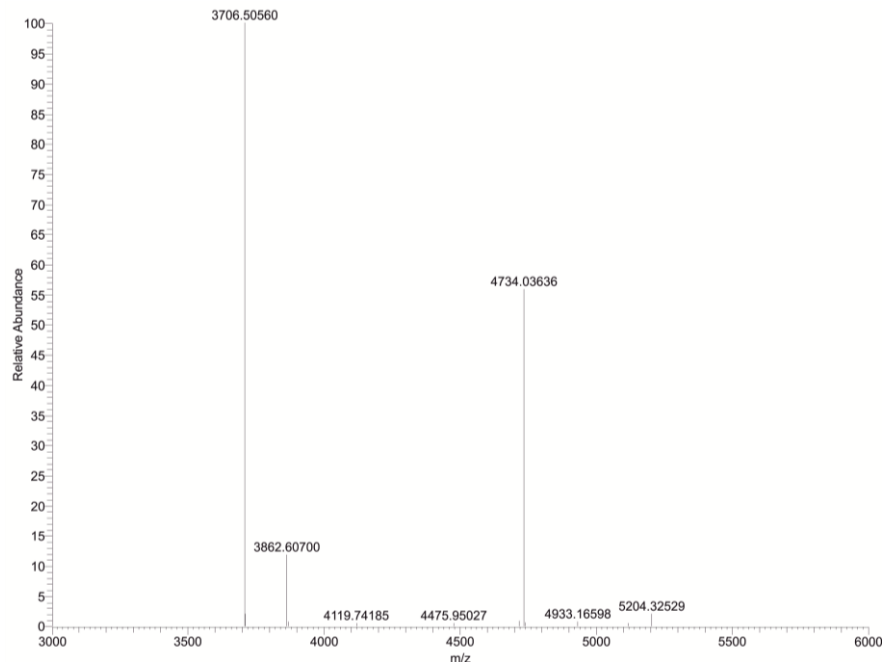


Abbildung 3.65

Massenspektrometrischer Nachweis des rmHD6 über LC-ESI-MS.

Die Messung und Darstellung der Abbildung erfolgte durch das Life Science Center, Universität Hohenheim. rmHD6 kann mit einer Masse von 3706.50 Da als Hauptprodukt des Lyophilisats nachgewiesen werden. Im höher molekularen Massenspektrum des rmHD6 können zwei weitere Hauptnebenprodukte mit den Massen 3862,60 Da und 4734,03 Da identifiziert werden. Aufgrund der Massendifferenz zum Zielprodukt gibt das Massenspektrum den Hinweis auf die durch zusätzliche Aminosäuren verlängerte Sequenz des rmHD6.

4 Diskussion

Defensine nehmen durch ihr breites und multifunktionelles Wirkungsspektrum eine besondere Stellung innerhalb des Immunsystems ein. So ist das humane α -Defensin 5 z.B. gegen *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* und *Candida albicans*^[41] und HD6 gegen *Salmonella enterica* und *Salmonella typhimurium*^[65] aktiv. Eine verminderte Expression von Defensinen, wie z.B. der HD5 und HD6 in den Paneth-Zellen des Dünndarms, spiegelt sich in Krankheitsbildern wieder, wie z.B. in der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn. Die Störung des Gleichgewichtes zwischen den antimikrobiell wirkenden Defensinen und den Darmbakterien der Flora hat die Anhaftung einer Vielzahl von Bakterien zur Folge, die schließlich eine sekundäre Entzündungsreaktion auslösen kann.

Antimikrobiell wirkende Defensine zeigen somit nicht nur das Potential als Alternative zu herkömmliche Antibiotika sondern auch vielversprechende Möglichkeiten in der Behandlung entzündlicher Darmerkrankungen.^[81]

Für die Herstellung dieser bioaktiven Defensine ist die chemische Synthese aufgrund ihrer Komplexität, z.B. durch vorhandenen Disulfidbrücken, teuer und nur in geringen Ausbeuten realisierbar.^[12] Rekombinante Expressionssysteme bieten gegenüber der chemischen Synthese Vorteile zur Herstellung von Disulfidbrücken-haltigen Peptiden. Während die Expression in *E. coli* oft nur durch geeignete Strategien oder erst nach Anwendung von Rückfaltungstechniken das korrekt gefaltete Zielpeptid liefert, zeigt sich die Expression in Hefen, wie z.B. *Pichia pastoris*, durch die mögliche Ausbildung posttranslationaler Modifikationen als besonders effizient und vorteilhaft.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Expressionssysteme *E. coli* und *P. pastoris* für die Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6. Dabei lag der Fokus auf der Etablierung eines einheitlichen und effizienten rekombinanten Herstellungsverfahrens für diese Defensine, so dass sie in hohen Ausbeuten und in ihrer vollen Bioaktivität reproduzierbar gewonnen werden können. Sowohl die Wahl des Expressionssystems und geeigneter Downstream-Techniken als auch die damit verbundenen Strategien zur Erhaltung der korrekten Faltung und Bioaktivität mussten hierfür berücksichtigt werden.

Für die Expression dieser Peptide in den Wirtsorganismen *E. coli* und *P. pastoris* und zur Etablierung eines effizienten und kostengünstigen Downstream-Prozess wurden

verschiedene Strategien herangezogen. Trotz der zahlreichen Vorteile und vielfach in der Literatur bekannten erfolgreichen Einsätze der oben genannten Wirtsorganismen für die Herstellung von Proteinen im Allgemeinen und für antimikrobielle Peptide im Speziellen zeigte sich die praktische Durchführung in mehreren Punkten, vor allem für *E. coli*, als herausforderungsvoll.

4.1 Rekombinante Produktion der humanen α -Defensine 5 und 6 in *E. coli*

Eine rekombinante Expression der reifen *mature* Peptide mHD5 und mHD6 ist bedingt durch deren Toxizität gegenüber dem Wirt *E. coli* kaum bzw. nicht möglich. Im Rahmen einer Vorarbeit zur Untersuchung der Expression des humanen α -Defensins 5 konnten die unterschiedlichen Expressionsraten der *mature*-Form von HD5 (mHD5) *versus* der Pro-Form (HD5) in *E. coli* BL21(DE3) verdeutlicht werden.^[102] Während die Expression von HD5 nachweisbar war, konnte eine minimale Expression von mHD5 nur über immunologische Verfahren nachgewiesen werden. Die Toxizität des Defensins gegenüber dem Wirt und die Suszeptibilität gegenüber Proteasen fordern daher angepasste und weiterführende Strategien.

In vivo werden Defensine als inaktive Precursor-Defensine synthetisiert und erst durch proteolytische Abspaltung des Prosegments aktiviert.^[34, 36] Das Prosegment spielt dabei sowohl für die subzelluläre Translokation und Prozessierung als auch für die richtige Faltung eine entscheidende Rolle.^[34, 41, 114]

Wie bereits durch Valore *et al.* die erfolgreiche Expression der humanen α -Defensine HNP-1-3 in ihrer Pro-Form in Insektenzellen gezeigt werden konnte, konnte dies ebenfalls in den Vorarbeiten für die erfolgreiche Expression des HD5 (Pro-Form) dargestellt werden.^[34, 91, 102] Durch Nachahmung der Natur kann die erfolgreiche Expression antimikrobieller Peptide im Wirtsorganismus *E. coli* durch den gezielten Einsatz von Carrier-Proteinen ebenfalls ermöglicht werden. Diese weisen, ähnlich wie die Prosegmente *in vivo*, eine neutralisierende und Chaperon-ähnliche Eigenschaft auf, die sowohl den Wirt als auch das Peptid schützt.^[94] HNP-1 konnte so bereits 1993 durch den Einsatz verschiedener Carrier-Proteine erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden.^[97]

4.1.1 Herstellung von mHD5 und mHD6 über Fusionsproteine

4.1.1.1 Expression

Für die rekombinante Herstellung von mHD5 und mHD6 in *E. coli* wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits bekannte Strategien zur Expression rekombinanter Proteine und Peptide eingesetzt und für die Etablierung der Herstellung beider Defensine untersucht. Als Vektorsystem wurde das, für die Expression von AMP meist genutzte^[2] und für die Klonierung und Expression rekombinanter Proteine leistungsfähigste^[115], pET-System angewandt.

Die direkte Expression der *mature*-Form antimikrobieller Peptide in *E. coli* zeigt sich als prinzipiell problematisch und aufgrund der antibakteriellen Wirkung der Peptide als, für eine erfolgreiche Überexpression in Bakterien, nicht vielversprechend.^[94, 97] Darüber hinaus werden kurze Peptid-Fragmente häufig durch Proteasen in *E. coli* degradiert bzw. akkumulieren zu *inclusion bodies*, so dass deren direkte Expression oft ineffizient ist.^[116] Carrier-Proteine zeigen, ähnlich wie in der Natur vorkommenden Prosegmente, neutralisierende und maskierende Eigenschaften und ermöglichen somit die Ausbeutesteigerung.^[96] Dabei hat sich vor allem Thioredoxin für die Expression löslicher Proteine im Cytoplasma von *E. coli* bewährt.^[116] Während die Expression des humanen α -Defensins 5 als bioaktive *mature*-Form erfolglos war, konnte durch die Fusionierung des kationisch geladenen antimikrobiellen Peptids mit einem Carrier-Protein in Vorarbeiten die Expression erfolgreich durchgeführt werden.^[102] Dieselben Beobachtungen wurden für das humane α -Defensin 6 gemacht.^[117] Dieses Carrier-Protein hat jedoch keine Affinitäts-Eigenschaften, so dass für eine leichtere Reinigung des Proteins die Insertion eines His-Tags notwendig ist.^[118, 119]

Basierend auf den vielversprechenden Ergebnissen von D. Iftime^[102], wurden im Rahmen dieser Arbeit ausgehend von diesem Fusionsprotein für mHD5, das bereits mit dem Carrier-Protein Thioredoxin aus Vorarbeiten fusioniert war, die humanen α -Defensine 5 und 6, nach erfolgreicher Insertion eines His₆-Tags, als Thioredoxin-Fusionsproteine erfolgreich exprimiert. Die Expression des mHD5-Fusionsproteins trxA-His-mHD5 zeigte sich in allen untersuchten *E. coli*-Stämmen (BL21(DE3), Origami(DE3), C41(DE3) und C43(DE3)) erfolgreich, wobei die Expression in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3) und Origami(DE3) nach 3-4 h nachließ und in den Stämmen C41(DE3) und C43(DE3) eine kontinuierliche Stabilität

des Zielproteins über ca. 20 h beobachtbar war. Diese Stämme (C41(DE3) und C43(DE3)), die sich speziell für die Expression toxischer Proteine bewährt haben^[109, 120], konnten für die Expression des mHD6-Fusionsproteins trxA-His-NcoI-mHD6 ebenfalls erfolgreich eingesetzt werden. Interessanterweise konnte das mHD6-Fusionsprotein ausschließlich in den Walker-Stämmen C41(DE3) und C43(DE3) überexprimiert werden.

Trotz der guten Überexpression beider Fusionsproteine in *E. coli* C41(DE3) zeigte sich die Herstellung der Defensine mit Hindernissen verbunden. Durch den Einsatz des am häufigsten eingesetzten Carrier-Proteins Thioredoxin, welches speziell für seine Chaperon-ähnlichen Eigenschaften bekannt ist und die Bildung von *inclusion bodies* oft erfolgreich unterbindet^[94, 121], konnte das Fusionsprotein trxA-His-mHD5 nur teilweise in löslicher Form exprimiert werden (Abbildung 3.7 a). Im Gegensatz zu trxA-His-mHD5 konnte trxA-His-NcoI-mHD6 ausschließlich in Form von akkumulierten *inclusion bodies* gewonnen werden.

Um zeit- und kostenintensive Rückfaltungsschritte der Disulfidbrücken-haltigen Zielpeptide zu umgehen ist die Expression in löslicher Form von Vorteil. Die Wahl eines geeigneten Carrier-Proteins kann für die Ausbeute und Biofunktionalität daher entscheidend sein. Für die Herstellung antimikrobieller Peptide, wie auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wird, kann der Einsatz eines universellen Carrier-Proteins nicht generalisiert werden.^[2, 94] Dennoch findet sich in anderen Arbeiten vor allem Thioredoxin als Favorit zur Expression löslicher Proteine. Die humanen β -Defensine zum Beispiel konnten über die Fusionierung mit Carrier-Proteinen, vor allem mit Thioredoxin, bereits in verschiedenen *E. coli*-Stämmen erfolgreich exprimiert und gewonnen werden.^[12] Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht einiger rekombinant hergestellten humanen Defensine über Fusionsproteine wieder. Die Gewinnung der Defensine erfolgte dabei zum Großteil in löslicher Form.^[117, 122-127] Weitere rekombinante Proteine, wie z.B. der Stammzellfaktor (SCF), konnten ebenfalls erst durch Fusionierung mit Thioredoxin rekombinant in löslicher Form gewonnen werden, während die Expression ohne Fusionierung in *inclusion bodies* resultierte.^[128] Lösliche Thioredoxin-Fusionsproteine konnten ebenfalls für die antimikrobiellen Peptide wie z.B. Cecropin, Plectasin oder LL-37 realisiert werden.^[129-131]

Auch wenn vergleichbar wenige Beispiele für die unlösliche Expression durch den Einsatz von Thioredoxin in der Literatur zu finden sind und dessen Eigenschaften als Carrier-Protein

Diskussion

als vorteilhaft beschrieben werden, konnte im Rahmen dieser Arbeit eine erfolgreiche Umgehung von *inclusion bodies* nicht beobachtet werden.

Tabelle 4.1 Humane Defensine rekombinant hergestellt in *E. coli* über Fusionsproteine

Defensin	Carrier-Protein	Schnittstelle	Codon optimiert	Stamm	Löslich	Ausbeute	Referenz
hBD-2	Thioredoxin	Enterokinase	nein	BL21(DE3)	ja	346 mg/L (FP)	[132]
hBD-2	Thioredoxin	Enterokinase	ja	BL21(DE3)	ja	1,3 g/L (FP)	[123]
hBD-3	GST	Thrombin	nein	BL21(DE3)	ja		[133]
hBD-3	Thioredoxin	Enterokinase	ja	BL21(DE3)	ja	0,99 g/L (FP) 0,21 g/L (MP)	[124]
hBD-4	Thioredoxin	Enterokinase	ja	BL21(DE3)	ja	2,68 g/L (FP) 0,689 g/L (MP)	[125]
hBD-5	Thioredoxin	Enterokinase	ja	BL21(DE3)	ja	1,49 g/L (FP) 140 mg/L (MP)	[126]
hBD-25	MBP	TEV	nein	BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	ja	120 mg/L (FP)	[134]
hBD-26	Thioredoxin	Enterokinase	ja	BL21(DE3)	ja	1,38 g/L (FP)	[127]
hBD-27	Thioredoxin	Enterokinase	ja	BL21(DE3)	ja	1,29 g/L (FP)	[127]
HNP-1	trpΔL 1413 polypeptide	CNBr	nein	BL21(DE3)pLysS	nein	80 mg/L(FP) 3,2 mg/L (MP)	[135]
HNP-2	trpΔL 1413 polypeptide	CNBr	nein	BL21(DE3)pLysS	nein	85 mg/L(FP) 2,8 mg/L (MP)	[135]
HNP-3	trpΔL 1413 polypeptide	CNBr	nein	BL21(DE3)pLysS	nein	90 mg/L(FP) 1,9 mg/L (MP)	[135]
HD5	trpΔL 1413 polypeptide	CNBr	nein	BL21(DE3)pLysS	nein	45 mg/L(FP) 2,1 mg/L (MP)	[135]
HD5	MBP	Factor Xa		BL21(DE3)			[136]
HD6	trpΔL 1413 polypeptide	CNBr	nein	BL21(DE3)pLysS	nein	60 mg/L (FP) 1,5 mg/L (MP)	[135]
HD6	Thioredoxin	Enterokinase	ja	Origami(DE3)pLysS	Ja	1,69 g/L (FP) 102 mg/L (MP)	[117]

GST: Glutathion-S-Transferase ; MBP: *Maltose binding Protein*; FP: Fusionsprotein; MP: *mature*-Peptid

Die Expression eines ähnlichen mHD6-Thioredoxin-Fusionsproteins, kloniert im Vektor pET-32a(+), wurde dagegen durch Wang *et al.* im *E. coli*-Stamm Origami(DE3)pLysS erfolgreich in löslicher Form durchgeführt.^[117]

Auch wenn das Konstrukt durch die Fusionierung zum Carrier-Protein Thioredoxin dem Fusionsprotein dieser Arbeit ähnelt, unterscheidet es sich weiter in der Schnittstelle und in den Expressionsbedingungen wie z.B. der Wahl des Expressionsstamms, -temperatur und Induktorkonzentration. pLysS dient dabei lediglich zur Repression der Basalexpression von Zielproteinen unter der Kontrolle des T7-Promotors^[118] und sollte somit nicht ausschlaggebend für die erfolgreiche Expression sein. Dennoch zeigten die Untersuchungen von Wang *et al.*, dass zu keiner Konstellation der Parameter die Expression des Zielprodukts vollständig unlöslich war. Während im Rahmen dieser Arbeit das Fusionsprotein durch eine chemische Schnittstelle für Ameisensäure spaltbar ist, verfügt das Konstrukt von Wang *et al.* über eine Enterokinase-Schnittstelle. Die Expressionsergebnisse sind dabei vermutlich weniger bedingt durch die Verwendung unterschiedlicher Schnittstellen oder Expressionsstämme bzw. -vektoren, zumal die Expression in *E. coli* Origami(DE3) im Rahmen dieser Arbeit nicht nachweisbar war.

In Anbetracht der geringen Unterschiede in der Expressionskassette zwischen dem Fusionsprotein, hergestellt im Rahmen dieser Arbeit, und dem von Wang *et al.* lässt sich vermuten, dass unter Umständen die Codon-Optimierung einen Einfluss für die erfolgreiche Expression hat. Eine Optimierung der Gensequenz der Zielpeptide führt unter Umständen zu einer verbesserten Expression des Zielpeptids.^[2, 12, 122] Die Expression der humanen Defensine (Tabelle 4.1) wurde zum Großteil ebenfalls unter Codon-Optimierung in löslicher Form gewonnen. Dieser Einfluss auf die Fusionsproteine trxA-His-mHD5 und trxA-His-NcoI-mHD6 konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht weiter vertieft werden.

Weitere Prozessoptimierungen zur Umgehung von *inclusion bodies* können durch Variationen in der Expressionstemperatur, der Induktorkonzentration, durch Deletion des His-Tags, Stammwechsel oder z.B. einer Co-Expression von Chaperonen erfolgen.^[92, 137] Die Überexpression des Zielproteins führt zu Zellstress, die sich folglich durch die hohen physiologischen Konzentrationen oft in der Bildung von Aggregaten widerspiegelt.^[138] Weitere Ursachen für die Bildung von Aggregaten liegen in der fehlenden Ausbildung von Disulfidbrücken.^[139] Für die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen den

Cysteinen wird ein Redox-System benötigt, das im Periplasma des Expressionswirts *E. coli* vorliegt.^[88] Durch genetische Arbeiten kann das zu exprimierende Zielprotein mit einem Signalpeptid am N-Terminus fusioniert werden, welches folglich für den Transport in das Periplasma des Wirts verantwortlich ist.^[118, 140] Durch den geringeren Anteil an *E. coli*-eigenen Proteinen und Proteasen^[88, 118] können sich hierbei zwar vorteilhafte Aspekte bezüglich der Aufreinigung des Zielproteins ergeben, dennoch können durch eine unvollständige Translokalisierung, proteolytische Degradierungen auch erhebliche Problematiken aufkommen^[118], die ebenfalls von Fall zu Fall jeweils untersucht werden müssen.

Der Origami-Stamm stellt z.B. eine Doppelmutante für *trxB/gor* dar und ist speziell für die Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma ausgelegt.^[88, 92] Eine Erhöhung der Löslichkeit und der Prozessierung/Faltung ist somit vorteilhaft für die Expression Disulfidbrücken-haltiger Proteine im Cytoplasma.^[88, 115] Für die Fusionsproteine *trxA*-His-mHD5 und *trxA*-His-NcoI-mHD6 konnte jedoch in keiner der untersuchten *E. coli*-Stämme eine bessere Löslichkeit im Vergleich zum eingesetzten Stamm *E. coli* C41(DE3) beobachtet werden. Dieser wurde aufgrund der besseren Überexpression und sehr guten Stabilität im Verlauf der Arbeit weiter eingesetzt.

Aufgrund der temperaturabhängigen hydrophoben Interaktion und resultierendem Aggregieren rekombinanter Proteine, kann die Senkung der Expressionstemperatur auf die Löslichkeit mancher Proteine einen vorteilhaften Effekt haben.^[92, 94, 141] Eine erhöhte Stabilität des Zielproteins durch verminderte Degradierung ist dabei ein weiterer Vorteil. Thioredoxin-Fusionsproteine, die exprimiert bei 37°C in unlöslicher Form erhalten werden, können durch Temperatursenkung oft in löslicher Form gewonnen werden.^[142] Unterschiede in der Expressionstemperatur zwischen 25°C und 37°C waren jedoch im Verlauf der vorliegenden Arbeit weder für *trxA*-His-mHD5 noch für *trxA*-His-NcoI-mHD6 ersichtlich. Auch eine Senkung auf bis zu 17°C konnte das Löslichkeitsverhalten der Fusionsproteine nicht verbessern, so dass der Temperatureinfluss für diese Fusionsproteine keine entscheidende Rolle zugesprochen wird. Manche Fusionsproteine zeigen innerhalb der Anfangsphase der Induktionsphase eine deutlich verbesserte Löslichkeit, die sich jedoch mit der Dauer der Induktion reduziert.^[142] Für die Expression der Fusionsproteine *trxA*-His-mHD5 und *trxA*-His-NcoI-mHD6 konnte weiterhin kein Einfluss der Kultivierungszeit auf das Ausmaß der Bildung von *inclusion bodies* beobachtet werden.

Weitere Optimierungen wie eine Co-Expression von Chaperonen oder die Untersuchung des Einflusses der Medienbestandteile wie auch Codon-Optimierung müssen in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

4.1.1.2 Aufreinigung der Fusionsproteine

Zur Etablierung eines effizienten Reinigungsverfahrens der rekombinant hergestellten Defensine wurde, für trxA-His-mHD5, sowohl die lösliche als auch die unlösliche Fraktion herangezogen. In Hinblick auf die Etablierung eines Herstellungsprozesses für therapeutische Agenzien wird die lösliche Fraktion der unlöslichen gegenüber bevorzugt. Dennoch können *inclusion bodies*, trotz der nötigen Rückfaltungstechniken, auch vorteilhaft sein und werden industriell für einige Produkte wie z.B. Interferone eingesetzt.^[143]

Zur Solubilisierung des mHD5-Fusionsproteins wurde das Detergenz N-Lauroylsarcosine (pH 11), das sich auch in der Solubilisierung des mHD6-Fusionsproteins als am effizientesten gezeigt hat, eingesetzt. Obwohl trxA-His-NcoI-mHD6 mittels Einsatz des Detergenz in Lösung gebracht werden konnte, blieb die Solubilisierung des trxA-His-mHD5 erfolglos. Zum einen konnte lediglich ein geringer Anteil der unlöslichen *inclusion bodies* in Lösung gebracht werden und zum anderen konnte über Tricin-SDS-Gelelektrophorese ein deutliches Degradierungsprodukt der löslichen Fraktion beobachtet werden (Abbildung 3.13). Der immunologische Nachweis über Western Blot-Analyse mittels Anti-His-Antikörper weist dabei auf ein Degradierungsprodukt mit einem Molekulargewicht von ca. 10 kDa hin, das nach Abspaltung des mHD5 auf den verbleibenden „trxA-His“-Rest deuten könnte. Da sich der His₆-Tag innerhalb des Fusionskonstrukts, zwischen trxA und mHD5 befindet, ist eine N- und C-terminale Degradierung ebenfalls nicht ausgeschlossen. Durch die Denaturierung des Zielproteins liegt dieses als eine unstrukturierte und teilweise instabile, fehlgefaltete Zwischenform vor, die unter anderem auch bedingt durch das Vorliegen des hohen pH-Wertes Stabilitätsprobleme aufzeigen kann. Aufgrund der Ergebnisse, die für die Etablierung eines technischen Prozesses unzureichend sind, wurde dieser Aufreinigung nicht weiter untersucht oder verfolgt.

Über den eingebauten His₆-Tag sollte die lösliche Fraktion des trxA-His-mHD5 von den *E. coli*-eigenen Proteinen mittels IMAC abgetrennt und anschließend über proteolytischen Verdau das *mature*-Peptid gewonnen werden. Um die Proteinstabilität und -löslichkeit

rekombinanter Proteine im Lysat zu erhöhen^[144] enthielt der Aufschlusspuffer unter anderem Natriumchlorid in der Endkonzentration von 300 mM. Nach Zellaufschluss konnte jedoch ebenfalls ein Stabilitätsproblem des Fusionsproteins in Lösung, in Form von Präzipitationsbildung, beobachtet werden (Abbildung 3.8). Das Löslichkeitsverhalten des Lysats wurde durch die Ionenstärke maßgeblich bestimmt, so dass durch Senkung der Ionenstärke eine Präzipitation verhindert werden konnte.

Durch die Klonierungsarbeiten zur Insertion eines His₆-Tags konnte das Fusionsprotein über IMAC erfolgreich aufgereinigt werden. Im Zuge der Aufreinigung über IMAC konnte eine C-terminale Degradierung des Fusionsproteins über Peptid-Massen-Fingerprint-Analyse (Life Science Center, Universität Hohenheim) nachgewiesen werden. Da die Degradierung des Fusionsproteins bereits in der unlöslichen und löslichen Fraktion (vor Aufreinigung) teilweise beobachtet werden konnte, ist ein Einfluss der Chemikalie Imidazol unwahrscheinlich. Die Ursache der Degradierung könnte auf eine fehlgefaltete Form bzw. auf eine Inhomogenität von fehlgefalteten Fusionsproteinen zurückgeführt werden. Während korrekt gefaltete antimikrobielle Peptide gegenüber der Serinprotease Trypsin stabil sind, können fehlgefaltete Formen in Anwesenheit des Enzyms degradieren. Wanniarachchi *et al.* konnten den Einfluss von Disulfidbrücken auf die Aktivität und Stabilität des HD5 verdeutlichen. Die Entfernung einer Disulfidbrücke führte zur Suszeptibilität gegenüber Trypsin.^[30] Ähnlich wie Trypsin, könnten Proteasen von *E. coli* auch zur Degradierung des Fusionsproteins führen. Das Gen *prlC* codiert in *E. coli* für eine Trypsin-ähnliche Peptidase, der Oligopeptidase A.^[145, 146] Diese Peptidase könnte möglicherweise in der Degradierung von Proteinen eine Rolle spielen.

Interessanterweise konnten auftretende Stabilitätsprobleme des Fusionsproteins trxA-His-mHD5 nur im Zuge der Aufarbeitung beobachtet werden, während in der Expression keine Degradierungsbande dargestellt werden konnte. Thioredoxin-Fusionsproteine werden meist gegenüber GST-Fusionsproteinen bevorzugt, da letztere für eine Degradierung anfällig sind.^[94] Eine ähnliche Degradierung konnte so, unter Fusionierung von hBD-3 mit GST, durch Si *et al.* ebenfalls im Zuge der Aufreinigung des Fusionsproteins beobachtet werden.^[133] Um eine Präzipitation und weitere Degradierung des Fusionsproteins zu vermeiden, wurde die Entsalzung des Proteins unmittelbar nach der Aufreinigung über IMAC durchgeführt.

Diskussion

Gängige Entsalzungsmethoden wie die Dialyse oder die Umpufferung über Ultrazentrifugationsröhrchen zeigten visuell sichtbare Stabilitätsprobleme. Während die Dialyse gegen einen salzfreien Puffer, unter Minderung der Ionenstärke, stets zur zeitversetzten Bildung von Präzipitaten führte, setzte bei der Dialyse gegen ddH₂O die Präzipitatbildung unmittelbar ein. In beiden Fällen konnte die Löslichkeit des Fusionsproteins nicht wieder hergestellt werden.

Durch die Etablierung der Entsalzung über Sephadex G10 in einer Säulenchromatographie, konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich eine proteinschonende und zeitsparende Entsalzung realisiert und durchgeführt werden. In diesem Fall war keine Präzipitation oder Degradierung des Fusionsproteins zu beobachten. Darüber hinaus konnte durch den Einsatz des volatilen NH₄OAC-Puffers eine anschließende Gefriertrocknung zu einer salzfreien Ankonzentrierung des Proteins ermöglicht werden.

Die Aufreinigung des HD6-Thioredoxin-Fusionsproteins konnte ausschließlich ausgehend von der unlöslichen Fraktion untersucht werden. Trotz Screenings nach geeigneten Detergenzien wie z.B. CHAPS, SDS, LS oder LDAO konnte für das trxA-His-NcoI-mHD6 die Solubilisierung mit einer geringen Ausbeute von lediglich 5-9% durch N-Lauroylsarcosine erreicht werden. Trotz vergleichsweise geringer Ausbeute wurde die Aufarbeitung des trxA-His-NcoI-mHD6 weiter untersucht. Durch das Waschen der *inclusion bodies* konnten bereits *E. coli*-eigene Proteine abgetrennt werden, so dass das Fusionsprotein auch ohne Chromatographie-Schritt in einer guten Reinheit erhalten werden kann. Das in Lösung vorliegende Fusionsprotein wurde direkt weiterverarbeitet. Im Gegensatz zum mHD5-Fusionsprotein weist das mHD6-Fusionsprotein keine Degradierungsbanden auf. Ähnlich wie für trxA-His-mHD5 kann über das SDS-Gel und den dazugehörigen Western Blot lediglich ein Dimerisierungsprodukt mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa identifiziert werden (Abbildung 3.12).

4.1.1.3 Isolierung der mature Peptide

Die Aufarbeitung von Fusionsproteinen kann prinzipiell sowohl enzymatisch als auch chemisch erfolgen. Bromcyan zeigt sich im Gegensatz zur Ameisensäure dahingehend vorteilhaft, da es keine verbleibenden Aminosäuren am Zielprotein hinterlässt. Diese können vor allem bei Peptiden kleiner als 40 Aminosäuren zu einer Veränderung in der Struktur und somit in der Bioaktivität führen.^[147] Eine Aufarbeitung mit Bromcyan ist sicherlich nur im Labormaßstab realisierbar und aufgrund der gesundheitsgefährdenden Eigenschaften für die großtechnische Produktion schwer zu realisieren. Für Zielpeptide wie das humane α -Defensin 6, deren Aminosäuresequenz ein Methionin aufweist, ist diese Form der chemischen Spaltung ebenfalls nicht geeignet. Ein ähnliches Problem für die industrielle Anwendung stellen der Einsatz enzymatischer Schnittstellen und die dadurch verbundenen hohen Kosten dar.^[147] Enzymatische Spaltungen sind darüber hinaus nicht uneingeschränkt effizient.^[94, 148] Für die Herstellung der Fusionsproteine wurde aufgrund der kostengünstigen und effizienten Eigenschaften die Schnittstelle für Ameisensäure, die durch Vorarbeiten bereits im Konstrukt vorhanden waren, beibehalten.

Innerhalb der Fusionsproteine trxA-His-mHD5 und trxA-His-NcoI-mHD6 befindet sich jeweils die Aminosäuren Asparaginsäure (D) und Prolin (P), die die Schnittstelle für die Ameisensäure bilden. Durch proteolytischen Verdau mit Ameisensäure kann die säurelabile Peptidbindung gespalten und die Zielpeptide mit einem, am N-Terminus verbleibenden Prolin, gewonnen werden (P-mHD5 und P-W-mHD6).

Durch die Aufreinigung und Aufkonzentrierung der entsalzten Fraktion konnte das Fusionsprotein trxA-His-mHD5 erfolgreich gewonnen und P-mHD5 durch Inkubation mit Ameisensäure (50%) bei 50°C innerhalb von 24 h abgespalten werden. Trotz der effizienten proteolytischen Spaltung mittels Ameisensäure zeigte sich die Aufarbeitung der sauren Proteinlösung als sehr anspruchsvoll. Die Neutralisierung einer derart sauren Proteinlösung und die Entfernung der Ameisensäure ist bereits im Labormaßstab nicht unproblematisch und auf den industriellen Maßstab nicht uneingeschränkt transferierbar.^[147] Über die Gefriertrocknung sollte sich die Ameisensäure verflüchtigen und über Sublimation aus der Proteinlösung entfernt werden.^[149] Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine vollständige Entfernung der Ameisensäure dennoch nicht realisiert werden. Trotz zeitintensiver Gefriertrocknung, z.T. nach vorheriger Verdünnung der sauren Lösung zu einer geringeren

Diskussion

Ameisensäure-Konzentration, konnte stets im Lyophilisat das Vorliegen der Ameisensäure nachgewiesen werden. Neben dem stechenden Geruch nach Ameisensäure, den das Lyophilisat aufwies, konnte letztendlich durch die Aufnahme des Proteins in ddH₂O und anschließender pH-Überprüfung der stark saure Charakter nach allen Aufarbeitungschargen nachgewiesen werden. Weder eine Dialyse noch eine gezielte isoelektrische Präzipitation führten zu einer erfolgreichen Entfernung der Ameisensäure. Die Abtrennung des Fusionspartners „trxA-His-D“ mit einem *pI* von 5,5 sollte durch isoelektrische Präzipitation im Reaktionsansatz ausfallen und vom Zielpeptid „D-mHD5“ (*pI* 9,0), das in Lösung bleibt, abgetrennt werden. Dieser Ansatz war im Gegensatz zu den Versuchen von Pazgier *et al.* erfolglos.^[135] Die Entsalzung über Säulenchromatographie konnte ebenfalls nur unter großen Ausbeuteverlusten durchgeführt werden. Letztendlich zeigte auch die Isolierung der *mature*-Form mHD5 ausgehend des neutralisierten (umgepufferten) Proteingemischs entsprechende Hindernisse, so dass weder über IMAC noch über Kationenaustauschchromatographie rmHD5 gewonnen und nachgewiesen werden konnte. In der Durchlaufraction der IMAC, die das mHD5 enthalten sollte, konnten lediglich Peptidfragmente im Bereich von 1-3 kDa über LC-ESI-MS identifiziert werden. Durch eine unspezifische Aktivität der Ameisensäure könnte das Zielpeptid P-mHD5 durch eine längere Inkubation weiter abgebaut werden.^[150] Die Aspartyl-Prolin Bindung stellt dabei die labilste Peptidbindung gegenüber saurer Hydrolyse dar.^[108] Dennoch können prinzipiell weitere Aspartyl-Bindungen gespalten werden. Die Sequenz des humanen α -Defensins 5 weist jedoch keine Asparaginsäure auf. Die genaue Ursache dieses Abbaus ist daher unklar und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Im Gegensatz zur Isolierung des P-mHD5 wurde die Isolierung des P-W-mHD6 ausgehend vom Solubilisat durchgeführt, in dem das HD6-Thioredoxin-Fusionsprotein in denaturiert reduzierter Form vorlag. Das Fusionsprotein, das bereits in einem genügend reinen Zustand in Lösung vorlag, wurde für den proteolytischen Verdau zunächst aus der Lösung gefällt. Diese zeigte teilweise einen hohen Verlust (bis zu 80%) im Überstand der Isopropanol-Lösung (Abbildung 3.14 a) und erwies sich als ungeeignet. Das gefällte Protein wurde in 50% Ameisensäure gelöst und entsprechend dem Fusionsprotein trxA-His-mHD5 verdaut. Analog zu P-mHD5 konnten LC-ESI-MS Messungen das Vorhandensein des denaturiert reduzierten P-W-mHD6 nicht bestätigen. Da P-W-mHD6 als reduzierte denaturierte Form erhalten wird,

Diskussion

könnten die analytischen nachgewiesenen Peptidfragmente bedingt durch Instabilität fehlgefalteter Formen herrühren.

Aufgrund der Problematiken, die besonders in der Handhabung mit der Ameisensäure vorlagen, wurden für beide Defensine jeweils entsprechende Fusionsproteine hergestellt, die anstatt der Schnittstelle D-P eine für die TEV-Protease spezifische Schnittstelle enthielt. Nach Umklonierung und Expression wurden diese, als *inclusion bodies* exprimierte Proteine, entsprechend aufgearbeitet. Diese Protease erwies sich jedoch als ineffizient und resultierte in keinem erfolgreichen Verdau (Daten nicht gezeigt), so dass diese Strategie ebenfalls nicht für eine Etablierung der Synthese von HD5 und HD6 angewendet werden konnte.

4.1.2 Herstellung von mHD5 und mHD6 über Tandem-Proteine

Die Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 konnte über die Fusionierung mit Thioredoxin nur unter großen Ausbeuteverlusten und Problematiken in der Aufarbeitung erfolgen. Eine alternative Strategie zur Herstellung der antimikrobiellen Peptide in *E. coli* beinhaltet die Fusionierung der Defensine zu Multimeren. Sowohl mHD5 als auch mHD6 zeigen die Eigenschaft zu oligomerisieren und kommen in der Natur als Dimere bzw. Tetramere vor.^[23, 24, 28] Eine Fusionierung von n -Peptid-Einheiten zu Oligomeren ermöglicht eine Ausbeutesteigerung an Zielpeptid, auch wenn diese Strategie oft die Expression als *inclusion bodies* zur Folge hat und aufgrund der Disulfidbrücken *in vitro* Rückfaltungsschritte notwendig sind. Die Bildung von *inclusion bodies* ist dabei sowohl durch die intermolekulare Interaktion hydrophober Bereiche als auch durch die fehlerhafte Ausbildung von Disulfidbrücken im Cytoplasma bedingt.^[151] Die gezielte Expression von Proteinen in Form von *inclusion bodies* kann neben den kosten- und zeitintensiven Rückfaltungsschritten auch einige Vorteile mit sich bringen. Durch das Aggregieren der Zielpeptide sind diese vor Proteasen geschützt und weisen verminderte Degradierungsprodukte auf. Darüber hinaus ist die Aufreinigung von *inclusion bodies* vereinfacht.^[152]

4.1.2.1 Expression der Tandem-Proteine

mHD5 konnte über die Fusionierung der Peptideinheiten ($n = 2, 3, 4$) bereits in Vorarbeiten erfolgreich exprimiert werden.^[102] Eine Umklonierung zur Insertion eines His-Tags lieferte entsprechende mHD5-Tandem-Proteine (Dimer, Trimer, Tetramer), die ebenfalls erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden konnten.^[103] Die höchste Expressionsrate konnte hier für das mHD5-Tetramer in *E. coli* C41(DE3) unter Bildung von *inclusion bodies* erfolgen.^[103] Zur Etablierung eines geeigneten Herstellungsverfahrens mit hohen Ausbeuten wurde daher ausschließlich mHD5-Tetramer ($n = 4$) im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Expressionsuntersuchungen zum mHD5-Tetramer waren in allen untersuchten *E. coli*-Stämmen unter Bildung von *inclusion bodies* erfolgreich.

Im Gegensatz dazu konnte für die entsprechenden mHD6-Multimere (Tetramer, Pentamer) im Rahmen einer Diplomarbeit weder über SDS-PAGE noch Western Blot-Analyse eine Expression nachgewiesen werden.^[110] Die Interaktion der positiven Ladung des Peptids mit der RNA und DNA gilt häufig als die Ursache für die erfolglose Expression von Tandem-

Proteinen infolge von Inhibierung der Transkription und Translation.^[153] Durch die Fusionierung mit einem neutralisierenden Fusionsprotein kann die Expression des Zielpeptids positiv beeinflusst und erfolgreich durchgeführt werden. Die Konstruktion von mHD6-Multimeren erfolgte daher in den Vektor pET-32a(+) zur N-terminalen Fusionierung mit dem Carrier-Protein Thioredoxin. Das resultierende mHD6-Pentamer konnte trotz der neutralisierenden Eigenschaft des negativ geladenen Thioredoxins ebenso wenig erfolgreich exprimiert werden.^[110] Lediglich für ein mHD6-Monomer, das dem exprimierten Fusionsprotein *trxA-His-NcoI-mHD6* in pET-22b(+) ähnelt, konnte die Expression nachgewiesen werden. Das humane α -Defensin 6 (+2) hat im Gegensatz zum Defensin 5 (+4) eine geringere Nettoladung, so dass die Ursache für die fehlende Expression vermutlich nicht in der Ladung zu suchen ist sondern eventuell in der Wirkungsweise der Defensine. Der Wirkungsmechanismus von HD6 ist zu dem des HD5 und anderen Defensinen verschieden. HD6 bildet in der Natur sogenannte Nanonetze, die gerade durch Multimerisierung von tetameren Einheiten, Mikroorganismen umhüllen und absterben lassen. Die hier dargestellte Strategie zur Herstellung antimikrobieller Peptide scheint für dieses Peptid, im Gegensatz zum mHD5, nicht geeignet zu sein.

4.1.2.2 Reinigung des mHD5-Tetramers aus inclusion bodies

Die Reinigung von *inclusion bodies* zeigt sich, bedingt durch die vergleichsweise einfache Abtrennung von den löslichen Bestandteilen durch Zentrifugationsschritten, besonders praktikabel in der Handhabung. Durch mehrmaliges Waschen der unlöslichen Fraktion können co-präzipitierte *E. coli*-eigene Proteine mittels Triton X-100 sowie durch den Zusatz niedrigkonzentrierter chaotroper Agenzien entfernt werden.^[92] Durch einen dreimaligen Waschschrift konnte so das mHD5-Tetramer in guter Reinheit erhalten und durch geeignete Detergenzien in Lösung gebracht werden. Der Zusatz von 2 M Harnstoff oder 1,5 M NaCl im Waschpuffer, welche für die Solubilisierung und Entfernung von Kontaminanten vorteilhaft sein können, waren für die Reinigung des Tandem-Proteins nicht weiter vorteilhaft. Screenings zur Solubilisierung des mHD5-Tetramers wurden unter Einsatz verschiedener Detergenzien bei unterschiedlichen Konzentrationen und pH-Werten durchgeführt. Auch wenn irreversible Schädigungen des mHD5-Tetramers durch Deamidierung und alkalischer Desulfonierung der Cysteine durch extreme pH-Werte möglich sind^[92, 154], wurde die

effizienteste Solubilisierung durch N-Lauroylsarcosine bei pH 11 erreicht. GuHCl wird in der Literatur oft aufgrund der besseren chaotropen Eigenschaften bevorzugt.^[92] Dieses Detergenz ermöglichte ebenfalls die Solubilisierung des mHD5-Tetramers im neutralen Milieu, jedoch unter hohen Ausbeuteverlusten bedingt durch verhärtender Eigenschaften der unlöslichen Fraktion nach Versetzen mit Detergenz. Die unlösliche Fraktion konnte hier nicht resuspendiert werden, welches sich in einem hohen Ausbeuteverlust widerspiegelte. Die Solubilisierung mittels Harnstoff ist pH-abhängig, weshalb ein Screening nach einem pH-Optimum von Protein zu Protein – ähnlich wie nach den geeigneten Detergenzien selbst – unumgänglich ist. Ein entscheidender Nachteil in der Anwendung dieser Verbindung sind jedoch die möglichen Nebenreaktionen, die der Einsatz von Harnstoff mit sich bringt. Nebenprodukte wie Cyanate können die Aminosäuren des Zielproteins carbamylieren und somit die Produktqualität negativ beeinflussen. Harnstoff zeigte sich insgesamt für die Solubilisierung des mHD5-Tetramers am wenigsten effizient.

Da die Inkubationszeit für die Solubilisierung des Zielproteins mHD5-Tetramer unabhängig war, wurde die Solubilisierung bei extrem hohen pH-Wert von 11 für eine geringe Dauer durchgeführt um irreversible Schäden zu vermeiden. Die Solubilisierung des Zielproteins wurde mit einer Ausbeute von 48% erreicht. Insgesamt konnte das lösliche mHD5-Tetramer_{crude} mit einer Ausbeute von 2,85 g/L ($\pm 10\%$) und guter Reinheit isoliert werden (Abbildung 3.20 a).

4.1.2.3 Isolierung des Monomers

Die proteolytische Spaltung des mHD5-Tetramers erfolgte im sauren Milieu. Durch die Fusionierung von *n*-Peptideinheiten befindet sich die Schnittstelle D-P jeweils N- und C-terminal am Zielpeptid, resultierend in P-mHD5-D. Um das Zielprotein, das sich in alkalischer Lösung befindet, für den Verdau anzusäuern wurden verschiedene Methoden untersucht. Die Isopropanolfällung des Thioredoxin-Fusionsproteins konnte zunächst vollständig und reproduzierbar erfolgen (Abbildung 3.20, Spur 4). Spätere Durchführungen zeigten jedoch ebenfalls wie zuvor (siehe trxA-His-NcoI-mHD6) einen hohen Verlust von bis zu 70% an Zielpeptid. Da die Durchführung der Fällung identisch durchgeführt wurde (Temperatur, Lösungsmittel, Dauer, Zentrifugation) ist die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse unklar. Für die Etablierung eines geeigneten Verfahrens bedarf es jedoch eines

robusten, reproduzierbaren Verfahrens, welches durch die Isopropanolfällung letzten Endes nicht gegeben ist. Alternativ kann die Fällung des Zielproteins durch die Dialyse gegen ddH₂O ausgelöst werden.^[149, 155] Diese Methode war für die Fällung des mHD5-Tetramers effizient.

Entsprechend dem Fusionsprotein trxA-His-mHD5 war der proteolytische Verdau des mHD5-Tetramers in 50% Ameisensäure ebenfalls nach 24 Stunden vollständig abgelaufen (Abbildung 3.21). Durch die Insertion eines His-Tags kann nach proteolytischer Spaltung des P-mHD5-D die Abtrennung des denaturierten und reduzierten Peptids von den unvollständig geschnittenen Multimeren, die noch einen His-Tag tragen, erfolgen. Das Zielpeptid, das im Durchlauf einer Ni²⁺-Affinitätschromatographie zu finden sein sollte, konnte entsprechend über Western Blot-Analyse mittels Anti-HD5-Antikörper identifiziert werden. Die massenspektrometrische Analyse zeigte, wie auch zuvor bei der Strategie der Fusionsproteine, lediglich Peptidfragmente kleiner 3 kDa. Durch den hohen, nicht erklärbaren Verlust des Zielpeptids konnte die Rückfaltung des Peptids nicht erfolgen.

Auch wenn die Strategie des mHD5-Tetramers sich zunächst als ein ausbeutereiches Herstellungsverfahren des Defensins mHD5 zeigte, scheiterte die erfolgreiche Herstellung des Zielpeptids jedoch erneut im letzten Reinigungsschritt. Trotz der scheinbar guten Stabilität des Tandem-Proteins, das weder Degradierungsbanden noch das Ausbilden von Präzipitaten zeigte, findet ein verlustreicher Reinigungsschritt, ähnlich wie für das Fusionsprotein trxA-His-mHD5 und trxA-His-NcoI-mHD6, im Polishing nach dem Verdau mit Ameisensäure statt. Dies konnte jedoch nur mit massenspektrometrischer Analyse erkannt werden, während immunologische Nachweise den Anschein erweckten, das Zielprotein – wenn auch nur in geringen Mengen – isoliert zu haben (Abbildung 3.23). Sowohl Tricin-SDS-Gelelektrophorese als auch der Nachweis mittels spezifischer Antikörper zeigen, sowohl aufgrund der guten Korrelation mit dem Molekulargewicht des synthetischen HD5 als auch der positiven Detektion, die erfolgreiche Aufreinigung des P-mHD5-D ausgehend von dem mHD5-Tetramer.

Abbildung 4.1 gibt eine abschließende Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Strategien und damit verbundenen Herausforderungen in der Herstellung der Defensine wieder.

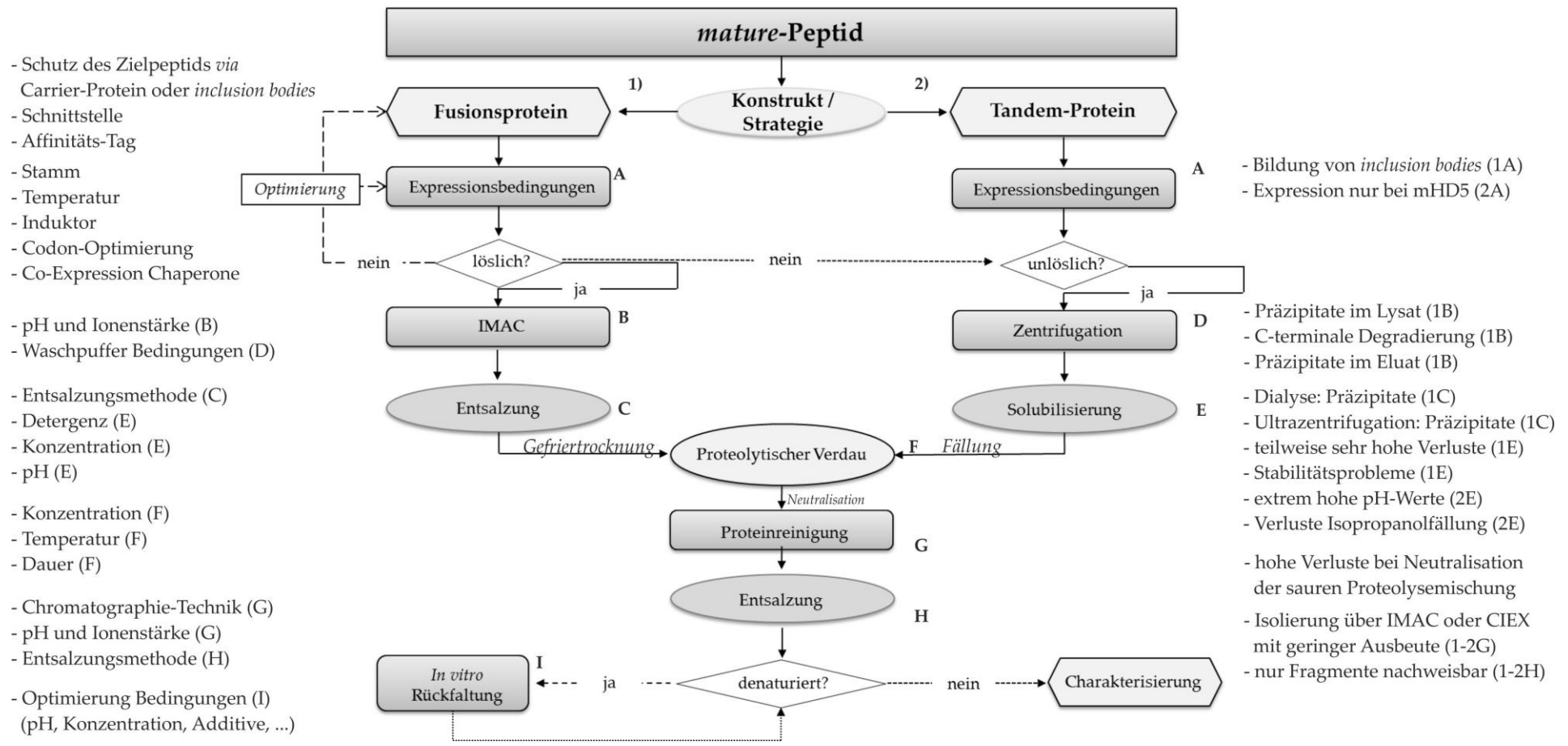


Abbildung 4.1 Übersicht der Herstellungsverfahren der humanen α -Defensine 5 und 6 in *E. coli*.

4.2 Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 in *P. pastoris*

Ein alternatives und häufig eingesetztes Expressionssystem zur rekombinanten Herstellung von Proteinen und Peptiden sind Hefen. Besonders für die Expression von Proteinen, die in der Natur ebenfalls sekretiert werden, stellt der Einsatz von *P. pastoris* einen enormen Vorteil dar. Durch den gezielten Einsatz eines Vektors, wie des eingesetzten pPICZ α A, der das α -Faktor-Prepropeptid aus *S. cerevisiae* enthält, kann die Expression heterologer Proteine in das Medium erfolgen. Einen weiteren vorteilhaften Aspekt bildet die mögliche Ausbildung nativer Disulfidbrückenbindungen sowie Glykosylierungen. Die humanen α -Defensine 5 und 6 verfügen jeweils über drei Disulfidbrücken, welche durch die Expression in *P. pastoris* erhalten werden können. Der Expressionswirt *P. pastoris* wurde bereits erfolgreich für die Expression der humanen α -Defensine 5 und 6 in eigenen Vorarbeiten^[99] und für die Herstellung von mHD5 durch zwei weitere Arbeitsgruppen eingesetzt.^[101, 156] Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die Vorteile dieses Expressionssystems zur Herstellung der beiden Defensine in hohen Ausbeuten und unter Ausbildung der korrekten Faltung genutzt.

4.2.1 Herausforderungen in der Expression der humanen α -Defensine 5 und 6 unter Einsatz des Expressionswirts *P. pastoris*

Die extrazelluläre Expression der humanen Defensine mHD5 und mHD6 erfolgte in *P. pastoris* X-33 unter Einsatz des Vektors pPICZ α A. Dieser Vektor verfügt über das α -Faktor-Prepropeptid, aus *S. cerevisiae* stammend, das die Sekretion des Zielpeptids in das Medium ermöglicht. Die Abspaltung dieses α -Faktor-Prepropeptid erfolgt durch die Signal-Peptidasen Kex2 und Ste13 im späten Trans-Golgi-Netzwerk.^[93, 157]

Durch Klonierungsarbeiten wurde bereits in eigenen Vorarbeiten gezielt die Schnittstelle für die Signal-Peptidase Ste13 (Glu-Ala), die in der Literatur als unzuverlässig beschrieben wird^[93, 112], deletiert.^[99] Durch das Vorhandensein der Kex2-Schnittstelle sollte die Sekretion der Zielpeptide mHD5 und mHD6 unter Erhalt ihrer nativen Sequenz, d.h. ohne zusätzliche N-terminale Aminosäuren, in das Medium erfolgen.^[112] Die Expression der beiden Defensine in *P. pastoris* erfolgten jeweils als *mature*-Peptide (mHD5 und mHD6).

Die extrazelluläre Expression heterologer Proteine unter Einsatz des α -Faktor-Prepropeptids zeigt in der Praxis jedoch häufig N-terminal unterschiedlich prozessierte Proteine.^[100] Ähnlich wie in Arbeiten durch Hsu *et al.*, die die Expression des mHD5 in *P. pastoris*

untersucht haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine Proteindoppelbande für mHD5 erhalten (Abbildung 3.27 a). Ghosh *et al.* konnten bei der Isolierung des humanen α -Defensins 5 aus intestinale Gewebe eine Heterogenität im Harnstoffgel beobachten, die jedoch auf eine glykosylierte Form des mHD5 zurückgeführt wurde.^[36] Ähnlich wurde durch die Arbeitsgruppe Hsu *et al.* die Ursache für das Auftreten der Doppelbande als eine mögliche O-Glykosylierung angenommen.^[156] Im Zuge dieser Arbeit wurde anhand massenspektrometrischer Analysen die Expression verschieden prozessierter mHD5-Formen nachgewiesen, die jeweils unterschiedlich viele Aminosäuren, verbleibend aus dem α -Faktor-Prepropeptid, am N-Terminus zeigten und in Form von Doppelbanden sichtbar waren (Abbildung 3.39, Abbildung 3.40). Als Hauptprodukt wurde das Zielpeptid mHD5 mit neun zusätzlichen Aminosäuren „EEGVSLEKR“ am N-Terminus erhalten.

Obwohl gezielt durch Klonierungsarbeiten auf die Schnittstelle der Ste13-Protease verzichtet wurde, um N-terminal verbleibende Glu-Ala Repeats zu vermeiden, konnte weder mHD5 noch mHD6 vollständig in seiner nativen Sequenz prozessiert und exprimiert werden. Während das Vorhandensein der Glu-Ala Repeats als Spacer eine sterische Hinderung der Kex2-Protease minimiert und deren Effizienz somit steigert^[158], kann bei einer Überexpression des Zielproteins die Effizienz der Ste13-Protease wiederum ungenügend sein und in verbleibenden Glu-Ala Repeats am Zielprotein resultieren.^[93, 159-161] Die Deletion der Glu-Ala Repeats und damit der Schnittstelle der Ste13-Protease kann, durch die verminderte Effizienz der Kex2-Protease, in der Sekretion unterschiedlich prozessierter Proteine resultieren.^[93] Dabei scheinen, übereinstimmend mit dem erhaltenen Hauptprodukt „EEGVSLEKR-mHD5“, vor allem Produkte mit 9-11 extraterminalen Aminosäuren gebildet zu werden.^[162, 163] Die Gewinnung des Zielprodukts mit der nativen Aminosäuresequenz kann daher nicht durch die Deletion der Ste13-Protease generell realisiert werden und ist von Protein zu Protein verschieden und zu untersuchen. Da von antimikrobiellen Peptiden und speziell für HD5 und HD6 die Neigung zur Oligomerisierung bekannt ist, wurde zunächst vermutet, dass deren Prozessierung bedingt durch die sterische Hinderung der Schnittstellen zusätzlich eine Herausforderung für die Kex2-Protease darstellen könnte. Interessanterweise konnte das humane α -Defensin 5 durch eine weitere Arbeitsgruppe in *P. pastoris* erfolgreich, trotz Deletion der Schnittstelle für Ste13 und unter Einsatz des Vektors pPIC9K, in ihrer nativen Sequenz exprimiert werden.^[101] Ob wohlmöglich der Einfluss der optimierten Codons einen entscheidenden Einfluss dabei spielt, kann lediglich vermutet

werden. Der Einfluss einer Codon-Optimierung auf die Prozessierung bleibt weiterhin zu prüfen.

Das α -Faktor-Prepropeptid aus *S. cerevisiae* wird in vielen Fällen erfolgreich eingesetzt^[100], dennoch ist diese Signalsequenz nicht uneingeschränkt anwendbar. Humane Defensine werden in der Natur ebenfalls als Precursor-Moleküle exprimiert, die sich aus einer Signalsequenz, dem Prosegment und schließlich dem reifen *mature*-Peptid zusammensetzen. Diese Prepro-Form kann ebenfalls als Signalsequenz zur Sekretion der Defensine in *P. pastoris* genutzt werden.^[93, 158] Die Expression heterologer Proteine unter Einsatz deren nativer Signalsequenz konnte bereits erfolgreich ohne beobachtbare Heterogenität an den jeweiligen N-Termini durchgeführt werden.^[163-165] Beispielsweise verlief die Prozessierung der Lipase CalB unter Einsatz der nativen Signalsequenz nsB erfolgreich, so dass das Protein ohne extraterminale Aminosäuren gewonnen werden konnte, während die Prozessierung des α -Faktor-Prepropeptids ebenfalls, wie für mHD5 und mHD6, unvollständig war und die neun Aminosäuren „EEGVSLER“ am Zielpeptid CalB verblieben.^[165] Interessanterweise verfügen beide Signalsequenzen über die Kex2-Schnittstelle. Ebenso wie unter Verwendung der Signalsequenz aus *S. cerevisiae* kann die Expression in *P. pastoris* unter Einsatz der nativen Signalsequenz dennoch erfolglos sein, wie z.B. für GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin).^[165]

Die Untersuchung des möglichen Einflusses der nativen Prepro-Sequenz erfolgte im Rahmen dieser Arbeit lediglich für mHD5. Dabei konnte das Zielpeptid im Vergleich zur Expression der *mature*-Form in einem wesentlich geringeren Expressionslevel erhalten werden und unter erneuter Fehlprozessierung, so dass der Einfluss der nativen Signalsequenz in diesem Fall ebenfalls keinen Lösungsansatz darstellte.

Um die Expression der humanen Defensine zu optimieren und gegebenenfalls die Prozessierung positiv zu beeinflussen, wurde der Einfluss des Mediums, Komplex- versus Basalsalzmedium, und der Einfluss der Sauerstoffbegasung untersucht. Dabei konnte eine Abhängigkeit des Mediums auf die Ausbeute des Zielpeptids rmHD5 beobachtet werden, jedoch kein Einfluss auf dessen Prozessierung. Für die Prozessierung des rmHD5 zeigte weder die Wahl des Mediums, die Variation des Gelöstsauerstoffgehalts noch die Senkung der Induktionstemperatur einen Einfluss. In Arbeiten von Salunkhe *et al.* konnte durch den Einsatz des Komplexmediums BMGY die Fehlprozessierung auf unter 2% minimiert werden, jedoch nur unter Zusatz von DMSO.^[166] Um der Prozessierung im Fermentationsprozess

entgegenzuwirken, könnte die Fehlprozessierung durchaus durch die Aktivität der Protease beeinflusst werden. Um die Effizienz der Kex2-Protease zu erhöhen könnte daher das Expressionskonstrukt unter Erhalt der Ste13-Schnittstelle, trotz der bekannten Problematik möglich verbleibender Glu-Ala Repeats, umklontiert und die Expressionsprodukte untersucht werden. Eine Deletion der Ste13-Protease zeigte z.B. bei Verwendung der Signalsequenzen für PHA-E (Phytohemagglutinin E-Form), PHA-L (Phytohemagglutinin L-Form) und GNA (Schneeglöckchen-Lektin) N-terminale Extensions, während die Deletion zwar die Extensions verhinderte andererseits jedoch N-terminale Glu-Ala Repeats zur Folge hatte.^[165]

Die Überexpression des Gens, codierend für *Kex2*, könnte zur Steigerung der Effizienz und gegebenenfalls zur korrekten Prozessierung des Zielproteins führen.^[167] Um die Effizienz der Kex2-Protease zu erhöhen bzw. deren Insuffizienz entgegen zu wirken, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Ansatz verfolgt aus dem Überstand aufgereinigtes rmHD5 *in vitro* mittels kommerzieller Protease Kex2 vollständig zu spalten und rmHD5 in der nativen Aminosäuresequenz zu erhalten. Massenspektrometrische Analysen zeigten keinen Einfluss auf die Verteilung der Massen, so dass diese Strategie ebenfalls scheiterte. Unklar bleibt, ob dies aufgrund einer Inaktivität der kommerziellen Protease oder bedingt durch übermäßige sterische Hindernisse erfolglos blieb.

Keine der untersuchten Prozessparameter zeigte Einfluss auf die Prozessierung. Die Wiederholung der Fermentationsbatches, unabhängig des Fermentationsvolumens, der Prozessdauer oder des Einsatzes unterschiedlicher Klone, lieferte stets sowohl für mHD5 als auch mHD6, ein ähnliches Massenspektrum an verschiedenen Isoformen und zeigte sich für die Etablierung eines robusten Herstellungsprozesses als herausforderungsvoll.

Zusätzliche Aminosäuren in der Primärstruktur haben einen Einfluss auf die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen und Peptiden und können dadurch die Funktionalität des Zielproteins beeinflussen. Für die Defensine mHD5 und mHD6, die jeweils aus 32 Aminosäuren bestehen, könnte das Vorhandensein der neun zusätzlichen Aminosäuren EEGVSLEKR (bzw. nur anteilig) einen entscheidenden Einfluss haben. Kationische, antimikrobielle Peptide wirken über verschiedene Wirkmechanismen, die bis heute nicht vollständig geklärt sind. Dabei scheinen jedoch sowohl die Ladungseigenschaften und der hydrophobe Charakter als auch das Vorhandensein bestimmter Aminosäuren für die

Funktionalität eine wichtige Rolle zu spielen. Ein Zusatz der Aminosäuren liefert sowohl Aminosäuren mit sauren (E), basischem (K, R), hydrophobem (V, L) oder neutralem (G, S) Charakter. Diese könnten ebenso einen positiven Effekt auf die Biofunktionalität haben und neue Derivate mit unterschiedlichem Wirkungsspektrum liefern. Daher wurde die Fermentation, die Reinigung und Trennung der exprimierten Defensine und deren fehlprozessierten Formen weiter untersucht.

Eine Degradierung der beiden exprimierten Defensine mHD5 und mHD6 in *P. pastoris* konnte weder für mHD5 noch mHD6 beobachtet werden. Die Zunahme des Expressionslevels für mHD5 kann jedoch bedingt durch die Anreicherung des Zielpeptids im Fermentationsüberstand durch das stetig ansteigende Zellwachstum herrühren. Stabilitätsprobleme, wie z.B. in der Expression von hBD-1^[12], konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Die Expression des mHD6 zeigte sich vergleichbar gering und wurde bisher, nach aktuellem Stand der Forschung, nicht in *P. pastoris* durchgeführt. Die Protease Kex2 erkennt sowohl die Schnittstelle Lys-Arg als auch Arg-Arg.^[163] Eine mögliche Erklärung könnte somit das Vorhandensein der Schnittstelle Arg-Arg in der Aminosäuresequenz des mHD6 sein, die im Zuge der Prozessierung, unter der N-terminalen Abspaltung von acht Aminosäuren des mHD6, zu einer verkürzter Form mit der Sequenz SCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL führen würde und somit zu einer erfolglosen Expression des Zielpeptids. Trotz des Vorhandenseins dieser Schnittstelle wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die bestehende Problematik einer insuffizienten Kex2-Protease für die Expression des mHD6 genutzt werden kann. Die Analyse der Massenverteilung über LC-ESI-MS zeigte, dass im Gegensatz zum Defensin mHD5, das Hauptprodukt dem Zielprodukt mHD6 mit dem Molekulargewicht 3706 Da entspricht (Abbildung 3.65). Das Nebenprodukt mit einer Masse von 4734 Da trägt analog zum mHD5 neun zusätzliche N-terminale Aminosäuren (EEGVSLEKR), abstammend aus dem α -Faktor-Prepropeptids aus *S. cerevisiae*. Eine ähnliche Insuffizienz der Kex2-Protease in der Expression des Gens, codierend für *mHD6*, konnte ebenfalls für dieses Defensins unter Einhaltung derselben Prozessparameter beobachtet und somit die Expression des mHD6 erstmals erfolgreich in *P. pastoris* durchgeführt werden. Die Bildung fehlprozessierter mHD6-Formen konnte jedoch nicht vollständig unterbunden werden.

4.2.2 Herausforderungen in der Reinigung und in der Isolierung der korrekt prozessierten Defensine rmHD5 und rmHD6

Der Expressionswirt *P. pastoris* bietet einige Vorteile in der Expression heterologer Proteine. So zeigt sich die Aufarbeitung rekombinanter Peptide und Proteine, die extrazellulär exprimiert und in das Medium sekretiert werden, als besonders vorteilhaft. Der Anteil sekretierter *Pichia*-eigener Proteine ist dabei so gering, dass das Zielpeptid in einen bereits verhältnismäßig reinen Zustand erhalten werden kann.

4.2.2.1 *Pichia*-eigene Farbpigmente

Die Expression in *P. pastoris* weist aber neben allen genannten Vorteilen auch einen Nachteil auf. Die Induktion mit Methanol führt so nicht nur zur Überexpression der Zielgene sondern zeitgleich zur Produktion *Pichia*-eigener Pigmente, die vor allem nach Abtrennung der Biofeuchtmasse im Überstand in Form einer von bräunlich über intensiv grünen Farbe erkennbar sind.^[168] Diese gelb-grüne Verfärbung rührt von der Alkoholoxidase her, die unter hohen Konzentrationen Kristalloide bildet, welche wiederum bedingt durch Zellschädigung in den Überstand gelangen und dort akkumulieren.^[169, 170] In der Expression des humanen α -Defensins 5 konnte das Vorhandensein der Farbpigmente durch die intensiv dunkelgrüne Farbe beobachtet werden, während im Vergleich dazu im Prozess zur Gewinnung von rmHD6 eine weniger stark intensive Verfärbung beobachtet wurde. Um einen Großteil der grünen Pigmente im Überstand abzutrennen, wurde unter minimalen Ausbeuteverlusten von 5-10% der Überstand der Fermentation von rmHD5 zunächst über eine 0,22 μ m-Membran filtriert und anschließend rmHD5 über eine 10 kDa-Membran aufkonzentriert. Die Aufkonzentrierung des rmHD6 erfolgte ohne vorherige Filtration. Die Aufreinigungen beider Defensine rmHD5 und rmHD6 konnten anschließend erfolgreich über Kationenaustauschchromatographie (Toyopearl SP-650M, Tosoh Bioscience, Stuttgart) unter Abtrennung der grünen Pigmente und *Pichia*-eigenen Proteine erfolgen. Dieser Reinigungsprozess erwies sich als robust und effizient zur Abtrennung der grünen Farbpigmente und zur Reinigung der Defensine.

Trotz regelmäßiger Reinigung der Säule konnte nach einer Vielzahl von Reinigungsläufen, die vollständige Abtrennung des Farbpigments im Falle des rmHD5 nicht immer erfolgreich realisiert werden. In einigen Reinigungsbatches konnte nach der Ankonzentrierung der

Eluatfraktion bzw. im Lyophilisat der entsalzten Eluatfraktion Reste von grünen Farbpigmenten visuell nachgewiesen werden. Die Ursache für die teilweise unzureichende Reinigung des rmHD5 könnte im Gelmaterial begründet sein, da durch die Beladung der Gelmaterialien mit grünem *Pichia*-Überstand die Lebenszeit des Säulenmaterials durchaus reduziert werden kann.^[168] Der Austausch von verbrauchtem Gelmaterial oder die Durchführung des Fermentationsprozesses unter Minimierung der Prozesszeit könnte durch eine verminderte Induktionsphase den Grünanteil im Überstand verringern und die Abtrennung gegebenenfalls problemlos ermöglichen. Alternativ zur verkürzten Prozesszeit könnte die Induktionskonzentration von Methanol gesenkt und somit die Bildung der Kristalloide minimiert werden.^[169] Interessanterweise konnte rmHD6 problemlos aufgereinigt werden, wobei der Grünanteil hier wesentlich geringer war. Im Rahmen dieser Arbeit erwies sich für rmHD5 ein verkürzter Fermentationsprozess nicht als Lösungsansatz der bestehenden Problematik. Eine Assoziierung des rmHD5 mit dem grünen Farbpigment kann nicht ausgeschlossen werden. Weshalb allerdings eine Vielzahl von Reinigungschargen problemlos und erfolgreich unter Abtrennung des grünen Farbpigments erfolgen konnten, während letztere durchgeführte Aufreinigung diese Problematik zum Vorschein brachten ist unklar.

Die Fermentation des mHD6 in *P. pastoris* zeigte nicht nur eine weniger intensive Grünfärbung des Überstands sondern darüber hinaus die Sedimentation dunkelgrüner Farbpigmente (Abbildung 4.2). Diese Sedimentation konnte ausschließlich in den durchgeführten Fermentationen von mHD6 beobachtet werden, während die Überstände, die das rmHD5 enthielten, homogen blieben.

Eine ähnliche Verklumpung und Sedimentation wurde erst kürzlich durch Chairatana *et al.* beschrieben, die in einem Aktivitäts-Assay des mHD6 beim Versetzen von *E. coli* und *Listeria monocytogenes* mit dem Peptid ein Zweiphasen-Gemisch mit sedimentierten Bakterien beobachteten.^[67]

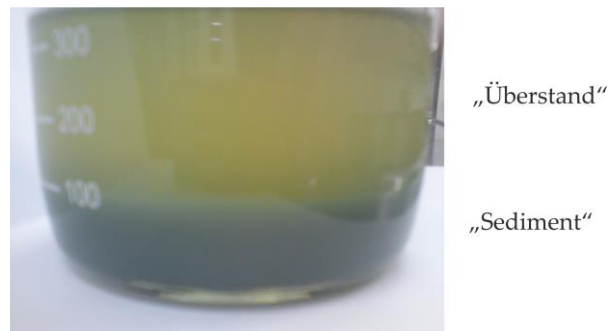


Abbildung 4.2 Eigenschaft des *Pichia*-Überstandes nach Expression von mHD6.

4.2.2.2 Reinigung der Defensine aus *Pichia*-Überständen

Beide Zielpeptide (rmHD5 und rmHD6) besitzen mit 3,6 kDa bzw. 3,7 kDa ein geringes Molekulargewicht. Der Versuch diese Peptide aus dem Überstand lediglich über eine 10 kDa-Membran zu filtrieren und so den Reinigungsprozess durch die einfache Abtrennung *Pichia*-eigener Proteine und Farbpigmente im Konzentrat zielführend zu realisieren, scheiterte vermutlich aufgrund der Tendenz der Peptide zur Oligomerisierung.^[23, 74] Für mHD5 konnte in diesem Zusammenhang z.B. eine konzentrationsabhängige „Selbst-Assoziierung“ nachgewiesen werden.^[25] Durch die Bildung von Oligomeren konnten beide Defensine, rmHD5 und rmHD6, sowohl unter Einsatz einer 10 kDa- als auch 30 kDa-Membran stets im Konzentrat, gemeinsam mit *Pichia*-eigenen Proteinen und Farbpigmenten, isoliert werden (Abbildung 3.29, Abbildung 3.60). Darüber hinaus zeigt mHD5 im Gegensatz zu mHD6 eine Lektin-ähnliche Eigenschaft glykosylierte Proteine zu binden.^[13, 25, 28] Eine Assoziierung des rmHD5 an *Pichia*-eigene Proteine im Überstand konnte im Zuge der Arbeit mittels Western Blot-Analyse, unter Einsatz spezifischer Anti-HD5-Antikörper, beobachtet werden.

Die kationischen wie auch amphiphatischen Eigenschaften der Defensine, vor allem für rmHD5, konnten innerhalb der Kationenaustauschchromatographie und Entsalzung *via* Sephadex G10 beobachtet werden. Während im Durchlauf grüne Farbpigmente und *Pichia*-eigene Proteine, die nicht an die Matrix binden, und in den Waschsritten schwach bindende Proteine abgetrennt werden sollten, konnte ein mehr oder weniger ausgeprägter Verlust des Zielpeptids, unabhängig der Säulenbeladung, beobachtet werden. Durch Assoziierung mit dem grünen Farbpigment, Multimerisierung und/oder die Bindung an glykosylierten Proteinen kann die Oberflächenbeschaffenheit und somit die Bindungsstärke

zum Säulenmaterial variieren, dadurch ein abweichendes Elutionsverhalten zeigen und folglich auch die Ladungskapazität der Säule beeinträchtigen.^[168] Unter der Zielsetzung einer Ausbeutesteigerung wäre in diesem Zusammenhang eine Aufhebung der Bindung zu *Pichia*-eigenen Proteine interessant. Diese könnte unter anderem durch die Behandlung mit PNGase F erfolgen, die in einer Deglykosylierung der *Pichia*-eigene Proteine resultiert.

Die Aufreinigung des rmHD5 und rmHD6 mittels Kationenaustauscher lieferte in der Eluatfraktion stets das Gemisch von verschiedenen prozessierten Formen. Eine Trennung wurde in der präparativen Kationenaustauschchromatographie nicht beobachtet. Die Entsalzung der Eluatfraktion konnte für beide Defensine erfolgreich über den Einsatz von Sephadex G10 durchgeführt werden, während die Entsalzung über Dialyse stets das Präzipitieren der Zielprodukte zur Folge hatte. Der gezielte Einsatz des volatilen Puffers NH₄OAc (pH 4,2) ermöglichte weiter die einfache Ankonzentrierung der Produkte über Gefriertrocknung, die als weißes Pulver erhalten werden konnten.

Bedingt durch die Lektin-ähnliche Eigenschaft des Zielpeptids rmHD5 konnte eine Interaktion des rmHD5 mit dem Gelmaterial beobachtet werden, welche durch die Erhöhung der Ionenstärke auf 100 mM NH₄OAc minimiert werden konnte und in einer Erhöhung der Ausbeute resultierte. Aufreinigungschargen, in denen die grünen Farbpigmente aus *P. pastoris* stammend nicht vollständig abgetrennt werden konnten, zeigten, im Gegensatz zu den Arbeiten von Hao *et al.*^[171], auch nach der Entsalzung über das Gelmaterial eine Verfärbung der Produktfraktion. Die Entfernung der Pigmente konnte über den Einsatz von Gelfiltrationsmaterial konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich realisiert werden.

4.2.2.3 Isolierung fehlprozessierter Defensine

Auch wenn die Affinität des rmHD5 zu Kohlenhydraten eine Herausforderungen in der Optimierung der Prozessparameter unter Erzielung maximaler Ausbeuten darstellt, konnte diese Eigenschaft zur analytischen Abtrennung der fehlprozessierten rmHD5-Formen genutzt werden.

Eine chromatographische Trennung der verschieden prozessierten rmHD5-Formen war unter Einsatz hochauflösender RP-HPLC und Kationenaustauscher, trotz Unterschiede in den isoelektrischen Punkten, nicht möglich. Aufgrund der sehr engen Molekulargewichtsverteilung ist die präparative Trennung schwierig. Dennoch konnte hierfür die Eigenschaft des rmHD5 mit dem Säulenmaterial Sephacryl (Co-Polymer bestehend aus Allyl-Dextranen und N,N'-Methylenbisacrylamid) zu interagieren genutzt und erfolgreich angewandt werden. Die Bindung von rmHD5 war teilweise so stark, dass eine vollständige „Elution“ des Produkts nicht möglich war. Ähnlich wie in der Entsalzung konnte durch Erhöhung der Ionenstärke die Interaktion minimiert und die Trennung der rmHD5-Formen zu einem sehr geringen Anteil erfolgen. Die Gelfiltration konnte aufgrund der Lektin-ähnlichen Eigenschaft des rmHD5 nicht zur präparativen Bestimmung der Molekulargewichte herangezogen werden.

Die resultierende unspezifische Interaktion von rmHD5 und dem Gelmaterial konnte, bedingt durch die Verschiebung in den Retentionszeiten, dennoch zur analytischen Abtrennung des rmHD5 von den fehlprozessierten Formen genutzt werden. Eine präparative Trennung und Isolierung des rmHD5 bleibt letzten Endes aufgrund der Bildung von Aggregaten bzw. Oligomeren dennoch eine Herausforderung.

4.2.3 Herausforderungen in der Analytik

Die Reinigung der Defensine rmHD5 und rmHD6 aus *Pichia*-Überständen über einen Chromatographieschritt lieferte vor allem für mHD5 ein sehr reines Produkt. Der Nachweis über Tricin-Gelelektrophorese und RP-HPLC lieferte für rmHD5 ausschließlich eine Proteinbande bzw. einen scharfen Peak mit einer geringen Schulter (Abbildung 4.3). Ausgehend von diesen Nachweistechiken sind fehlprozessierte Formen auf den ersten Blick nicht ersichtlich und können somit zu Fehlinterpretationen bezüglich der Reinheit des Produkts führen. Eine massenspektrometrische Analyse und/oder der Nachweis über Edman-Abbau ist daher in der rekombinanten Herstellung antimikrobieller Peptide unausweichlich und sollte bereits zu Beginn, d.h. während der Expression des Zielpeptids angewandt werden um bestehende Fehlprozessierungen zu erkennen und diesen gegebenenfalls entgegenzuwirken.

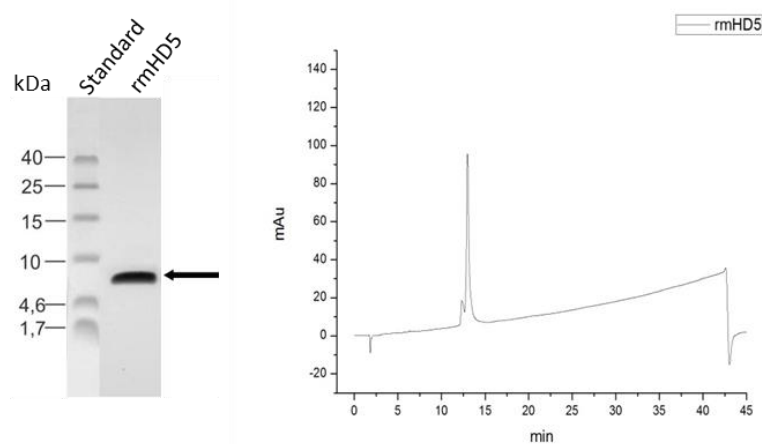


Abbildung 4.3 Tris-Tricin-Gel (16,5%) und RP-HPLC Chromatogramm des aufgereinigten und lyophilisierten Produkts rmHD5 und der fehlprozessierten Formen.

Eine weitere Problematik und Herausforderung, die sich folglich ergibt, ist die Bestimmung der Ausbeute. Mittels BCA-Bestimmung und RP-HPLC konnte die Peptidkonzentration des gereinigten Produkts rmHD5 und rmHD6 bestimmt werden, diese entspricht allerdings der Summe aller (fehl)prozessierten Formen. Eine Quantifizierung und Ausbeutebestimmung der korrekt prozessierten Form ist daher nicht möglich.

4.2.4 Antimikrobielle Aktivität des rmHD5 und fehlprozessierter Formen

Die aufgereinigten Defensine rmHD5 und rmHD6 wurden über Gefriertrocknung unter Einsatz des volatilen Puffers NH₄OAc aufkonzentriert und in Form von weißem Pulver erhalten. Beide Peptide konnten, entsprechend der in Wasser hochlöslichen Eigenschaften von Defensinen^[6], in ddH₂O vollständig gelöst und rmHD5 anschließend über CD-Spektroskopie und antimikrobielle Tests weiter charakterisiert werden.

In Wasser vorliegendes rmHD5 zeigte in Übereinstimmung mit Arbeiten durch Wanniarachchi *et al.*^[30] eine unstrukturierte Form, die durch eine membranähnliche Umgebung unter Zusatz von SDS eine strukturelle Änderung zu einer stabileren Sekundärstruktur führte (Abbildung 3.55). Der direkte Nachweis der antimikrobiellen Aktivität des hergestellten rmHD5 wurde im Rahmen dieser Arbeit gegenüber den verfügbaren Stämme wie *E. coli*, *Staphylococcus carnosus* und *Micrococcus luteus* über die Trübungs- und der CFU-Methode überprüft. Auch wenn in Arbeiten von Hsu *et al.* die antibakterielle Aktivität des rmHD5 über Agardiffusionstests nachweisbar war^[156], trotz der Affinität des mHD5 Kohlenhydrate zu binden, blieben im Rahmen dieser Arbeit antimikrobielle Nachweise über diese Methode erfolglos. Diese Methode wurde daher aufgrund der Lektin-ähnlichen Eigenschaft des mHD5 Saccharide zu binden^[13] nicht weiter angewandt. Während verschiedene Arbeitsgruppen außerdem eine Aktivität dieses Defensins gegenüber *E. coli* darstellen konnten^[41, 59, 60], zeigte sich das in dieser Arbeit hergestellte rmHD5, in Übereinstimmung mit kommerziell erworbenen synthetischen HD5, nicht aktiv gegenüber diesem Stamm.

Die Untersuchung der Bioaktivität von rmHD5 gegenüber den Stämmen *Staphylococcus carnosus* und *Micrococcus luteus* ist bisher noch nicht beschrieben. Als Kontrolle wurde das synthetische HD5 eingesetzt und mit der Bioaktivität des rmHD5 verglichen. Beide Peptide zeigten im Rahmen dieser Arbeit eine ähnliche antimikrobielle Aktivität gegenüber den beiden Stämmen, wobei die Konzentration des rmHD5 stets fehlprozessierte rmHD5-Formen beinhaltet. Ein maßgeblich negativer Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität der, durch Fehlprozessierung resultierenden zusätzlichen Aminosäuren, ist somit nicht erkennbar.

Die antimikrobielle Aktivität der Defensine ist neben der Ausbildung von Disulfidbrücken und der Tendenz zu oligomerisieren unter anderem auch durch die Nettoladung und

Diskussion

Ladungsverteilung bedingt.^[6, 54-56] Durch eine Steigerung der Ladung können die fehlprozessierten rmHD5-Formen einen positiven Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität haben. Während das Zielpeptid rmHD5 eine Ladung von +4 aufweist zeigt das Hauptprodukt „EEGVSLEKR-rmHD5“ eine geringere Ladung (+3). Eine verminderte biologische Aktivität im Vergleich zum synthetischen HD5 wird vermutlich durch das Vorliegen einer Summe an fehlprozessierter Formen, die jeweils eine gleiche (+4) oder erhöhte kationische Ladung (+5, +6) haben, ausgeglichen (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 Übersicht der berechneten Nettoladungen bei pH 7 der fehlprozessierten rmHD5

Produkt	MW (kDa)	Nettoladung
SAIAKEEGVSLEKR-rmHD5	5,078	+4
AKEEGVSLEKR-rmHD5	4,807	+4
EEGVSLEKR-rmHD5	4,608	+3
GVSLEKR-rmHD5	4,350	+5
SLEKR-rmHD5	4,193	+5
LEKR-rmHD5	4,106	+5
EKR-rmHD5	3,993	+5
KR-rmHD5	3,864	+6
R-rmHD5	3,736	+5
rmHD5	3,580	+4

Ob durch die Fehlprozessierung rmHD5-Derivate erhalten wurden, welche eine verbesserte Aktivität gegenüber den Stämmen *Staphylococcus carnosus* und *Micrococcus luteus* aufweisen und somit gegebenenfalls eine verminderte Aktivität des rmHD5 ausgleichen muss nach erfolgreicher Isolierung der einzelnen Produkte weiter untersucht werden.

Insgesamt konnte über die Expression in *P. pastoris* bioaktives rmHD5 erfolgreich hergestellt werden. Der antimikrobiellen Aktivität von Defensinen liegt eine ionischen Wechselwirkung zwischen den kationischen Peptiden und der negativ geladenen Membran zugrunde.^[172] Durch eine Erhöhung der Ionenstärke bis auf 150 mM NaCl konnte durch Porter *et al.* eine Abnahme der antimikrobiellen Aktivität gegenüber *Listeria monocytogenes* und *Salmonella typhimurium* nachgewiesen werden.^[41] Eine tendenzielle Abnahme der Aktivität unter Erhöhung der Ionenstärke konnte für rmHD5 gegenüber *Staphylococcus carnosus* im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 3.54).

Das humane α -Defensin 6 zeigte lange Zeit keine antibakterielle Aktivität und wurde oft als inaktiv bezeichnet. Inzwischen konnte die Ausbildung von faserartigen Nanonetzen des

Diskussion

mHD6 und dessen schützende Funktion gegenüber *Salmonella enterica* und *Salmonella typhimurium* nachgewiesen werden.^[28, 65] Eine antibakterielle Aktivität gegenüber Bakterien wie z.B. *E. coli* konnte ähnlich wie für hBD-1 nur unter reduzierten Bedingungen beobachtet werden.^[31] Die Überprüfung der antimikrobiellen Aktivität des rmHD6 gegenüber *E. coli*, *Staphylococcus carnosus* oder *Micrococcus luteus* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden. Ob der Einfluss der zusätzlichen Aminosäuren EEGVSLEKR (+1) einen negativen, keinen oder gar positiven Einfluss auf die Aktivität des rmHD6 hat bleibt ebenfalls weiter abzuklären.

4.3 Herausforderungen in der rekombinanten Herstellung von mHD5 und mHD6 und Einordnung der Ausbeuten

Defensine rücken aufgrund ihrer vielfältigen Wirkungsweise immer mehr in den Vordergrund aktueller Forschungsarbeiten und zeigen in ersten wissenschaftlichen Arbeiten großes Potential für den Einsatz als pharmazeutische Wirkstoffe. Gerade die rekombinante Herstellung der hierfür attraktivsten Peptide zeigt sich aktuell dennoch als besonders herausforderungsvoll. Die Herstellung von löslichen und reinen Peptiden in relevanten Ausbeuten von ~ 50-690 mg/L ist bislang nur für wenige Ausnahmen realisiert worden.^[3]

Auch wenn der Einsatz von *E. coli* für die Expression solcher Peptide aufgrund der Akkumulierung von Liposacchariden im Verlauf des Prozesses (Endotoxine) nicht uneingeschränkt geeignet für den therapeutischen Gebrauch ist ^[118] und neben seinen vielen Vorteilen auch limitierende Eigenschaften zeigt, die auch im Rahmen dieser Arbeit zu einer eingeschränkten bzw. nicht erfolgreichen Herstellung der humanen α -Defensine 5 und 6 führten, so findet dieser Wirt dennoch am häufigsten Anwendung in der erfolgreichen Herstellung antimikrobieller Peptide und liefert beispielsweise höchste Ausbeuten von bis zu 102 mg/L^[117] an reinem, bioaktiven rmHD6 (*via* Fusionsproteine).^[3]

Die Verwendung von Fusionsproteinen ist bisher die erfolgreichste Herangehensweise für die Herstellung antimikrobieller Peptide in *E. coli* und ermöglicht die Herstellung in hohen Ausbeuten.^[2, 12] Dennoch zeigt dieses Verfahren auch einige Herausforderungen, die dabei für jedes Peptid individuell untersucht und gemeistert werden müssen. Es kann unter Umständen viele Optimierungsschritte erfordern um den Prozess zu ermöglichen während eine erfolgreiche Gewinnung der bioaktiven Peptide, trotz einer löslichen Expression, nicht garantiert werden kann. ^[140] Die Etablierung eines allgemein gültigen, robusten Systems stellt daher eine enorme Herausforderung dar.

Die rekombinante Expression des humanen α -Defensins 5 durch den Einsatz von Fusionsproteinen wurde bereits durch einige Arbeitsgruppen erfolgreich durchgeführt. Auch wenn in den publizierten Ergebnissen die Herstellung und Aufreinigung von mHD5 nicht im Vordergrund standen, so sind interessanterweise lediglich Ausbeuten von 1-2 mg/L mHD5_{red}^[30] und 65 μ g/L^[173] zu verzeichnen. Die Herstellung und Aufreinigung der humanen α -Defensine (HNP-1-3, HD5 und HD6) in *E. coli* konnte durch Pazgier *et al.* ebenfalls nur mit

Diskussion

Ausbeuten von 1,5 mg/L bis 3,2 mg/L erzielt werden (mHD5_{ox}: 2,1 mg/L; mHD6_{ox}: 1,5 mg/L). Wang *et al.* gelang es erstmals die Ausbeute zur Gewinnung von mHD6 auf 102 mg/L zu steigern, ohne jedoch einen eindeutigen Hinweis auf die Ursache der löslichen Expression und dadurch deutlich gesteigerte Ausbeuten zu geben.^[117]

Durch die Fusionierung des Zielpeptids mit dem Carrier-Protein wird trotz erfolgreicher Expression nach Abtrennung des Zielpeptids über die chemische oder enzymatische Schnittstelle oft ein 2-8-facher Verlust des rekombinanten AMP beobachtet.^[2] Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Aufreinigung des löslichen trxA-His-mHD5 mit einer Ausbeute von 137 mg/L und einer theoretischen Produktivität des Zielpeptids P-mHD5_{crude} von 29 mg/L erzielt werden. Durch limitierende Einflüsse wie Präzipitationsbildungen und Degradierungen war der Verlust des rekombinanten P-mHD5 so hoch, so dass die Ausbeute an P-mHD5 letztendlich nicht exakt beziffert werden konnte. Darüber hinaus zeigte sich im letzten Reinigungsschritt das Problem einer Degradierung, so dass über LC-ESI-MS nur Fragmente des Zielpeptids im Bereich von 1-3 kDa nachweisbar waren. Die Ausbeuten von rmHD6, sowohl des Fusionsproteins trxA-His-NcoI-mHD6 als auch des *mature*-Zielpeptids, waren so gering, dass diese Herstellungsstrategie nicht weiter als zielführend verfolgt wurde.

Tandem-Proteine sind eine weitere Strategie die Expression antimikrobieller Peptide unter gleichzeitiger Ausbeutesteigerung zu ermöglichen. Die Herstellung des humanen α -Defensins 6 über Tandem-Proteine zeigte sich, trotz erfolgreicher Klonierung eines mHD6-Pentamers, weder mit noch ohne Fusionierung mit einem Carrier-Protein als erfolgreich.^[110] Die Expression von mHD6 konnte lediglich als Monomer, fusioniert mit Thioredoxin, erfolgreich durchgeführt werden. In der Natur nimmt das Prosegment im Precursor-Molekül eine wichtige Rolle für die Prozessierung der beiden Zielpeptide ein. Eine Fusionierung mit dem nativen Prosegment könnte für die rekombinante Herstellung des mHD6-Pentamers ebenfalls einen positiven Effekt haben, auch wenn mHD6 im Vergleich zu mHD5 eine geringere Ladung aufweist und damit die potentiell neutralisierende Eigenschaft des Carrier-Proteins in diesem Fall als verringert relevant zu betrachten ist. Für das humane β -Defensin-2 zeigte beispielsweise die Expression als Tandem-Protein mit dem Prosegment sogar schlechtere Ergebnisse als ohne Prosegment.^[174] Ein entsprechendes Dimer und

Tetramer konnte sogar in löslicher Form exprimiert werden, wobei mit Zunahme des Multimerisierungsgrades die Löslichkeit des Tandem-Proteins abnahm.

Aufgrund der Unterschiede in der Nettoladung zwischen mHD5 (+4) und mHD6 (+2) wurde zunächst die Arbeitshypothese aufgestellt, dass sowohl die Multimerisierung als auch die Expression für mHD6 als positiver zu bewerten ist als die äquivalente Expression von mHD5. Auch wenn daher vermutet wurde, dass die Methodik der Tandem-Proteine als die Strategie der Wahl besonders für mHD6 Anwendung findet, zeigte sich dagegen mHD5 als ein guter Kandidat für die Fusionierung von n -Peptideinheiten. Die erfolgreiche Klonierung und Expression von mHD5 als Tandem-Proteine wurden erstmals in Vorarbeiten im Rahmen von Studien- und Diplomarbeiten am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart ^[102, 103] durchgeführt und sind in der Literatur bisher nicht bekannt. Für die erfolgreich klonierten Konstrukte konnte innerhalb der Zunahme des Multimerisierungsgrades ($n=2-4$) der mHD5 Tandem-Proteine keine Abnahme der Expressionsrate beobachtet werden, obwohl in der Literatur häufig eine Abnahme beschrieben wird.^[175-178] In diesen Fällen konnten jedoch häufig deutlich höhere Multimerisierungsprodukte ($n \geq 4$) erfolgreich kloniert werden, die jedoch nicht zwingend in einer erhöhten Expressionsrate resultierten.

Ausgehend vom Fermentationsprodukt konnte die Expression des mHD5 in Form eines Tetramers mit sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Mit einer Ausbeute an löslichen mHD5-Tetramer von 2,85 g/L ($\pm 10\%$) kann unter geeigneter Optimierung im Downstream-Verfahren das mHD5-Monomer mit einer theoretische Ausbeute von 2,02 g/L P-mHD5-D erhalten werden. Trotz weiterer möglicher hoher Ausbeuteverluste durch Rückfaltungsschritte^[92] ist mit diesem Verfahren die Grundlage einer genügend hohen Ausbeute an Zielpeptid gelegt.

Bei der Gewinnung des löslichen Zielproteins ausgehend der *inclusion bodies* wird der größte Verlust (49%) an unlöslicher Fraktion im Zuge des Zellaufschlusses und anschließender Waschschriffe beobachtet. Trotz des hohen Verlustes konnte durch optimierte Solubilisierung mit N-Lauroylsarcosine bei einem vergleichsweise hohem pH-Wert von 11 eine fast vollständige Solubilisierung (94%) der unlöslichen Fraktion und eine hohe Ausbeute an löslichem HD5-Tetramer erzielt werden. Interessanterweise konnte das Fusionsprotein trxA-His-NcoI-mHD6 nur mit einer sehr geringen Ausbeute (5-9%) unter den gleichen Bedingungen solubilisiert werden.

Auch wenn die Expression in löslicher Form für eine kosten- und zeitgünstige Etablierung des Herstellungsprozesses wünschenswert wäre, stellt die Expression des mHD5 als Tandem-Protein ein neues, vielversprechendes Herstellungsverfahren dar, welches bedingt durch einige offene Fragestellungen und bestehende Herausforderungen noch zu optimieren bleibt.

Bisher sind für mHD5 die höchsten Ausbeuten über die Expression in *P. pastoris* beschrieben. Die rekombinante Herstellung des mHD5 in *P. pastoris* wurde bisher von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht, wobei durch Hsu *et al.* dies nur im 50 mL Kulturansatz im Schüttelkolben verfolgt und realisiert wurde. Die Expression des mHD5 erfolgte dabei mit demselben wie in dieser Arbeit verwendeten *P. pastoris* Stamm X-33 jedoch unter Verwendung eines anderen Vektors pGAPZ α A.^[156] Die Aufarbeitung durch die Arbeitsgruppe von Hsu *et al.* wurde lediglich durch die Filtration des Überstandes über eine 10 kDa-Membran mit einer Ausbeute von 1 mg/L an bioaktivem rmHD5 im Filtrat durchgeführt. Ein Verlust des Peptids, das zur Oligomerisierung neigt und somit vermutlich, wie im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, im Konzentrat zu finden sein müsste, wird jedoch nicht beschrieben. Das Vorhandensein einer Doppelbande konnte durch die Arbeitsgruppe von Hsu *et al.* ebenfalls nachgewiesen werden, diese wurde jedoch im Vorliegen einer O-glykosylierten Form des mHD5 vermutet.

Durch die Fermentation von *P. pastoris* GS115, transformiert mit dem Vektor pPIC9K-mHD5, gelang es der Arbeitsgruppe Wang *et al.* wesentlich höhere Ausbeuten von 169 mg/L an rmHD5_{crude} nach zwei Tagen Induktion im Überstand zu erzielen.^[101] Über zwei Chromatographie-Schritte konnte die Arbeitsgruppe gereinigtes rmHD5, das bioaktiv und in der korrekten nativen Sequenz ohne zusätzliche Aminosäuren vorlag, mit einer Ausbeute von 50% (83 mg/L) herstellen. Dazu wurde das Codon-optimierte Gen, codierend für *mHD5*, an den C-Terminus der Kex2-Schnittstelle über Red/ET Rekombination kloniert. Die Schnittstelle Ste13 wurde entsprechend, wie im Rahmen dieser Arbeit, deletiert. Trotz ähnlichem Aufbau der Expressionskassette und Fermentationsbedingungen gelang es Wang *et al.* korrekt prozessiertes rmHD5 herzustellen.

Die Expressionsausbeuten des humanen α -Defensins 5 konnte im Rahmen dieser Arbeit weiter gesteigert werden. Im Wachstumsverlauf der *P. pastoris* Kultur, die mit pPICZ α A-mHD5 transformiert wurde, in dem das Gen *mHD5* am C-Terminus der Kex2-Schnittstelle

kloniert wurde, konnte kein Abbau des sekretierten Peptids beobachtet werden. Die Durchführung der Fermentationen wurde daher nicht nach zwei oder vier Tagen beendet, sondern so lange weitergeführt, bis das Medium ausgeschöpft war. Um den Prozess und die Ausbeuten weiter zu optimieren konnte der Fed-Batch-Prozess erfolgreich in einen Repeated Fed-Batch-Prozess überführt werden, so dass durch Entnahme von Teilernten und Zugabe von frischem Medium zur Fermentationskultur der Prozess über einen längeren Zeitraum fortgeführt und somit die Voraussetzungen für einen kontinuierlichen Prozess gezeigt werden konnten. Der Fermentationsprozess zeigte sich sowohl als Fed-Batch- als auch als Repeated Fed-Batch-Prozess als robust und ermöglichte die Herstellung von $458 \text{ mg/L} \pm 50 \text{ mg}$ (Repeated Fed-batch) bis $591 \text{ mg/L} \pm 83 \text{ mg}$ (Fed-batch) bzw. $2598 \pm 286 \text{ mg}$ bis $2897 \pm 406 \text{ mg}$ an $\text{rmHD5}_{\text{crude}}$. Durch ein 6-faches Upscaling konnten vergleichbare Ausbeuten ($496 \text{ mg/L} \pm 40 \text{ mg}$ bzw. 13253 mg) erreicht und die Robustheit des Prozesses auch für relevante Mengen erfolgreich gezeigt werden.

Das humane α -Defensin 5 konnte nach Ankonzentrierung und anschließender Reinigung über Kationenaustauschchromatographie mit einer Ausbeute von 49% gewonnen werden, welches insgesamt, abhängig vom Fermentationsprozess und -dauer, bis zu $290 \text{ mg/L} \pm 41 \text{ mg}$ an gereinigtem und bioaktivem rmHD5 entsprechen. Ein direkter Vergleich mit den Ausbeuten durch Wang *et al.* (83 mg/L rmHD5) kann aufgrund der aufgetretenen Fehlprozessierung und nicht möglichen Quantifizierung des heterologen Gemisches jedoch nicht gezogen werden.

Die Herstellung des humanen α -Defensins 6 über den Expressionswirt *P. pastoris* ist *bis dato* nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte $\text{rmHD6}_{\text{crude}}$ erstmals in *P. pastoris* mit einer Ausbeute von 51 mg/L und nach Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie mit einer Ausbeute von 27 mg/L hergestellt werden. Ähnlich wie rmHD5 liegt das rekombinant hergestellte rmHD6 als eine Mischung von korrekt prozessiertem rmHD6 (Hauptprodukt) und der fehlprozessierten Form „EEGVSLEKR- rmHD6 “ (Nebenprodukt) vor. Auch wenn diese Ausbeuten vergleichsweise gering erscheinen, so konnte *P. pastoris* für die Herstellung von rmHD6 erstmals als ein neues, vielversprechendes Expressionssystem erfolgreich dargestellt werden.

4.4 Ausblick

Die Herstellung von rmHD5 über Tandem-Proteine in *E. coli* bietet mit den in dieser Arbeit erstmals erzielten Ausbeuten von 2,85 mg/L an rmHD5-Tetramer ein neues Herstellungsverfahren des rmHD5 als „P-mHD5-D“. Für eine weiterführende Entwicklung dieser Methode muss die Aufarbeitung des Peptids, das in Form von *inclusion bodies* aus *E. coli* gewonnen wird, weiter untersucht und optimiert werden. Weiterhin muss der Einfluss der zwei zusätzlichen Aminosäuren Prolin und Asparaginsäure auf die Struktur und die Funktion des Zielpeptids mHD5 geklärt werden. Durch das Herstellungsverfahren über Tandem-Proteine kann die Herstellung des Zielpeptids in der nativen Aminosäuresequenz zwar nicht erfolgen, doch bietet es die Möglichkeit modifizierte Peptide in hohen Ausbeuten zu generieren. Da der antimikrobiellen Aktivität der Defensine oft deren Oligomerisierung zugrunde liegt, wäre die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität des rmHD5-Tetramers selbst, sowohl in reduzierter als auch oxidiertes Form, interessant.

Die Herstellung der Defensine mHD5 und mHD6 über Fusionsproteine zeigte sich, auch wenn die Toxizität der Peptide neutralisiert und die Expression in *E. coli* erfolgreich realisiert werden konnte, als anspruchsvoll in der Aufarbeitung.

Insgesamt wäre der Einfluss einer Codon-optimierten Sequenz auf die Expression sowohl für die Fusions- als auch Tandem-Proteine, die teilweise einen bis zu neunmal höheren Expressionslevel ermöglichen^[122, 125], interessant. Für die Minderung bzw. Vermeidung des Anteils an *inclusion bodies* könnten Untersuchungen zur Prozessoptimierungen durch Co-Expression von Chaperonen, die Zugabe von z.B. Sorbitol, oder Sucrose in das Nährmedium oder die Wahl eines geeigneten Carrier-Proteins zielführend sein.^[118, 140] SUMO-Fusionsproteine haben sich bereits für die lösliche Expression einiger Proteine als vorteilhaft bewährt.^[147] Die Abspaltung des Zielproteins erfolgt hier ohne N-terminale Aminosäuren und bietet somit einen weiteren Vorteil eines Einsatzes dieses Fusionsproteins. Stabilitäts- und Degradierungsprobleme können aufgrund von Fehlfaltungen des Zielpeptids herrühren. Die zusätzliche Fusionierung des Prosegments zum Carrier-Protein kann zur Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken und Faltung beitragen und so die Zielproteine vor der Proteolyse schützen.^[97, 179]

Eine alternative und neue Strategie zur Herstellung toxischer und antimikrobieller Peptide in *E. coli* könnte die Maskierung des Peptids in einem Proteinkapsid bieten.^[180, 181] Über

zielgerichtete Evolution könnten co-exprimierte Proteinkapside, die durch gezielte Mutation mit negativ geladenen Aminosäuren modifiziert wurden, dazu genutzt werden über elektrostatische Wechselwirkung mit kationischen antimikrobiellen Peptiden zu interagieren und deren Expression in nativer Form zu ermöglichen.

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl für mHD5 als auch erstmals für mHD6 die Expression in *P. pastoris* ermöglicht werden. Die Expressionsrate könnte durch Codon-Optimierung und/oder durch die Integrierung multipler Gen-Kopien in der Expressionskassette weiter optimiert und auf eine potentiell erhöhte Ausbeute hin untersucht werden.^[93, 182] Da eine Codon-Optimierung neben einer Steigerung der Expression ebenfalls zu einer Verbesserung der Prozessierung führen kann, könnte gleichermaßen die Problematik der Fehlprozessierung unter Umständen behoben werden. Ob diese Optimierung die entscheidende Lösungsstrategie und im Falle des mHD6 unter Umständen zu einer erfolglosen Expression führen kann, bleibt weiter zu untersuchen.

Auch wenn die Expression der beiden Defensine mHD5 und mHD6 in *P. pastoris* unter anderem zur Sekretion fehlprozessierter Formen geführt hat, für dessen heterologes Gemisch für rmHD5 eine vergleichbare Aktivität im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, könnten diese neuen „Derivate“ auf ihre antimikrobielle Aktivität hin überprüft werden und modifizierte, neue, potente antimikrobielle Peptide bilden. Die Aktivität des rmHD6 und dessen „Derivat“ sollte unter reduzierten und oxidierten Bedingungen untersucht werden.

In Anbetracht der vielfältigen Herausforderungen wie z.B. Stabilitäts- und Degradierungsproblematiken, *inclusion bodies* oder fehlprozessierten Produkten, die in der Herstellung der Defensine mHD5 und mHD6 zu zeit- und kostenintensiven Optimierungsversuchen führen, wäre die Expression der Defensine in einem anderen Expressionssystem, wie z.B. dem Baculoviren-Insektenzellen-Expressionssystem, ebenfalls interessant und zielgerichtet zu überprüfen.

5 Zusammenfassung

Aufgrund ihrer multifunktionellen Eigenschaften, die von antimikrobiell, antiviral und antifungizid bis zu chemotaktisch reichen, besitzen Defensine ein großes Potential als therapeutische Agenzien in der Behandlung von Infektionen.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin die humanen α -Defensine 5 und 6, deren Mangel für die Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine entscheidende Rolle spielt, rekombinant in großen Mengen herzustellen. Beide Defensine werden in den epithelialen Paneth-Zellen als eine inaktive Precursor-Form gespeichert und nach enzymatischer Spaltung durch Trypsin als aktive Form ins intestinale Lumen sekretiert. Das humane α -Defensin 5 zeigt eine breites antimikrobielles Spektrum und umfasst neben *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* und *Candida albicans* auch weitere humanpathogene Stämme während das humane α -Defensin 6 durch die Bildung von faserartigen Nanonetzen Mikroorganismen wie *Salmonella enterica* und *Salmonella typhimurium* umhüllt und erst als reduzierte Form antibakteriell z.B. gegen *Escherichia coli*, *Bifidobacterium adolescentis* und *Streptococcus thermophilus* wirkt.

Die Herstellung der Defensine sollte in den gängigen Expressionssystem *E. coli* und *P. pastoris* durchgeführt werden. Die Herstellung der Defensine zeigte sich als herausforderungsvoll, zeit- und kostenintensiv, so dass deren Etablierung für einen robusten Herstellungsprozess nicht uneingeschränkt realisierbar war.

Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit *mature* HD5 (mHD5) erstmals in Form eines rekombinanten mHD5-Tetramers in hohen Ausbeuten in *E. coli* exprimiert werden. Die Aufarbeitung dieses Tetramers unter Gewinnung des Monomers gestaltete sich bisher als schwierig und bedarf weiterer Optimierungsarbeiten. Die Herstellung desselben Defensins in *P. pastoris* dagegen lieferte nach Aufkonzentrierung über Tangentialflussfiltration über Kationenaustauschchromatographie bioaktives rmHD5 in Ausbeuten bis zu 290 mg/L, dessen Produktverteilung neben korrekt prozessierten rmHD5 auch fehlprozessierte rmHD5-Formen mit zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus des Peptids aufwies. Trotz ausgiebiger Versuche in der Prozessoptimierung und chromatographischer Reinigungsmethoden gelang im Rahmen dieser Arbeit die Trennung dieser Nebenprodukte nicht. Das Produktgemisch, bestehend aus rmHD5 und verlängerten rmHD5-Peptiden, zeigte sich in

Zusammenfassung

antimikrobiellen Tests gegen *Staphylococcus carnosus* und *Micrococcus luteus* als vergleichbar aktiv mit dem synthetischen HD5.

Die Expression des *mature* HD6 (mHD6) konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals in *P. pastoris* erfolgreich durchgeführt werden und wurde über massenpektrometrische sowie immunologische Analysen nachgewiesen. Das rekombinante mHD6 konnte mit 51 mg/L in das Medium sekretiert und anschließend nach Aufkonzentrierung über Tangentialflussfiltration über Kationenaustauschchromatographie mit einer Ausbeute von 27 mg/L aufgereinigt werden.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass sich weitere Arbeiten mit der gezielten Herstellung dieser Defensine unter Optimierung und weiterführenden Untersuchungen der Problematiken beschäftigen sollten um zukünftig die Vielfalt an biologisch aktiven Peptiden als Alternative zu herkömmlichen Antibiotika oder als Therapeutika zu erweitern.

Summary

Due to their multifunctional properties including antimicrobial, antiviral and antifungal as well as chemotactic activities, defensins demonstrate a significant potential as therapeutic agents in the treatment of infections. Furthermore, a diminished expression of the human α -defensin 5 and 6 is associated with chronic inflammatory bowel disease. Both defensins are expressed and stored as an inactive precursor molecule in the epithelial Paneth cells and are then secreted as an active peptide into the intestinal lumen after enzymatic digestion by trypsin. The human α -defensin 5 (mHD5) shows a broad antimicrobial spectrum including *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans* as well as other pathogen strains. In contrast to mHD5, the human α -defensin 6 (mHD6) self-assembles into extracellular nanonets to entrap *Salmonella enterica* and *Salmonella typhimurium* and shows antibacterial activity against the strains *Escherichia coli*, *Bifidobacterium adolescentis* and *Streptococcus thermophiles* only under reduced conditions.

This work's objective was the development of a high yield production process for recombinant human α -defensins 5 and 6.

The production of the defensins should be performed in the common and well established expression systems *E. coli* and *P. pastoris*. The production of these defensins proved to be challenging as well as time and cost consuming so that the establishment of a robust production process was not unrestricted and feasible.

Nevertheless, within this work a high yield production process of recombinant *mature*-HD5 (mHD5) as a multimeric form, mHD5-tetramer, in *E. coli* could successfully be developed for the first time. The protein purification of the tetramer to further isolate the monomer turned out to be as challenging as the production process and needs to be further optimized for a higher yield in general as well as a potential transfer into pharmaceutical application. The production of mHD5 by using the expression system *P. pastoris* led to the bioactive, purified rmHD5 with a yield up to 290 mg/L after concentration via tangential flow filtration and cation exchange. Product distribution showed correctly processed mHD5 but also elongated forms of rmHD5 with additional amino acids at the N-terminus as a side product. Many attempts have been made for process optimisation and chromatographic isolation to achieve

Summary

a completely correct processed mHD5, but none of them have led to a solution to this problem.

Regardless, the product rmHD5, consisting of correctly processed rmHD5 and elongated rmHD5 forms, showed antimicrobial activity against *Staphylococcus carnosus* and *Micrococcus luteus* comparable to synthetic HD5.

The expression of *mature* HD6 (mHD6) in *P. pastoris* was successfully performed within this work, proved by using immunologic and mass-spectrometric analysis. This is the first report of the expression of mHD6 in *P. pastoris*, the recombinant mHD6 was successfully secreted into the medium with a yield of 51 mg/L and concentrated via tangential flow filtration. Purified rmHD6 has been obtained by protein purification using cation exchange with a yield of 27 mg/L.

To summarize, the production of these defensins should be further investigated under the scope of process optimization and an intensified investigation of the fundamental difficulties should be performed. A successful trouble shooting of these topics should allow broadening the platform of biological active peptides and prospectively facilitating these active peptides as an alternative for commercial antibiotics or as therapeutics.

6 Appendix

6.1 Sequenzen

Die Gene codierend für die humanen α -Defensine 5 (Prepro-HD5 und HD5) und 6 (HD6) wurden ausgehend von der Gesamt-RNA, die vom Robert-Bosch Krankenhaus, Stuttgart bereitgestellt wurde, erhalten.^[99] Dazu wurde jeweils über eine reverse Transkription die jeweilige cDNA hergestellt und mit den sequenzspezifischen Primern die Gene über PCR erhalten.

6.1.1 Nukleotidsequenz des Pro-Defensins 5 (HD5)

```
ATGAGGACCATCGCCATCCTTGCTGCCATTCTCCTGGTGGCCCTGCAGGCCCAGGCT
GAGTCACTCCAGGAAAGAGCTGATGAGGCTACAACCCAGAAGCAGTCTGGGGAAG
ACAACCAGGACCTTGCTATCTCCTTTGCAGGAAATGGACTCTCTGCTCTTAGAACCTC
AGGTTCTCAGGCAAGAGCCACCTGCTATTGCCGAAGTGGCCGTTGTGCTACCCGTGA
GTCCCTCTCCGGGGTGTGTGAAATCAGTGGCCGCCTCTACAGACTCTGCTGTCGCTGA
```

6.1.1.1 Aminosäuresequenz des HD5

```
MRTIAILAAILLVALQAQAESLQERADEATTQKQSGEDNQDLAISFAGNGLSALRTSGSQ
ARATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
```

6.1.2 Nukleotidsequenz des humanen α -Defensins 5 (mHD5)

```
GCCACCTGCTATTGCCGAAGTGGCCGTTGTGCTACCCGTGAGTCCCTCTCCGGGGTGT
GTGAAATCAGTGGCCGCCTCTACAGACTCTGCTGTCGCTGA
```

6.1.2.1 Aminosäuresequenz des mHD5

```
ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR
```

6.1.3 Nukleotidsequenz des humanen α -Defensins 6 (mHD6)

```
GCTTTCACCTTGCCATTGCAGAAGGTCCTGTTATTCAACAGAATATTCCTATGGGACCT
GCACTGTCATGGGTATTAACCACAGATTCTGCTGCCTCTGA
```

6.1.3.1 Aminosäuresequenz des mHD6

AFTCHCRRSCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL

6.1.4 Nukleotidsequenz von Thioredoxin (trxA)

ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTTGACACGGATGTA
ACTCAAAGCGGACGGGGCGATCCTCGTCGATTTCTGGGCAGAGTGGTGC
GGTCCGTGCAAATGATCGCCCCGATTCTGGATGAAATCGCTGACGAATAT
CAGGGCAAACCTGACCGTTGCAAACCTGAACATCGATCAAACCCCTGGC
ACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCCGACTCTGCTGCTGTTCA
AAAACGGTGAAGTGGCGGCAACCAAAGTGGGTGCAC TGTCTAAAGGTC
AGTTGAAAGAGTTCCTCGACGCTAACCTGGCGTAA

6.1.4.1 Aminosäuresequenz von Thioredoxin (trxA)

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEY
QGKLTVAKLNI DQNPGTAPKYGIRGIPTLLLKNGEVAATKVGALS
KGQLKEFLDANLA

6.2 Massenspektrogramme der Referenzen HD5 und HD6

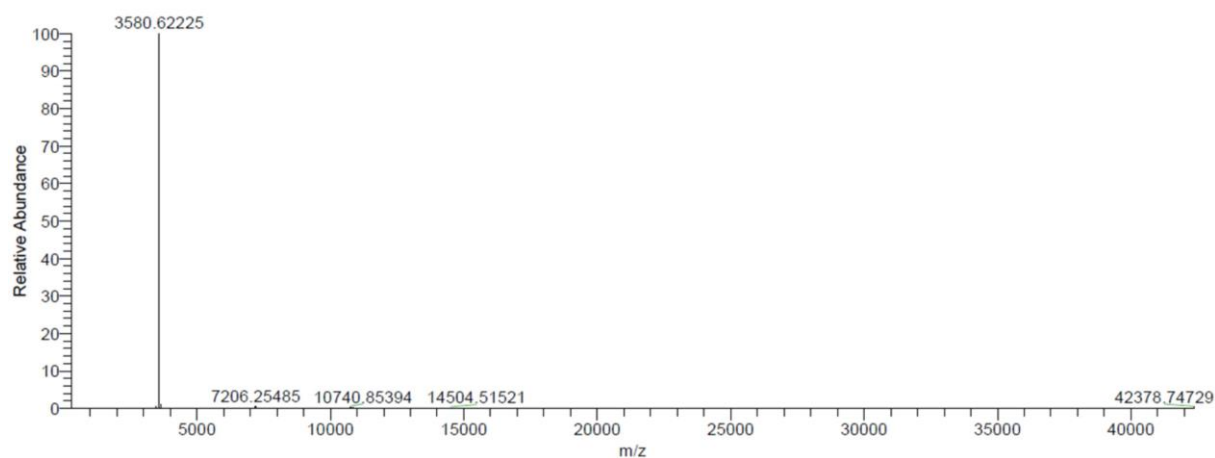


Abbildung 6.1 LC-ESI-MS-Messung des synthetischen HD5.

Die Messung und Darstellung der Abbildung erfolgte durch das Life Science Center, Universität Hohenheim (Stuttgart).

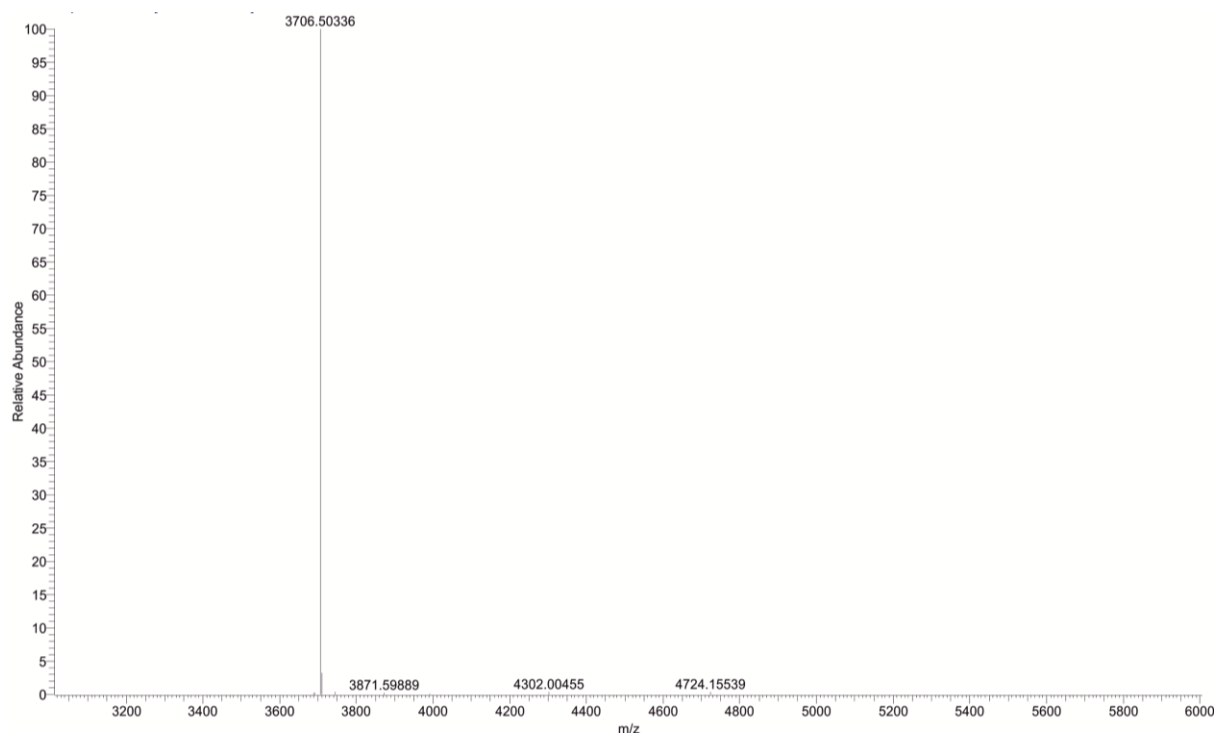


Abbildung 6.2 LC-ESI-MS-Messung des synthetischen HD6.

Die Messung und Darstellung der Abbildung erfolgte durch das Life Science Center, Universität Hohenheim (Stuttgart).

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Aminosäuresequenz der humanen α -Defensine.....	3
Abbildung 1.2	Aminosäuresequenz des HD5 (Prepro-Form).....	5
Abbildung 1.3	Prozessierung und Sekretion des humanen Panethzell-Defensins HD5.....	6
Abbildung 1.4	Wirkungsweise des humanen α -Defensins 6.	10
Abbildung 1.5	Schematische Darstellung der drei Modelle zur Beschreibung der Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide. ^[72]	13
Abbildung 3.1	Agarosegel-Elektrophorese (1%) nach der QuikChange®-Reaktion zur Insertion des His ₆ -Tags in pET-22b(+)_trxA_mHD5.	64
Abbildung 3.2	Schematische Darstellung der Expressionskassette des trxA-His-mHD5.	64
Abbildung 3.3	Agarosegel-Elektrophorese des Plasmids pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD5 nach Restriktionsverdau mit <i>NcoI</i> (a) und des PCR-Produktes <i>mHD6</i>	65
Abbildung 3.4	Schematische Darstellung der Expressionskassette des Fusionsproteins trxA-His-NcoI-mHD6.	66
Abbildung 3.5	Schematische Übersicht der Klonierung von pET-22b(+)_trxA_His_mHD5 und pET-22b(+)_trxA_His_NcoI_mHD6.....	67
Abbildung 3.6	Expression der Fusionsproteine trxA-His-mHD5 und trxA-His-NcoI-mHD6 in <i>E. coli</i> C41(DE3).	68
Abbildung 3.7	Darstellung der löslichen und unlöslichen Fraktionen der Fusionsproteine von mHD5 und mHD6 nach Zellaufschluss.	69
Abbildung 3.8	Stabilitätsproblem des löslichen Fusionsprotein trxA-His-mHD5.....	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.9 Aufreinigung des löslichen Fusionsproteins trxA-His-mHD5 über IMAC.	71
Abbildung 3.10 Chemische Proteolyse des Fusionsproteins trxA-His-mHD5 mit Ameisensäure und anschließende Dialyse.	75
Abbildung 3.11 Aufreinigung des Zielpeptids P-mHD5 über Ni ²⁺ -Affinitäts- und Kationenaustauschchromatographie.....	77
Abbildung 3.12 Solubilisierung des Fusionsproteins trxA-His-NcoI-mHD6 aus <i>inclusion bodies</i>	78
Abbildung 3.13 Solubilisierung des Fusionsproteins trxA-His-mHD5 aus <i>inclusion bodies</i>	80
Abbildung 3.14 Fällung und Verdau des Fusionsproteins trxA-His-NcoI-mHD6.	81
Abbildung 3.15 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für das mHD5-Tetramer.	83
Abbildung 3.16 Schematische Darstellung des Aufbaus des mHD5-Tetramers.	84
Abbildung 3.17 Fermentation des mHD5-Tetramers in <i>E. coli</i> C41(DE3).....	85
Abbildung 3.18 Aufarbeitung und Solubilisierung des mHD5-Tetramers aus <i>inclusion bodies</i>	86
Abbildung 3.19 Darstellung des Zielpeptids nach saurer Hydrolyse des mHD5-Tetramers.	89
Abbildung 3.20 Solubilisierung und Fällung des mHD5-Tetramers mit Isopropanol.	90
Abbildung 3.21 Verdau des mHD5-Tetramers mit Ameisensäure.	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.22 RP-HPLC des proteolytischen Verdaus von mHD5-Tetramer mit Ameisensäure.....	91
Abbildung 3.23 Aufreinigung des denaturiert-reduzierten P-mHD5-D über IMAC.....	92
Abbildung 3.24 Darstellung des möglichen Produktspektrums nach saurer Hydrolyse von mHD5-Tetramer.	93
Abbildung 3.25 Schematische Darstellung der verwendeten Expressionskassetten für Prepro-HD5 (HD5) und <i>mature</i> -HD5 (mHD5) im Expressionsvektor pPICZ α A unter Kontrolle des AOX1-Promotors.	96
Abbildung 3.26 Wachstumsverlauf der Fed-Batch-Fermentation von mHD5 in <i>P. pastoris</i> X-33 im 4 L-Maßstab.	98
Abbildung 3.27 Expressionszunahme des rmHD5 in <i>P. pastoris</i>	99
Abbildung 3.28 Wachstumsverlauf der Expression von rmHD5 in <i>P. pastoris</i> über einen Repeated Fed-Batch-Prozess im 5 L-Maßstab.	100
Abbildung 3.29 Coomassie gefärbte Tris-Tricin-Gele (16,5%) des Captures von rmHD5 (3,58 kDa) über eine (a) 10 kDa- und (b) 30 kDa-Membran.	102
Abbildung 3.30 Screening des Säulenmaterials für die Aufreinigung von rmHD5 über Kationenaustauschchromatographie.....	105
Abbildung 3.31 Wachstumsverlauf von <i>P. pastoris</i> während der Expression von rmHD5 im 25 L-Maßstab (a) und 20 L-Maßstab (b).	106
Abbildung 3.32 Coomassie gefärbte Tris-Tricin-Gele (16,5%) der Expression von mHD5 (3,58 kDa) in <i>P. pastoris</i> im 25 L-(a) und 20 L-Maßstab (b).	107
Abbildung 3.33 Vergleich der Gesamtausbeute der sekretierten und aufkonzentrierten rmHD5 _{crude} und Gesamtproteine nach 113 h bzw. 216 h Fermentationen in <i>P. pastoris</i>	109

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.34	Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) (a) und Western Blot (b) der Fermentation und Capture des rmHD5 im 20 L-Maßstab.....	110
Abbildung 3.35	Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) der Aufreinigung des rmHD5 über Ionenaustauschchromatographie (Toyopearl SP-650M) und anschließender Entsalzung (Sephadex G10).....	114
Abbildung 3.36	Entsalzung des rmHD5 über Sephadex G10 mit 20 mM NH ₄ OAc (a) und 100 mM NH ₄ OAc (b).....	115
Abbildung 3.37	Analytische RP-HPLC des aufgereinigten und lyophilisierten rmHD5... 118	
Abbildung 3.38	Vergleich der über RP-HPLC aufgetrennten rmHD5 mit synthetischem HD5 (a) und Ausschnitt aus dem Chromatogramm zur Darstellung der Retentionszeitabweichung (b).	119
Abbildung 3.39	Massenspektrometrischer Nachweis des rmHD5 über LC-ESI-MS.....	120
Abbildung 3.40	Übersicht der verlängerten Aminosäuresequenzen des falsch prozessierten rekombinanten rmHD5.....	121
Abbildung 3.41	Wachstumsverlauf der Fermentation von rmHD5 in <i>P. pastoris</i> bei 17°C und Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) und Western Blot-Analyse des aufgereinigten rmHD5.....	123
Abbildung 3.42	Sauerstofflimitierende und nicht-limitierende Fermentation von mHD5 in <i>P. pastoris</i> X-33 zur Untersuchung des Sauerstoffeinflusses auf die Prozessierung des rmHD5.	125
Abbildung 3.43	Wachstumsverläufe der Expression mHD5 in <i>P. pastoris</i> in Minimal- und Komplexmedium mit und ohne Sauerstoffbegasung.	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.44	Massenspektrometrische MALDI-TOF-Analyse der exprimierten und aufgereinigten Produkte der Fermentation von rmHD5 in <i>P. pastoris</i> in Basalsalzmedium und Komplexmedium unter bzw. ohne Sauerstoffbegasung.	127
Abbildung 3.45	Gesamtprozessausbeuten an rmHD5 _{crude} im Konzentrat der Überstände aus Fermentationsprozessen zur Untersuchung des Einflusses von Medium und Sauerstoffbegasung auf die Produktverteilung.	129
Abbildung 3.46	Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) (a) und Western Blot (b) des proteolytischen Verdaus von Prepro-HD5 mit Trypsin.	131
Abbildung 3.47	Coomassie gefärbtes Tris-Tricin Gel (16,5%) (a) und Western Blot (b) der Aufreinigung des proteolytisch <i>in vitro</i> verdauten Prepro-HD5 mit Trypsin.	132
Abbildung 3.48	Trennung fehlprozessierter rmHD5-Peptide über die präparative SEC. .	135
Abbildung 3.49	Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) der Auftrennung des aufgereinigten rmHD5 über Sephacryl S-200.	136
Abbildung 3.50	Massenspektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF der Fraktionen der Größenausschlusschromatographie zur Trennung fehlprozessierter rmHD5.	137
Abbildung 3.51	Antimikrobielle Aktivität des synthetischen und rekombinanten humanen α -Defensins 5 gegen <i>M. luteus</i>	139
Abbildung 3.52	Antimikrobielle Aktivität des synthetischen und rekombinanten humanen α -Defensins 5 gegen <i>S. carnosus</i> TM300.	140
Abbildung 3.53	Antimikrobielle Aktivität des synthetischen und rekombinanten humanen α -Defensins gegen <i>S. carnosus</i> TM300.	141

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.54 Antimikrobielle Aktivität des synthetischen und rekombinanten humanen α -Defensins gegen <i>S. carnosus</i> TM300 in MHB-Medium über 24 h in An- und Abwesenheit von Salz.....	142
Abbildung 3.55 CD-Spektrum des rekombinanten humanen α -Defensins in Ab- und Anwesenheit von SDS (1%).....	144
Abbildung 3.56 Agarosegel der Kolonie-PCR zur Überprüfung der Insertion des <i>mHD6</i> -Gens in die genomische DNA von <i>P. pastoris</i>	146
Abbildung 3.57 Fermentation von <i>mHD6</i> in <i>P. pastoris</i> X-33 im 4 L-Maßstab.	147
Abbildung 3.58 Wachstumsverlauf der Expression von <i>mHD6</i> in <i>P. pastoris</i>	148
Abbildung 3.59 Nachweis der Expression von <i>mHD6</i> und Zunahme der <i>mHD6</i> -Konzentration in <i>P. pastoris</i> X-33 über RP-HPLC.	148
Abbildung 3.60 Nachweis des <i>rmHD6</i> im Konzentrat des Fermentationsüberstandes. ...	150
Abbildung 3.61 Nachweis des <i>rmHD6</i> im Konzentrat des Fermentationsüberstandes über MALDI-TOF.....	151
Abbildung 3.62 Coomassie gefärbtes Tris-Tricin-Gel (16,5%) der Aufreinigung des <i>rmHD6</i> über Ionenaustauschchromatographie (Toyopearl SP-650M).	152
Abbildung 3.63 Auftrennung des aufgereinigten rekombinanten (<i>rmHD6</i>) und des synthetischen <i>HD6</i> über RP-HPLC.....	155
Abbildung 3.64 Ausschnitt aus dem RP-HPLC-Chromatogramm (Abbildung 3.63) zur Veranschaulichung der Auftrennung des <i>rmHD6</i>	156
Abbildung 3.65 Massenspektrometrischer Nachweis des <i>rmHD6</i> über LC-ESI-MS.....	157

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.1	Übersicht der Herstellungswege der humanen α -Defensine 5 und 6 in <i>E. coli</i>	175
Abbildung 4.2	Eigenschaft des <i>Pichia</i> -Überstandes nach Expression von mHD6.....	183
Abbildung 4.3	Tris-Tricin-Gel (16,5%) und RP-HPLC Chromatogramm des aufgereinigten und lyophilisierten Produkts rmHD5 und der fehlprozessierten Formen.	186
Abbildung 6.1	LC-ESI-MS-Messung des synthetischen HD5.	203
Abbildung 6.2	LC-ESI-MS-Messung des synthetischen HD6.	203

8 Literaturverzeichnis

- [1] R. I. Lehrer, T. Ganz, *Curr Opin Immunol* **1999**, *11*, 23-27.
- [2] N. S. Parachin, K. C. Mulder, A. A. Viana, S. C. Dias, O. L. Franco, *Peptides* **2012**, *38*, 446-456.
- [3] O. N. Silva, K. C. Mulder, A. E. Barbosa, A. J. Otero-Gonzalez, C. Lopez-Abarrategui, T. M. Rezende, S. C. Dias, O. L. Franco, *Front Microbiol* **2011**, *2*, 232.
- [4] K. V. Reddy, R. D. Yedery, C. Aranha, *Int J Antimicrob Agents* **2004**, *24*, 536-547.
- [5] G. Wang, *Pharmaceuticals (Basel)* **2014**, *7*, 545-594.
- [6] L. Hazlett, M. Wu, *Cell Tissue Res* **2011**, *343*, 175-188.
- [7] R. Bals, *Respir Res* **2000**, *1*, 141-150.
- [8] J. Wehkamp, R. Bals, B. Kreft, J. M. Schröder, E. F. Stange, *Dtsch Arztebl* **2007**, *104*, 257-262.
- [9] R. I. Lehrer, A. K. Lichtenstein, T. Ganz, *Annu Rev Immunol* **1993**, *11*, 105-128.
- [10] C. P. Hill, J. Yee, M. E. Selsted, D. Eisenberg, *Science* **1991**, *251*, 1481-1485.
- [11] B. L. Kagan, T. Ganz, R. I. Lehrer, *Toxicology* **1994**, *87*, 131-149.
- [12] L. L. Corrales-Garcia, L. D. Possani, G. Corzo, *Amino Acids* **2011**, *40*, 5-13.
- [13] R. I. Lehrer, W. Lu, *Immunol Rev* **2012**, *245*, 84-112.
- [14] J. J. Schneider, A. Unholzer, M. Schaller, M. Schäfer-Korting, H. C. Korting, *J Mol Med (Berl)* **2005**, *83*, 587-595.
- [15] E. D. Jones, C. L. Bevins, *J Biol Chem* **1992**, *267*, 23216-23225.
- [16] E. D. Jones, C. L. Bevins, *FEBS J* **1993**, *315*, 187-192.

Literaturverzeichnis

- [17] B. Shen, E. M. Porter, E. Reynoso, C. Shen, D. Ghosh, J. T. Connor, J. Drazba, H. K. Rho, T. L. Gramlich, R. Li, A. H. Ormsby, M. S. Sy, T. Ganz, C. L. Bevins, *J Clin Pathol* **2005**, *58*, 687-694.
- [18] A. J. Quayle, E. M. Porter, A. A. Nussbaum, Y. M. Wang, C. Brabec, K. P. Yip, S. C. Mok, *Am J Pathol* **1998**, *152*, 1247-1258.
- [19] R. N. Cunliffe, F. R. A. J. Rose, J. Keyte, *Gut* **2011**, *48*, 176-185.
- [20] M. Frye, J. Bargon, N. Dauletbaev, A. Weber, T. O. F. Wagner, R. Gropp, *J Clin Pathol* **2000**, *53*, 770-773.
- [21] M. Rajabi, E. de Leeuw, M. Pazgier, J. Li, J. Lubkowski, W. Lu, *J Biol Chem* **2008**, *283*, 21509-21518.
- [22] Z. Wu, X. Li, E. de Leeuw, B. Ericksen, W. Lu, *J Biol Chem* **2005**, *280*, 43039-43047.
- [23] A. Szyk, Z. Wu, K. Tucker, D. Yang, W. Lu, J. Lubkowski, *Protein Sci* **2006**, *15*, 2749-2760.
- [24] A. J. Wommack, S. A. Robson, Y. A. Wanniarachchi, A. Wan, C. J. Turner, G. Wagner, E. M. Nolan, *Biochemistry* **2012**, *51*, 9624-9637.
- [25] R. I. Lehrer, G. Jung, P. Ruchala, S. Andre, H. J. Gabius, W. Lu, *J Immunol* **2009**, *183*, 480-490.
- [26] M. Rajabi, B. Ericksen, X. Wu, E. de Leeuw, L. Zhao, M. Pazgier, W. Lu, *J Biol Chem* **2012**, *287*, 21615-21627.
- [27] A. P. Gounder, M. E. Wiens, S. S. Wilson, W. Lu, J. G. Smith, *J Biol Chem* **2012**, *287*, 24554-24562.
- [28] H. Chu, M. Pazgier, G. Jung, S. P. Nuccio, P. A. Castillo, M. F. de Jong, M. G. Winter, S. E. Winter, J. Wehkamp, B. Shen, N. H. Salzman, M. A. Underwood, R. M. Tsohis, G. M. Young, W. Lu, R. I. Lehrer, A. J. Baumler, C. L. Bevins, *Science* **2012**, *337*, 477-481.
- [29] H. Tanabe, T. Ayabe, A. Maemoto, C. Ishikawa, Y. Inaba, R. Sato, K. Moriichi, K. Okamoto, J. Watari, T. Kono, T. Ashida, Y. Kohgo, *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, *358*, 349-355.

- [30] Y. A. Wanniarachchi, P. Kaczmarek, A. Wan, E. M. Nolan, *Biochemistry* **2011**, *50*, 8005-8017.
- [31] B. O. Schroeder, D. Ehmann, J. C. Precht, P. A. Castillo, R. Kuchler, J. Berger, M. Schaller, E. F. Stange, J. Wehkamp, *Mucosal Immunol* **2014**.
- [32] J. Harder, R. Glaser, J. M. Schroeder, *J Endotoxin Res* **2007**, *13*, 317-338.
- [33] K. Fellermann, E. F. Stange, *Eur J Gastroenterol Hepato* **2001**, *13*, 771-776.
- [34] E. V. Valore, E. Martin, S. S. L. Harwig, T. Ganz, *J Clin Invest* **1996**, *97*, 1624-1629.
- [35] D. Michaelson, J. Rayner, M. Couto, T. Ganz, *J Leukoc Biol* **1992**, *51*, 634-639.
- [36] D. Ghosh, E. Porter, B. Shen, S. K. Lee, D. Wilk, J. Drazba, S. P. Yadav, J. W. Crabb, T. Ganz, C. L. Bevins, *Nat Immunol* **2002**, *3*, 583-590.
- [37] C. L. Bevins, E. Martin-Porter, T. Ganz, *Gut* **1999**, *45*, 911-915.
- [38] E. V. Valore, T. Ganz, *Blood* **1992**, *79*, 1538-1544.
- [39] E. Martin Porter, M. A. Poles, J. S. Lee, J. Naitoh, C. L. Bevins, T. Ganz, *FEBS Lett* **1998**, *434*, 272-276.
- [40] M. E. Selsted, S. S. L. Harwig, T. Ganz, J. W. Schilling, R. I. Lehrer, *J Clin Invest* **1985**, *76*, 1436-1439.
- [41] E. Martin Porter, E. van Dam, E. V. Valore, T. Ganz, *Infect Immun* **1997**, *65*, 2396-2401.
- [42] R. N. Cunliffe, F. R. A. J. Rose, J. Keyte, L. Abberley, W. C. Chan, Y. R. Mahida, *Gut* **2001**, *48*, 176-185.
- [43] E. Martin Porter, L. Liu, A. Oren, P. A. Anton, T. Ganz, *Infect Immun* **1997**, *65*, 2389-2395.
- [44] M. Zasloff, *Nat Immunol* **2002**, *3*, 508-510.
- [45] T. Ayabe, D. P. Satchell, C. L. Wilson, C. Parks, M. E. Selsted, A. J. Ouellette, *Nat Immunol* **2000**, *1*, 113-118.

- [46] C. L. Bevins, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2005**, 289, 173-176.
- [47] D. Yang, A. Biragyn, L. W. Kwak, J. J. Oppenheim, *Trends Immunol* **2002**, 23, 291-296.
- [48] T. Ganz, R. I. Lehrer, *Pharmac Ther* **1995**, 66, 191-205.
- [49] T. Tanaka, M. M. Rahman, B. Battur, D. Boldbaatar, M. Liao, R. Umemiya-Shirafuji, X. Xuan, K. Fujisaki, *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2010**, 46, 560-565.
- [50] J. M. Schröder, J. Harder, *Int J Biochem Cell Biol* **1999**, 31, 645-651.
- [51] H. S. Lee, C. B. Park, J. M. Kim, S. A. Jang, I. Y. Park, M. S. Kim, J. H. Cho, S. C. Kim, *Cancer Lett* **2008**, 271, 47-55.
- [52] B. Ericksen, Z. Wu, W. Lu, R. I. Lehrer, *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 269-275.
- [53] S. Vylkova, N. Nayyar, W. Li, M. Edgerton, *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, 154-161.
- [54] Y. Bai, S. Liu, P. Jiang, L. Zhou, J. Li, C. Tang, C. Verma, Y. Mu, R. W. Beuerman, K. Pervushin, *Biochemistry* **2009**, 48, 7229-7239.
- [55] E. A. Papanastasiou, Q. Hua, A. Sandouk, U. H. Son, A. J. Christenson, M. L. Van Hoek, B. M. Bishop, *APMIS* **2009**, 117, 492-499.
- [56] A. Suresh, C. Verma, *BMC Bioinformatics* **2006**, 7 Suppl 5, S17.
- [57] G. I. Greenwald, T. Ganz, *Infect Immun* **1987**, 55, 1365-1368.
- [58] O. Froy, *Cell Microbiol* **2005**, 7, 1387-1397.
- [59] E. de Leeuw, M. Rajabi, G. Zou, M. Pazgier, W. Lu, *FEBS Lett* **2009**, 583, 2507-2512.
- [60] A. P. Wang, Y. P. Su, S. Wang, M. Q. Shen, F. Chen, M. Chen, X. Z. Ran, T. M. Chen, J. P. Wang, *Afr J Microbiol Res* **2010**, 4, 626-633.
- [61] M. Shimoda, K. Ohki, Y. Shimamoto, O. Kohashi, *Infect Immun* **1995**, 63, 2886-2891.

- [62] E. Hazarati, B. Galen, W. Lu, W. Wang, Y. Ouyang, M. J. Keller, R. I. Lehrer, B. C. Herold, *J Immunol* **2006**, *177*, 8659-8666.
- [63] C. B. Buck, P. M. Day, C. D. Thompson, J. Lubkowski, W. Lu, D. R. Lowy, J. T. Schiller, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 1516-1521.
- [64] L. Furci, M. Tolazzi, F. Sironi, L. Vassena, P. Lusso, *PloS one* **2012**, *7*, e45208.
- [65] C. L. Bevins, *Dig Dis* **2013**, *31*, 299-304.
- [66] A. J. Ouellette, M. E. Selsted, *Science* **2012**, *337*, 420-421.
- [67] P. Chairatana, E. M. Nolan, *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 13267-13276.
- [68] K. A. Brogden, *Nat Rev Microbiol* **2005**, *3*, 238-250.
- [69] A. Böhling, S. O. Hagge, S. Roes, R. Podschun, H. Sahly, J. Harder, J. M. Schröder, J. Grötzinger, U. Seydel, T. Gutschmann, *Biochemistry* **2006**, *45*, 5663-5670.
- [70] V. Sass, T. Schneider, M. Wilmes, C. Korner, A. Tossi, N. Novikova, O. Shamova, H. G. Sahl, *Infect Immun* **2010**, *78*, 2793-2800.
- [71] E. de Leeuw, C. Li, P. Zeng, M. Diepeveen-de Buin, W. Y. Lu, E. Breukink, W. Lu, *FEBS Lett* **2010**, *584*, 1543-1548.
- [72] J. Wiesner, A. Vilcinskas, *Virulence* **2010**, *1*, 440-464.
- [73] J. P. Powers, R. E. Hancock, *Peptides* **2003**, *24*, 1681-1691.
- [74] H. G. Sahl, U. Pag, S. Bonness, S. Wagner, N. Antcheva, A. Tossi, *J Leukoc Biol* **2005**, *77*, 466-475.
- [75] L. Yang, T. A. Harroun, T. M. Weiss, L. Ding, H. W. Huang, *Biophys J* **2001**, *81*, 1475-1485.
- [76] Y. Shai, *Biochim Biophys Acta* **1999**, 55-70.
- [77] P. Nicolas, *FEBS J* **2009**, *276*, 6483-6496.

- [78] J. Wehkamp, M. Schmid, K. Fellermann, E. F. Stange, *J Leukoc Biol* **2005**, *77*, 460-465.
- [79] J. Wehkamp, K. Fellermann, K. R. Herrlinger, C. L. Bevins, E. F. Stange, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **2005**, *2*, 406-415.
- [80] J. Wehkamp, N. H. Salzman, E. Porter, S. Nuding, M. Weichenthal, R. E. Petras, B. Shen, E. Schaeffeler, M. Schwab, R. Linzmeier, R. W. Feathers, H. Chu, H. Lima, Jr., K. Fellermann, T. Ganz, E. F. Stange, C. L. Bevins, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 18129-18134.
- [81] I. Kübler, E. F. Stange, K. Fellermann, J. Wehkamp, *Dtsch Med Wochenschr* **2006**, *131*, 1960-1964.
- [82] J. Wehkamp, M. Koslowski, G. Wang, E. F. Stange, *Mucosal Immunol* **2008**, *1 Suppl 1*, S67-74.
- [83] S. E. Girardin, I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott, P. J. Sansonetti, *J Biol Chem* **2003**, *278*, 8869-8872.
- [84] M. C. Grimm, P. Pavli, *Gut* **2004** *53*, 1558-1560.
- [85] D. A. Elphick, Y. R. Mahida, *Gut* **2005**, *54*, 1802-1809.
- [86] J. Wehkamp, J. Harder, M. Weichenthal, M. Schwab, E. Schaeffeler, M. Schlee, K. R. Herrlinger, A. Stallmach, F. Noack, P. Fritz, J. M. Schröder, C. L. Bevins, K. Fellermann, E. F. Stange, *Gut* **2004**, *53*, 1658-1664.
- [87] L. A. Simms, J. D. Doecke, M. D. Walsh, N. Huang, E. V. Fowler, G. L. Radford-Smith, *Gut* **2008**, *57*, 903-910.
- [88] R. Assenberg, P. T. Wan, S. Geisse, L. M. Mayr, *Curr Opin Struct Biol* **2013**, *23*, 393-402.
- [89] Y. Li, *Protein Expr Purif* **2011**, *80*, 260-267.
- [90] C. Li, H.-M. Blencke, V. Paulsen, T. Haug, K. Stenvag, *Bioeng Bugs* **2010**, *3*, 217-220

- [91] E. V. Valore, T. Ganz, *Methods Mol Biol* **1997**, 78, 115-131.
- [92] S. Sahdev, S. K. Khattar, K. S. Saini, *Mol Cell Biochem* **2008**, 307, 249-264.
- [93] R. Daly, M. T. Hearn, *J Mol Recognit* **2005**, 18, 119-138.
- [94] Y. Li, *Biotechnol Appl Biochem* **2009**, 54, 1-9.
- [95] E. De Bernardez Clark, *Curr Opin Biotechnol* **2001**, 12, 202-207.
- [96] S. A. K. a. E. V. G. Alexander A. Vassilevski, **2008**, 2, 58-63.
- [97] K. L. Piers, M. H. Brown, R. E. W. Hancock, *Gene* **1993**, 134, 7-13.
- [98] J. M. Cregg, J. L. Cereghino, J. Shi, J. Higgins, *Molecular Biotechnology* **2000**, 16, 23-52.
- [99] M. Lalli, *Expression antimikrobieller Peptide in Pichia pastoris* Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart **2010**.
- [100] J. L. Cereghino, J. M. Cregg, *FEMS Microbiol Reviews* **2000**, 24, 45-66.
- [101] A. Wang, S. Wang, M. Shen, F. Chen, Z. Zou, X. Ran, T. Cheng, Y. Su, J. Wang, *Appl Microbiol Biotechnol* **2009**, 84, 877-884.
- [102] D.-C. Iftime, *Optimierung eines Expressionssystems für alpha-Defensine in E. coli*, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart **2010**.
- [103] E. Vargiami, *Expression und Aufreinigung des bioaktiven alpha-Defensins mHD5 als multimere Form in Escherichia coli*, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart **2012**.
- [104] G. Bertani, *J Bacteriol* **1951**, 62, 293-300.
- [105] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- [106] H. Schägger, G. von Jagow, *Anal Biochem* **1987**, 166, 368-379.
- [107] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal Chem* **1996**, 68, 850-858.

- [108] D. Piszkiwicz, Landon, M., E. L. Smith, *Biochem Biophys Res Commun* **1970**, *40*, 1173–1178.
- [109] L. Dumon-Seignovert, G. Cariot, L. Vuillard, *Protein Expr Purif* **2004**, *37*, 203-206.
- [110] E. Vargiami, *Expression und Aufreinigung des humanen alpha-Defensins mHD6 in Escherichia coli*, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart **2012**.
- [111] L. M. Damasceno, C. J. Huang, C. A. Batt, *Appl Microbiol Biotechnol* **2012**, *93*, 31-39.
- [112] K. M. S. Cabral, M. S. Almeida, A. P. Valente, F. C. L. Almeida, E. Kurtenbach, *Protein Expr Purif* **2003**, *31*, 115-122.
- [113] E. M. Porter, E. Van Dam, E. V. Valore, T. Ganz, *Infect Immun* **1997**, *65*, 2396-2401.
- [114] L. Liu, T. Ganz, *Blood* **1995**, *85*, 1095-1103.
- [115] Novagen, **2002-2003**.
- [116] E. R. LaVallie, E. A. DiBlasio, S. Kovacic, K. L. Grant, P. F. Schendel, J. M. McCoy, *Biotechnology* **1993**, *11*, 187-193.
- [117] A. Wang, Y. Su, S. Wang, M. Shen, F. Chen, M. Chen, X. Ran, T. Cheng, J. Wang, *Appl Microbiol Biotechnol* **2010**, *87*, 1935-1942.
- [118] K. Terpe, *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *72*, 211-222.
- [119] D. S. Waugh, *Trends Biotechnol* **2005**, *23*, 316-320.
- [120] S. Wagner, M. M. Klepsch, S. Schlegel, A. Appel, R. Draheim, M. Tarry, M. Hogbom, K. J. van Wijk, D. J. Slotboom, J. O. Persson, J. W. de Gier, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 14371-14376.
- [121] E. R. LaVallie, Z. Lu, E. A. Diblasio-Smith, L. A. Collins-Racie, J. M. McCoy, *Methods Enzymol* **2000**, *326*, 322-340.
- [122] H. Chen, Z. Xu, L. Peng, X. Fang, X. Yin, N. Xu, P. Cen, *Peptides* **2006**, *27*, 931-940.

- [123] L. Peng, Z. Xu, X. Fang, F. Wang, P. Cen, *Process Biochem* **2004**, 39, 2199-2205.
- [124] L. Huang, J. Wang, Z. Zhong, L. Peng, H. Chen, Z. Xu, P. Cen, *Biotechnol Lett* **2006**, 28, 627-632.
- [125] Z. Xu, Z. Zhong, L. Huang, L. Peng, F. Wang, P. Cen, *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, 72, 471-479.
- [126] L. Huang, C. B. Ching, R. Jiang, S. S. Leong, *Protein Expr Purif* **2008**, 61, 168-174.
- [127] L. Huang, S. S. Leong, R. Jiang, *Appl Microbiol Biotechnol* **2009**, 84, 301-308.
- [128] C. Bals, A. Schambach, J. Meyer, T. Scheper, U. Rinas, *J Biotechnol* **2011**, 152, 1-8.
- [129] X. Xu, F. Jin, X. Yu, S. Ji, J. Wang, H. Cheng, C. Wang, W. Zhang, *Protein Expr Purif* **2007**, 53, 293-301.
- [130] X. L. Jing, X. G. Luo, W. J. Tian, L. H. Lv, Y. Jiang, N. Wang, T. C. Zhang, *Curr Microbiol* **2010**, 61, 197-202.
- [131] Y. Li, X. Li, G. Wang, *Protein Expr Purif* **2006**, 47, 498-505.
- [132] Z. Xu, L. Peng, Z. Zhong, X. Fang, P. Cen, *Biotechnology progress* **2006**, 22, 382-386.
- [133] L. g. Si, X. c. Liu, Y. y. Lu, G. y. Wang, W. m. Li, *Chin Med J* **2007**, 120, 708-713.
- [134] X. Li, S. S. Leong, *Journal of chromatography. A* **2011**, 1218, 3654-3659.
- [135] M. Pazgier, J. Lubkowski, *Protein Expr Purif* **2006**, 49, 1-8.
- [136] Wang A., Su Y., Cheng T., Zou Z., W. J., *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **2008**, 2, 291-296.
- [137] S. Zhu, C. Gong, L. Ren, X. Li, D. Song, G. Zheng, *Appl Microbiol Biotechnol* **2013**, 97, 837-845.
- [138] P. Balbás, A. Lorence, *Methods Mol Biol* **2004**, 267, 15-51.

- [139] F. Baneyx, *Curr Opin Biotechnol* **1999**, *10*, 411-421.
- [140] A. de Marco, *Microb Cell Fact* **2009**, *8*, 26.
- [141] J. F. Li, J. Zhang, R. Song, J. X. Zhang, Y. Shen, S. Q. Zhang, *Appl Microbiol Biotechnol* **2009**, *84*, 383-388.
- [142] J. McCoy, E. La Vallie, *Curr Protoc Mol Biol* **1994**, 16.18.11-16.18.14.
- [143] K. Graumann, A. Premstaller, *Biotechnol J* **2006**, *1*, 164-186.
- [144] S. Graslund, P. Nordlund, J. Weigelt, B. M. Hallberg, J. Bray, O. Gileadi, S. Knapp, U. Oppermann, C. Arrowsmith, R. Hui, J. Ming, S. dhe-Paganon, H. W. Park, A. Savchenko, A. Yee, A. Edwards, R. Vincentelli, C. Cambillau, R. Kim, S. H. Kim, Z. Rao, Y. Shi, T. C. Terwilliger, C. Y. Kim, L. W. Hung, G. S. Waldo, Y. Peleg, S. Albeck, T. Unger, O. Dym, J. Prilusky, J. L. Sussman, R. C. Stevens, S. A. Lesley, I. A. Wilson, A. Joachimiak, F. Collart, I. Dementieva, M. I. Donnelly, W. H. Eschenfeldt, Y. Kim, L. Stols, R. Wu, M. Zhou, S. K. Burley, J. S. Emtage, J. M. Sauder, D. Thompson, K. Bain, J. Luz, T. Gheyi, F. Zhang, S. Atwell, S. C. Almo, J. B. Bonanno, A. Fiser, S. Swaminathan, F. W. Studier, M. R. Chance, A. Sali, T. B. Acton, R. Xiao, L. Zhao, L. C. Ma, J. F. Hunt, L. Tong, K. Cunningham, M. Inouye, S. Anderson, H. Janjua, R. Shastry, C. K. Ho, D. Wang, H. Wang, M. Jiang, G. T. Montelione, D. I. Stuart, R. J. Owens, S. Daenke, A. Schutz, U. Heinemann, S. Yokoyama, K. Bussow, K. C. Gunsalus, *Nat Methods* **2008**, *5*, 135-146.
- [145] X. Jiang, M. Zhang, Y. Ding, J. Yao, H. Chen, D. Zhu, M. Muramatu, *J Biochem* **1998**, *124*, 980-985.
- [146] R. Jain, M. K. Chan, *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, *359*, 486-490.
- [147] B. Bommarius, H. Jenssen, M. Elliott, J. Kindrachuk, M. Pasupuleti, H. Gieren, K. E. Jaeger, R. E. Hancock, D. Kalman, *Peptides* **2010**, *31*, 1957-1965.
- [148] Y. Li, X. Li, H. Li, O. Lockridge, G. Wang, *Protein Expr Purif* **2007**, *54*, 157-165.
- [149] Z. G. Tian, T. T. Dong, Y. L. Yang, D. Teng, J. H. Wang, *Appl Microbiol Biotechnol* **2009**, *83*, 143-149.
- [150] M. Zorko, B. Japelj, I. Hafner-Bratkovic, R. Jerala, *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1788*, 314-323.

- [151] X. Rao, J. Hu, S. Li, X. Jin, C. Zhang, Y. Cong, X. Hu, Y. Tan, J. Huang, Z. Chen, J. Zhu, F. Hu, *Peptides* **2005**, *26*, 721-729.
- [152] B. Fahnert, H. Lilie, P. Neubauer, *Adv Biochem Engin/Biotechnol* **2004**, *89*, 93-142.
- [153] I. M. Jae H. Lee, Chan B. Park, and Sun C. Kim, *Protein Expr Purif* **1998**, *12*, 53-60.
- [154] K. Raina, A. K. Panda, M. M. Ali, G. P. Talwar, *Protein Expr Purif* **2004**, *37*, 8-17.
- [155] A. Giuliani, A. C. Rinaldi, *Methods Mol Biol* **2010**, *618*, 61-76.
- [156] K. H. Hsu, C. Pei, J. Y. Yeh, C. H. Shih, Y. C. Chung, L. T. Hung, B. R. Ou, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **2009**, *55*, 395-401.
- [157] J. Davey, K. Davis, M. Hughes, G. Ladds, D. Powner, *Cell & Developmental Biology* **1998**, *9*, 19-30.
- [158] K. Sreekrishna, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology* **2010**, 1-16.
- [159] A. J. Brake, J. P. Meeryweather, D. G. Coit, U. A. Heberlein, F. R. Masiarz, G. T. Mullenbach, M. S. Urdea, P. Valenzuela, P. J. Barr, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**, *81*, 4642-4646.
- [160] Z. Chen, D. Wang, Y. Cong, J. Wang, J. Zhu, J. Yang, Z. Hu, X. Hu, Y. Tan, F. Hu, X. Rao, *Appl Microbiol Biotechnol* **2011**, *89*, 281-291.
- [161] Z. Peng, A. Wang, Q. Feng, Z. Wang, I. V. Ivanova, X. He, B. Zhang, W. Song, *Appl Microbiol Biotechnol* **2014**, *98*, 5487-5497.
- [162] P. T. Liu, T. V. Ta, L. H. Villarete, *Protein Expr Purif* **2001**, *22*, 381-387.
- [163] A. K. Vadhana, P. Samuel, R. M. Berin, J. Krishna, K. Kamatchi, S. Meenakshisundaram, *Enzyme Microb Technol* **2013**, *52*, 177-183.
- [164] N. Ide, T. Masuda, N. Kitabatake, *Biochem Biophys Res Commun* **2007**, *363*, 708-714.
- [165] R. J. M. Raemaekers, L. de Muro, J. A. Gatehouse, A. P. Fordham-Skelton, *Eur J Biochem* **1999**, *265*, s394-403.

- [166] S. Salunkhe, S. Soorapaneni, K. S. Prasad, V. A. Raiker, S. Padmanabhan, *Protein Expr Purif* **2010**, *71*, 139-146.
- [167] S. Sreenivas, S. M. Krishnaiah, N. Govindappa, Y. Basavaraju, K. Kanojia, N. Mallikarjun, J. Natarajan, A. Chatterjee, K. N. Sastry, *Appl Microbiol Biotechnol* **2015**, *99*, 327-336.
- [168] S. A. Minyasab, S. P. Dhamane, P. Hazra, H. Iyer, *A method of purifying human growth hormone and purified growth hormone thereof*, WO 2010/134084 A1, **2010**.
- [169] L. M. Damasceno, I. Pla, H. J. Chang, L. Cohen, G. Ritter, L. J. Old, C. A. Batt, *Protein Expr Purif* **2004**, *37*, 18-26.
- [170] I. Van der Klei, W. Harder, M. Venhuis, *Yeast* **1991**, *7*, 195-209.
- [171] J. Hao, L. Xu, H. He, X. Du, L. Jia, *Protein Expr Purif* **2013**, *90*, 178-185.
- [172] W. C. Wimley, M. E. Selsted, S. H. White, *Protein Science* **1994**, *3*, 1362-1373.
- [173] N. Chapnik, A. Levit, M. Y. Niv, O. Froy, *Appl Biochem Biotechnol* **2012**, *166*, 1703-1710.
- [174] Z. Zhong, Z. Xu, L. Peng, L. Huang, X. Fang, P. Cen, *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *71*, 661-667.
- [175] H. K. Kim, D. S. Chun, J. S. Kim, C. H. Yun, J. H. Lee, S. K. Hong, D. K. Kang, *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *72*, 330-338.
- [176] J. M. Kim, S. A. Jang, B. J. Yu, B. H. Sung, J. H. Cho, S. C. Kim, *Appl Microbiol Biotechnol* **2008**, *78*, 123-130.
- [177] J. H. Lee, M. S. Kim, J. H. Cho, S. C. Kim, *Appl Microbiol Biotechnol* **2002**, *58*, 790-796.
- [178] F. Wang, X. Fang, Z. Xu, L. Peng, P. Cen, *Prep Biochem Biotechnol* **2004**, *34*, 215-225.
- [179] Z. Xu, F. Wang, L. Peng, *Appl Biochem Biotechnol* **2005**, *120*, 1-13.
- [180] M. Lalli, S. J. Facey, B. Hauer, *Chembiochem* **2011**, *12*, 1519-1521.

Literaturverzeichnis

- [181] B. Worsdorfer, K. J. Woycechowsky, D. Hilvert, *Science* **2011**, 331, 589-592.
- [182] D. Teng, D. Xi, J. Zhang, X. Wang, R. Mao, Y. Zhang, J. Wang, *Process Biochem* **2015**, 50, 553-560.