

# **Design und Einsatz von Enzymen zur Bekämpfung von Biofilmen**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I- Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

**Herrn Dipl.-Biol. Uwe Hildebrandt**

geboren am 12.03.1984 in Schkeuditz, Deutschland

Gutachter

1. Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Prof. Dr. Thomas Groth
3. Prof. Dr. Rudolf Hausmann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 08.12.2015

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:

Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,

etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Uwe Hildebrandt, dass ich die vorliegende Arbeit - mit Ausnahme der aufgeführten Personen, Unterlagen bzw. Literaturstellen - selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Die den aufgeführten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Design und Einsatz von Enzymen zur Bekämpfung von Biofilmen“ wurde von an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch angefertigt.

---

Uwe Hildebrandt

Leipzig, den 12.04.2015

---

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Lehrstuhl für Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Institutsbereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Institutes für Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften.

Das Gelingen der vorliegenden Arbeit beruhte auf der Mitarbeit vieler Personen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

Prof. Dr. Markus Pietzsch möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Die Auswahl der hochaktuellen Thematik und der Wirtschaftsbezug waren der Hauptausschlag zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Seine Diskussionsbereitschaft und seine scheinbar nie enden wollende Ideenvielfalt waren stets bereichernd und willkommen.

Frau Dr. Hermsdorf und Herrn Dr. Schellenberg von der Lanxess AG danke ich für die materielle und monetäre Unterstützung. Der Firma Probiodrug AG und ins besonders Frau Birgit Koch möchte ich für die Bereitstellung des *Pichia pastoris*-Stamms X33 und der pPICZ-Vektoren danken. Dr. Nobert Volk und Frau Martina Anwand danke ich für die Einweisung und Unterstützung während der Fermentation von *Pichia pastoris* X33. Weiter möchte ich mich bei Dr. Christian Ihling (AG Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, Institut für Pharmazie) bedanken, der mit seiner praktischen Erfahrung im Bereich Massenspektrometrie zur Aufklärung der verschiedenen Proteinase K-Varianten beitrug. Dr. Uwe Spohn (Fraunhofer IWM Halle (Saale)) danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung des Bioassays an *Pseudomonas fluorescens* und Tobias Kürbitz für das Opfern von zahlreichen Stunden zur Auswertung der CLSM-Ergebnisse. An dieser Stelle sei auch Dr. Jakob Barz (Fraunhofer IGB Stuttgart) gedankt, der die Plasmamodifikation der Polypropylenfolien und die Kontrollen durchführte. Danke auch an Michael Günther, der mich während seiner Masterarbeit mit zwei zusätzlichen Händen tatkräftig unterstützte.

Ein besonderer Dank gilt der gesamten Belegschaft der Arbeitsgruppe Pietzsch, allen voran Dr. Thomas Hertel und Dr. Franziska Seifert. Über ihr offenes Ohr und ihre vielen konstruktiven Vorschläge war ich stets sehr erfreut und dankbar. An den Rest der Belegschaft sei gerichtet, danke für die tolle Zeit.

*Abschließend möchte ich mich bei meiner gesamten Familie sowie Tina und ihrer Familie, für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und ihren Rückhalt bedanken. Im Besonderen danke ich meinen Eltern dafür, dass sie so sind, wie sie sind, DANKE FÜR ALLES.*

# Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen

## Inhaltsverzeichnis

<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	<b>3</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>4</b>
<b>Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen</b> .....	<b>5</b>
Inhaltsverzeichnis .....	5
Abkürzungen .....	9
<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b> .....	<b>12</b>
1.1 Einleitung.....	12
1.2 Stand des Wissens.....	14
1.2.1 Extrazelluläre polymere Substanz.....	14
1.2.2 Enzymatische Biofilmbekämpfung .....	16
1.2.3 Proteasen .....	20
1.2.3.1 Proteinase K aus <i>Tritirachium album</i> .....	21
1.2.4 Nukleasen .....	24
1.2.4.1 Nuklease aus <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
1.2.5 Immobilisierung von Enzymen .....	27
1.3 Motivation .....	29
1.4 Zielsetzung .....	31
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
2.1 Geräte .....	32
2.2 Sonstige Materialien .....	34
2.3 Chemikalien.....	35
2.4 Puffer, Lösungen und Medien.....	38
2.5 Übersicht verwendeter Primer .....	41
2.6 Zelllinien und Vektoren .....	42
2.7 Restriktionsverdau .....	43
2.8 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese .....	43
2.9 Agarose-Gelextraktion .....	43
2.10 Ligation.....	43
2.11 Reinigung von PCR-Produkten und Restriktions-verdauen.....	44
2.12 Transformation von <i>E. coli</i> .....	44
2.12.1 Herstellung elektrokompenter Zellen .....	44
2.12.2 Elektroporation .....	45
2.12.3 Hitzeschocktransformation.....	45
2.13 Transformation von <i>Pichia pastoris</i> X33.....	45

2.13.1 Herstellung elektrokompetenter X33.....	45
2.13.2 Linearisierung von pPICZαA-Vektoren.....	46
2.13.3 Elektroporation von X33 .....	46
2.14 Plasmidpräparation.....	46
2.15 Polymerasekettenreaktionen (PCR).....	47
2.15.1 Kolonie-PCR.....	47
2.15.2 Ortsgerichtete Mutagenese-PCR .....	48
2.16 <i>Dpn</i> I-Verdau .....	49
2.17 Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	49
2.18 Bestimmung von Konzentrationen .....	49
2.18.1 DNA-Konzentration mittels UV-Absorption bei 260 nm .....	49
2.18.2 Proteinkonzentration mittels BRADFORD-Test.....	49
2.19 Zellkultivierung.....	50
2.19.1 Proteinexpression im DW-MTP-Maßstab.....	50
2.19.2 Proteinexpression im Schüttelkolben-Maßstab .....	51
2.19.2.1 rPK .....	51
2.19.2.2 rMicNuc .....	52
2.19.3 Fermentation im Bioreaktor.....	52
2.19.4 1/OD Probenanlage.....	53
2.19.5 Kryokulturen .....	53
2.20 Proteinbiochemische Methoden.....	53
2.20.1 Präzipitation von Proteinen .....	53
2.20.2 Bestimmung der rPK-Aktivität .....	54
2.20.2.1 Extinktionskoeffizient von pNA.....	54
2.20.2.2 96-Well Mikrotiterplatte .....	55
2.20.2.3 Volumenaktivität .....	56
2.20.2.4 Poröser Träger .....	57
2.20.2.5 PP-Folie.....	57
2.20.3 Bestimmung der rMicNuc-Aktivität .....	58
2.20.3.1 Volumenaktivität .....	58
2.20.3.2 Reduktion von Disulfidbrücken.....	58
2.20.3.3 Poröser Träger .....	59
2.20.3.4 PP-Folie.....	59
2.21 Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator .....	60
2.22 Ultrafiltration .....	60
2.23 Dialyse.....	60
2.24 Chromatographie.....	60

2.24.1	Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie .....	60
2.24.1.1	IMAC von rPK-CT-His120 .....	61
2.24.1.2	IMAC von rMicNuc-Varianten.....	61
2.24.2	Kationenaustauschchromatographie.....	61
2.24.3	Gel-Permeations-Chromatographie .....	61
2.25	Proteinanalyse mittels SDS-PAGE .....	61
2.25.1	Färbung von SDS-PAGE Gelen mittels Coomassie .....	62
2.25.2	Färbung von SDS-PAGE Gelen mittels Silber.....	62
2.26	<i>Western Blot</i> zum 6xHis-tag Nachweis .....	63
2.27	ESI-MS Analyse von Proteinen.....	64
2.28	Immobilisierung an poröse Träger .....	64
2.28.1	Ni-Sepharose™ high performance.....	64
2.28.2	Aktivierte Thiolsepharose 4B .....	65
2.29	Immobilisierung an PP-Folie .....	66
2.29.1	Zielgerichtete und ungerichtete Immobilisierung der rPK .....	66
2.29.2	Zielgerichtete und ungerichtete Immobilisierung der rMicNuc .....	67
2.30	Bioassay mit <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	68
2.30.1	Auswirkung der <i>Pseudomonas fluorescens</i> Kultivierungsbedingungen auf die enzymatische Aktivität von rPK-CT-His120 und rMicNuc .....	68
2.30.2	Durchführung des Bioassays zur Biofilmbildung .....	68
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>70</b>
3.1	Bereitstellung der Enzyme und deren Varianten zur gerichteten Immobilisierung ...	70
3.1.1	Nuklease aus <i>Staphylococcus aureus</i> .....	70
3.1.1.1	Gendesign und Synthese.....	70
3.1.1.2	Qualitätskontrolle des synthetisierten MicNuc-Gens und Generierung von Cystein-Varianten .....	72
3.1.1.3	Proteinproduktion und Reinigung.....	77
3.1.2	Proteinase K aus <i>Tritirachium album</i> .....	80
3.1.2.1	Gendesign und Synthese.....	80
3.1.2.2	Klonierung der Pro-PK-Sequenz und deren Qualitätskontrolle.....	81
3.1.2.3	Proteinproduktion und <i>Scale-up</i> .....	84
3.1.2.4	Reinigung der rPK .....	88
3.1.2.5	Generieren einer rPK-Variante mit C-terminalem His-tag.....	90
3.1.3	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Produktion der Enzyme (Kapitel 3.1)	98
3.2	Untersuchungen zur zielgerichteten Immobilisierung .....	99
3.2.1	Zielgerichtete Immobilisierung an porösen Trägern .....	99
3.2.1.1	Immobilisierung über Komplexbildung .....	100

3.2.1.2	Immobilisierung über Disulfidbrücken .....	102
3.2.1.3	Enzymstabilität an porösen Trägern.....	104
3.2.2	Untersuchung zur mehrfachen Reaktion enzymgekoppelter Oberflächen....	105
3.2.3	Immobilisierung an PP- bzw. epoxidierten PP-Oberflächen .....	107
3.2.4	Zusammenfassung Kapitel 3.2 .....	111
3.3	Untersuchungen zur Biofilmprevention .....	114
3.3.1	Auswirkung der Kultivierungsbedingungen auf die enzymatische Aktivität von rPK-CT-His120 und rMicNuc .....	114
3.3.2	Einfluss auf die Biofilmbildung von <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	116
3.3.3	Zusammenfassung Kapitel 3.3 .....	120
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>121</b>
4.1	Bereitstellung der Enzyme und deren Varianten zur gerichteten Immobilisierung .	121
4.1.1	Nuklease aus <i>Staphylococcus aureus</i> .....	121
4.1.2	Proteinase K aus <i>Tritirachium album</i> .....	124
4.2	Untersuchungen zur zielgerichteten Immobilisierung .....	131
4.2.1	Zielgerichtete Immobilisierung an porösen Trägern .....	131
4.2.2	Immobilisierung an PP-Oberflächen .....	138
4.3	Untersuchungen zur Biofilmprevention .....	142
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>146</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>169</b>
8.1	Translationskarten .....	169
8.1.1	Nukleotid- und Aminosäuresequenz (5' → 3') des MicNuc-Gens aus pET20b(+)	169
8.1.2	Nukleotid- und Aminosäuresequenz (5' → 3') des Prä-Pro-PK-Gens aus pPICZαA	169
8.2	CLSM-Aufnahmen .....	170
8.3	Ergänzende Ergebnisse .....	175
8.3.1	KIA-Chromatographiedaten der rPK-Aufreinigung .....	175
8.3.2	IMAC- Chromatographiedaten der rPK-CT-His120-Aufreinigung .....	176
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>177</b>

## Abkürzungen

6xHis	Hexahistidin
AOX	Alkoholoxidase
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Abgeschwächte Totalreflektion
ATS	Aktivierte Thiol-Sepharose 4B
BCIP/ NBT	<i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ Nitro blue tetrazolium</i>
BFM	Biofeuchtmasse
BMGY	Gepuffertes Glycerin Komplexmedium
BMMY	Gepuffertes Methanol Komplexmedium
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSM	Basalsalzmedium
BTM	Biotrockenmasse
CNBr	Cyanogenbromid
CLSM	Konfokale Laserscanning Mikroskopie
CT	Carboxy-Terminus
CTP	Cytidintriphosphat
CV	Säulenvolumen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DW-MTP	<i>Deepwell</i> -Mikrotiterplatte
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPS	Extrazelluläre polymere Substanz
EPMA	2,3-Epoxypropylmethacrylat
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HDH	Hochdruckhomogenisator
IDA	Iminodiessigsäure
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KBE	Kolonienbildende Einheit
KIA	Kationenaustauschchromatographie
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LSLB	<i>Low Salt Lysogeny Broth</i>
mAK	Monoklonaler Antikörper
MW	<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>
n/a	Nicht angegeben
Nitrophenyl-pdTp	Tymidin 5'-(p-Nitrophenylphosphat)-3' Phosphat
NTA	Nitrioltriessigsäure
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
pAK	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBSB	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit BSA
PBST	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung mit TWEEN® 20
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PES	Polyethersulfon
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNA	Para-Nitroanilin
PPL	<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>
rMicNuc	Rekombinante MicNuc R-6xHis aus <i>E.coli</i> , Ursprung <i>Staphylococcus aureus</i>
rPK	Rekombinante Proteinase K aus <i>Pichia pastoris</i> , Ursprung <i>Tritirachium album</i>
RPM	Runden pro Minute
S2P	Mikrobielle Transglutaminase S2P
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SK	Schüttelkolben
SOC	<i>Super Optimal Broth Complex</i>
Suc-AAPF-pNA	Succinyl-Alanin-Alanin-Prolin-Phenylalanin-para-Nitroanilid
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
WT	Wildtyp
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie

VE	Vollentsalzt
YNB	Yeast Nitrogen Base

**Organismenbezeichnung von Restriktionsenzymen und DNA-Polymerasen**

<i>Dpn</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i> G41
<i>EcoR</i>	<i>Escherichia coli</i> Restriktionsendonuklease
<i>Nde</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Pme</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i>
<i>Sac</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>Xba</i>	<i>Xanthomonas badrii</i>
<i>Xho</i>	<i>Xanthomonas vasicola</i>

**Codon Übersicht**

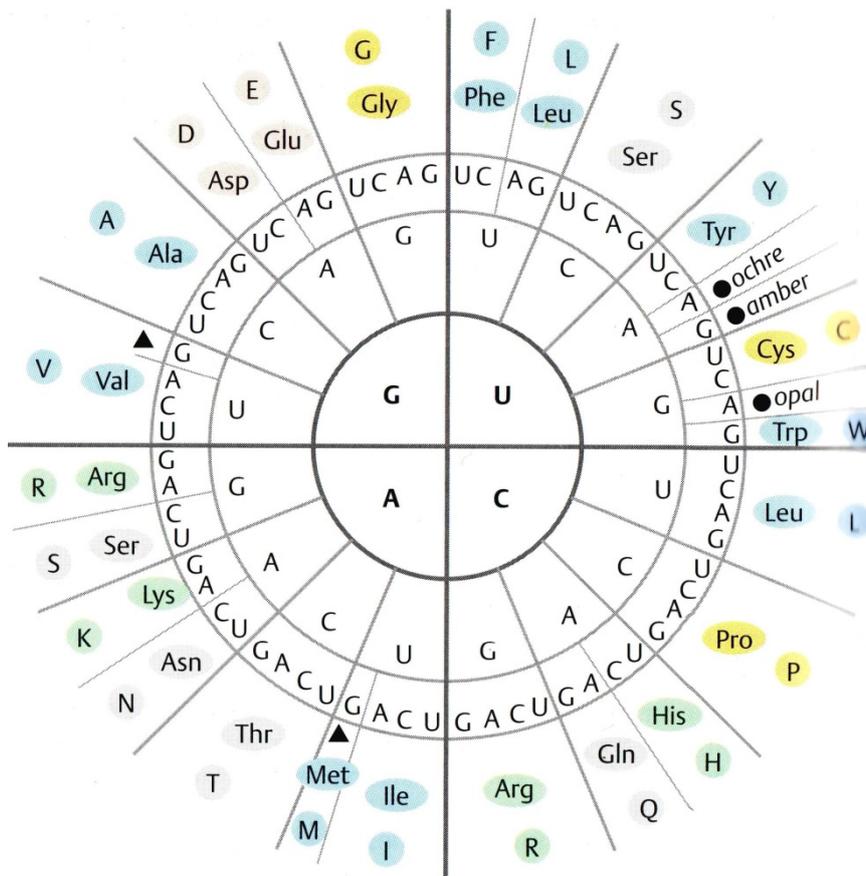


Abbildung 0-1: Darstellung der Codon- „Sonne“. Innen nach außen (5' nach 3') als mRNA. Blau- hydrophobe AS, Grün- basische AS, Grau- polare AS, Rosa- saure AS, Gelb- spezielle AS. Dreieck- Startcodons die Methionin einbauen [Janning und Knust, 2004].

# 1 Einleitung und Zielsetzung

## 1.1 Einleitung

Die am häufigsten vorkommende Lebensform auf unserem Planeten ist die der Bakterien. Ihre Biomasse weltweit übersteigt die aller Pflanzen und Tiere. In einem Gramm typischer Walderde leben circa 50 Millionen Bakterien [Hogan, 2013] und in 1 mL Frischwasser circa 1 Million Bakterien [Whitman *et al.*, 1998]. Es existieren etwa  $4-6 \times 10^{30}$  prokaryotische Mikroorganismen auf der Erde, wobei die Bakterien zur größten Domäne der Prokaryoten zählen [Whitman *et al.*, 1998]. Allein auf dem menschlichen Körper leben zehnmal mehr Bakterien als es Körperzellen gibt [Berg, 1996]. Bakterien sind ubiquitär verbreitet und besitzen Morphologien, die von sphärisch, stäbchenförmig, spiralförmig bis hin zu kommaförmig und filamentös reicht [Kayser, 2010]. Ihre Länge beträgt meist zwischen 0,2-2  $\mu\text{m}$  [Gerard *et al.*, 1998], kann aber auch in seltenen Fällen bis zu 0,7 mm betragen [Williams, 2011]. Bereits im Jahr 1674 erkannte der niederländische Naturforscher Antoni van Leeuwenhoek, dass Bakterien sowohl in einer frei beweglichen Form vorliegen können (planktonische Wuchsform) als auch in einer sessilen Wuchsform, als er seinen eigenen Zahnbelag unter dem Mikroskop betrachtete [Donlan und Costerton, 2002]. Weiter schrieb Arthur T. Henrici 1933, dass der Großteil der Wasserbakterien nicht frei schwimmt, sondern unter Wasser auf Oberflächen wächst [Henrici, 1933]. Heute ist bekannt, die Mehrheit aller Bakterien (>99 %) leben in einer solchen sessilen Wuchsform miteinander [Beule, 2007; Costerton *et al.*, 1999]. Diese komplex aufgebaute Gemeinschaft aus miteinander kommunizierenden und interagierenden Bakterien wird als Biofilm bezeichnet und ähnelt in seiner Komplexität sogar der Struktur von Gewebe höherer Organismen [Costerton *et al.*, 1995]. Biofilme können eine Dicke von wenigen Mikrometern bis knapp einen Meter erreichen (Abbildung 1-1). Zudem enthalten Biofilme auch andere Organismen, wie z.B. Algen, Pilze, Viren oder Protozoen [Hall-Stoodley *et al.*, 2004]. Eines der ältesten Fossilien der Welt zeigt das Vorhandensein von Biofilm-ähnlichen Mikrokolonien vor 3,4 Milliarden Jahren und belegt ihren Status als älteste Lebensgemeinschaft auf Erden [Westall *et al.*, 2001].

Um sich besser an den jeweiligen Lebensraum anzupassen und sich gegen Umwelteinflüsse zu schützen, z.B. gegen Austrocknung, ultraviolette Strahlung, Oxidationsstress, Antibiotika oder Biozide, umgeben sich die Bakterien mit einer selbstproduzierten Matrix, der extrazellulären polymeren Substanz [Flemming, 1998; Flemming und Wingender, 2010]. Mithilfe eines Informationssystems unter den Mikroorganismen, dem *quorum sensing*, kommunizieren Zellen über Signalmoleküle und Botenstoffe, wie dem N-Acetyl-Homoserin-Lacton, miteinander und regeln so den EPS-Aufbau und die Besiedlungsdichte [Davies *et al.*, 1998]. Dadurch entstehen dreidimensionale, hydrogelartige Strukturen, die von Poren und

Gängen durchzogen und mit Wasser gefüllt sind. Hier finden sich sowohl pH-Gradienten als auch aerobe und anaerobe Bereiche innerhalb des Biofilms [Beule, 2007].

Aufgrund der verbesserten Nährstofflage, dem Schutzaspekt und der irreversiblen Anheftung an Oberflächen ist es sehr schwierig und zeitaufwendig Biofilme zu beseitigen [Costerton *et al.*, 1999]. Die Bakterien können sich dabei auf nahezu allen Oberflächen anheften, von lebendem Gewebe, medizinischen Geräten, in Industrie- oder Trinkwasserleitungen, Schiffsrümpfe, Bohrinseln, Kühlwassersysteme, Papier- und Textilherstellung, bis hin zu natürlich aquatischen Systemen [Cordeiro und Werner, 2011; Donlan, 2002; Flemming, 2002; Torres *et al.*, 2011]. Dabei ist die flüssig-feste Interphase zwischen einer Oberfläche und einer wässrigen Lösung eine ideale Umgebung zur irreversiblen Ansiedlung.

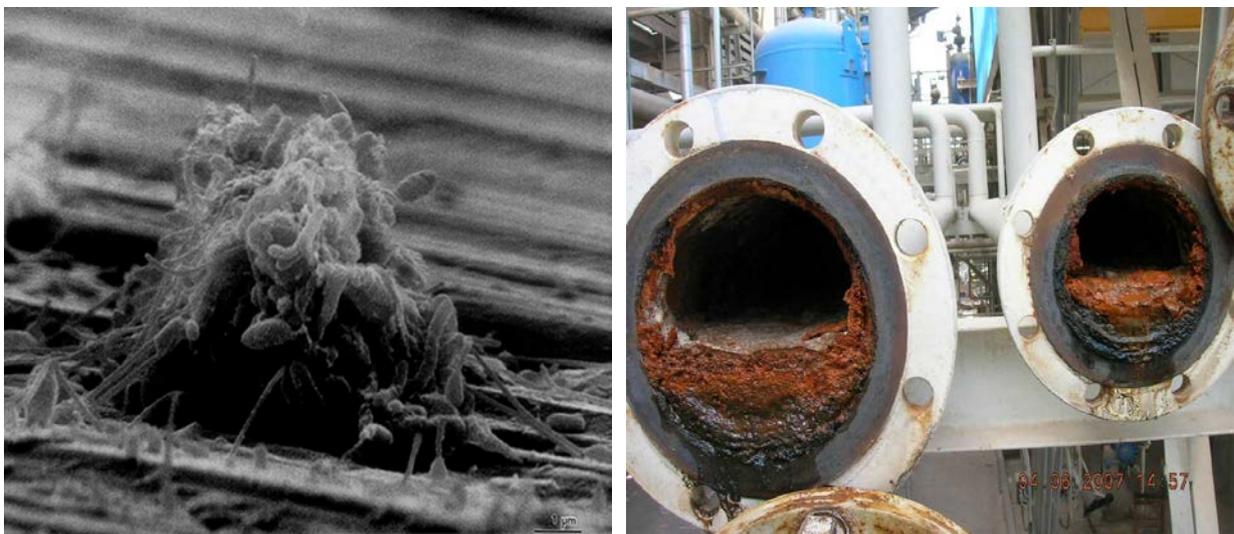


Abbildung 1-1: **(Links):** Scanning-Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Biofilms auf einer Metalloberfläche in einem industriellen Wasserkreislauf [Donlan und Costerton, 2002]. **(Rechts):** Biofouling am Ende einer Wasserpipeline [Merus, 2011].

Das unerwünschte Auftreten von Biofilmen und damit verursachten Leistungs- bzw. Anwendungseinbußen werden unter dem Begriff *Biofouling* zusammengefasst [Flemming, 1995a; Flemming, 1998]. Der wirtschaftliche Schaden im Bereich Medizin und der Industrie liegt bei mehreren Milliarden Dollar im Jahr [Post *et al.*, 2004; Rouhi, 1998]. Daher besteht ein massives wirtschaftliches Interesse daran, Biofilmbildung zu beseitigen oder besser noch die Entstehung zu unterbinden.

Biofilme werden aktuell überwiegend durch physikalische und/oder chemische Prozesse eliminiert. Glatte oder hydrophobe Oberflächen, teilweise mit Nanostrukturen versehen, kommen zur Anwendung [Bowen *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2011]. Auch Ultraschallbehandlung [Huang *et al.*, 1996], Vibration [Hazan *et al.*, 2006] sowie Silber- bzw. Kupferbeschichtungen [Cao *et al.*, 2011; Donlan, 2002] werden eingesetzt. In der Vorbehandlung von Brackwasser zur Trinkwassergewinnung hat sich der Einsatz von Chlor, Ozon, Bromid, Bakteriziden und Fungiziden bewährt [Cao *et al.*, 2011; Leroy *et al.*, 2008a].

Aufgrund der erheblichen Umweltbelastungen ist der Einsatz von Chemikalien und Bioziden (z.B. Tributylzinn) jedoch umstritten. Zudem konnten Berry *et al.* nur minimale bis keine Effekte auf die Konzentration der Bakterien im Biofilm, beim Einsatz von Chlor zur Desinfektion nachweisen [Berry *et al.*, 2006]. Im Hinblick auf Nachhaltigkeit und Umweltbewusstsein rücken deshalb vermehrt biologische Methoden zur Biofilmbekämpfung in den Fokus. Ansätze, wie die Verwendung antimikrobieller Peptide [Berliner *et al.*, 2009], der Einsatz von Bakteriophagen [Lu und Collins, 2007] oder auch die Störung des *quorum sensing* [Ryan und Dow, 2008] sind mögliche Ansätze. Zudem könnte die Verwendung von Enzymen eine vielversprechende biologische Alternative sein [Leroy *et al.*, 2008a; Leroy *et al.*, 2008b].

## 1.2 Stand des Wissens

### 1.2.1 Extrazelluläre polymere Substanz

Bevor es zur Besiedlung einer Oberfläche mit Mikroorganismen in Lösung kommt, adsorbieren meist freie organische Makromoleküle und anorganische Substanzen darauf (z.B. Proteine, Polysaccharide, Salze). Die so gebildete Schicht wird als *conditioning film* bezeichnet und bereitet die Grundlage für eine effektive, mikrobielle Anheftung [Bazaka *et al.*, 2012; Donlan und Costerton, 2002; Herzberg, 2007; Loeb und Neihof, 1975]. Danach ist die Entstehung eines Biofilms in vier Phasen unterteilt [Characklis, 1990]. In der Anheftungsphase besiedeln planktonische Zellen die Oberfläche bzw. den *conditioning film* und heften sich zunächst reversibel, später irreversibel an (Abbildung 1-2, a). Dabei gelangen die Bakterien durch Sedimentation passiv [Karunakaran und Biggs, 2011] oder durch Flagellen- und Fibrienbewegungen aktiv an eine Trägeroberfläche [Pratt und Kolter, 1998]. In der anschließenden Reifungsphase I beginnt die Bildung der extrazellulären polymeren Substanz und Mikro- als auch Makrokolonien entstehen [Sauer *et al.*, 2002]. In der Reifungsphase II wird der vollständige Biofilm ausgebildet. Die letzte Phase, auch Dispersionsphase genannt, führt zur Ablösung einzelner Zellen oder ganzer Biofilmbereiche (*sloughing off*), welche an anderer Stelle neue Biofilme ausbilden können.

Die extrazelluläre polymere Substanz, kurz EPS genannt, ist die schützende Matrix der Mikroorganismen. Ein Biofilm besteht nur zu 2-5 % aus mikrobiellen Zellen, den restlichen Anteil umfasst die EPS [Kristensen *et al.*, 2008]. Deren Hauptkomponenten sind aktiv sekretierte Polysaccharide und Proteine. Auch Lipide, Phospholipide [Sutherland, 2001; Wingender *et al.*, 1999] sowie extrazelluläre DNA (eDNA) können maßgeblich am Aufbau beteiligt sein [Allesen-Holm *et al.*, 2006; Böckelmann *et al.*, 2006; Flemming und Wingender, 2010; Vilain *et al.*, 2009]. Je nach Art der vorrangig auftretenden Makromoleküle der EPS können polysaccharidreiche [Sutherland, 1999], proteinreiche [Frølund *et al.*, 1996], lipidreiche [Gehrke *et al.*, 1998] oder nukleinsäurereiche Biofilme [Palmgren und Nielsen,

1996] unterschieden werden. Die Zusammensetzung der EPS wird durch die Art der vorkommenden Bakterien bestimmt.

Des Weiteren können Huminstoffe [Pal und Paul, 2008; Wingender *et al.*, 1999] oder Huminähnliche Stoffe [Conrad *et al.*, 2003] sowie Zellulose [Flemming und Wingender, 2010] und Lektine [Tielker *et al.*, 2005] zur Strukturgebung beitragen. Durch die zahlreichen schwachen physikochemischen Wechselwirkungen zwischen den extrazellulären Makromolekülen entsteht ein stabiles Netzwerk mit großer Integrität [Mayer *et al.*, 1999]. Die Abbildung 1-2 b, d gibt einen Eindruck über mögliche Interaktionspartner innerhalb der EPS und die vorkommenden Wechselwirkungen sind unter Abbildung 1-2 c dargestellt.

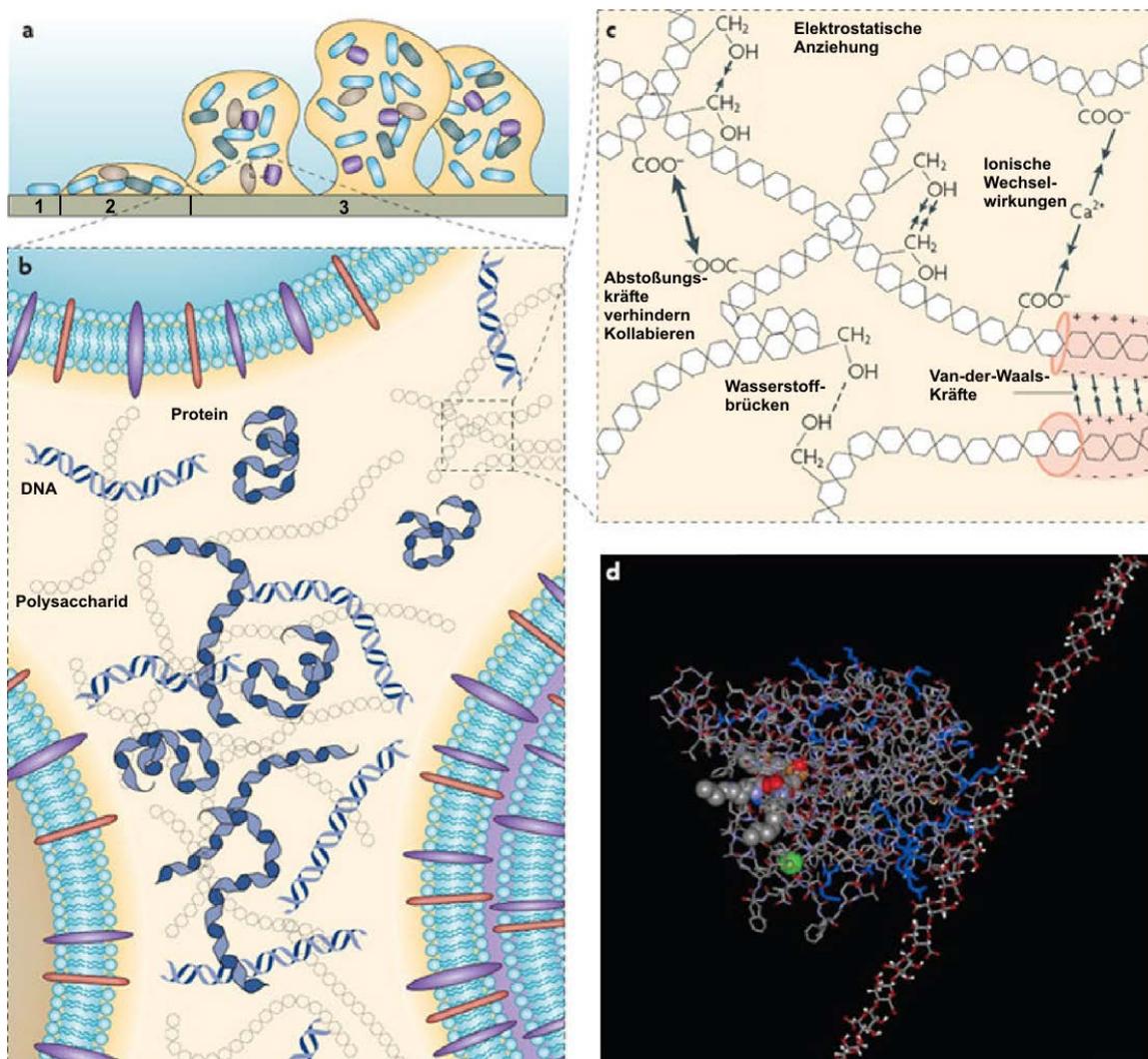


Abbildung 1-2: Die EPS-Matrix in verschiedenen Darstellungen. Adaptiert nach [Flemming und Wingender, 2010] **(a)** Modell der Anheftung eines bakteriellen Biofilms auf einer festen Oberfläche (1) und die Reifungsphasen I+II (2;3). **(b)** Die Hauptkomponenten der EPS, Polysaccharide, Proteine und DNA in inhomogener Verteilung **(c)** Mögliche physikochemische Wechselwirkungen und die Interaktion der Biopolymere, die maßgeblich an der Matrix-Stabilität beteiligt sind. **(d)** Interaktion zwischen dem Exopolysaccharid Alginat (rechts) und dem extrazellulären Enzym Lipase (links) aus *Pseudomonas aeruginosa*, dargestellt als molekulare Modell-Simulation. Stabilisiert wird das Aggregat durch die Interaktion zwischen den positiv geladenen Aminosäuren (AS) Arginin und Histidin (in blau) mit dem polyanionischen Alginat.

### 1.2.2 Enzymatische Biofilmbekämpfung

Die Verwendung von biologisch aktiven Substanzen zur Vermeidung oder Zerstörung von Biofilmen ist ein vielversprechender und relativ neuer Ansatz [Cordeiro *et al.*, 2011]. Bei der Recherche in einer *Online*-Datenbank für wissenschaftliche Publikationen, SciFinder®, nach den Begriffen *Biofilm* und *Enzyme* zwischen 1980 und 2013, ist ein deutlicher Anstieg der Veröffentlichungen innerhalb der vergangenen Dekade erkennbar (Abbildung 1-3).

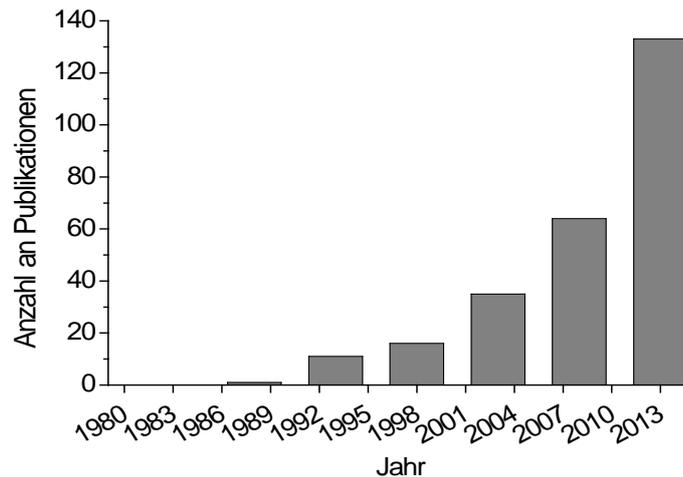


Abbildung 1-3: Anzahl an Publikationen mit den Schlagwörtern, *Biofilm* und *Enzyme*, von 1980 bis 2013. Ermittelt mit der *Online*-Datenbank Scifinder® copyright©2014 der *American Chemical Society*. Datum der Suche 25.Juli 2014.

Generell werden zwei Ansätze verfolgt, um das Problem des *Biofouling* zu bewältigen. Im ersten Ansatz soll der Biofilm nachträglich durch Enzympräparate zerstört werden, während im zweiten Ansatz der Aufbau des Biofilms grundsätzlich verhindert werden soll [Cordeiro und Werner, 2011; Kristensen *et al.*, 2008]. Die am häufigsten untersuchte Methode beschreibt den Einfluss kommerziell erhältlicher Enzympräparate auf den Abbau von Biofilmen [Augustin *et al.*, 2004; Leroy *et al.*, 2008a; Pettitt *et al.*, 2004; Zanaroli *et al.*, 2011]. Viele der Präparate enthalten jedoch Additive, die das Anheften der Mikroorganismen beeinflussen. Diese Zusatzstoffe können eine Maskierung enzymatischer Effekte hervorrufen [Cordeiro und Werner, 2011], was eine wissenschaftliche Aussage über den *Antifouling*-Effekt der enthaltenen Enzyme erschwert. Im zweiten Ansatz wird versucht, die Bildung des *conditioning film* und die bakterielle Adhäsion zu vermeiden [Cordeiro *et al.*, 2011; Tasso *et al.*, 2009b]. Eine weitere Möglichkeit, aktuelle Konzepte zur Unterbindung von *Biofouling* einzuordnen, ist die Unterteilung in direktes und indirektes *Antifouling* [Olsen *et al.*, 2007]. Zur Gruppe direkter *Antifouling*-Enzyme zählen solche, die aktiv am Abbau von Mikroorganismen oder deren extrazellulären Polymeren beteiligt sind. Beispiele hierfür sind Hydrolasen und Lyasen. Für indirektes *Antifouling* werden Enzyme oder Substanzen verwendet, die eine toxische Wirkung auf Mikroorganismen besitzen, z.B. Glucoseoxidase oder Haloperoxidase. Der Anwendungsbereich solcher Enzyme ist jedoch begrenzt.

In Tabelle 1-1 ist eine Übersicht der Enzymklassen gezeigt, die bislang zur Biofilmvermeidung angewendet wurden. Besonders die Enzymklasse der Hydrolasen wurde intensiv untersucht und gilt innerhalb der enzymatischen Biofilmbekämpfung als effektive biologische Alternative. Im Hinblick auf die zwei Ansätze zur Vermeidung von *Biofouling* wurden Hydrolasen bislang einerseits in löslicher Form und andererseits immobilisiert an Trägern oder in Farben eingesetzt. In der Mehrheit der Publikationen wurden die lösliche Anwendung und der Einschluß in Farben untersucht, während nur in wenigen Fällen Enzyme direkt an Trägeroberflächen gekoppelt wurden, um eine Besiedlung mit Mikroorganismen grundsätzlich zu unterbinden. Tabelle 1-1 gibt einen Überblick über die enzymatische Biofilmbekämpfung. Insbesondere die Klasse der Serinproteasen zeigte gute bis sehr gute Effekte im *Antifouling*. Am häufigsten wurden die Subtilisine, eine Untergruppe der Serinproteasen, erwähnt [Siezen und Leunissen, 1997]. Kommerzielle Subtilisinpräparate wie Savinase (*Bacillus lentus*), Alcalase (*Bacillus licheniformis*) oder Esperase (*Bacillus lentus*) zeigten die vielversprechendsten *Antifouling*-Eigenschaften [Cordeiro und Werner, 2011].

Pettitt et al. untersuchte den Einfluss der drei genannten Subtilisinpräparate auf die Besiedlung von Polystyrolplatten mit Makroalgen. Alcalase reduzierte die Adhäsion bzw. Ansiedlung um 87-93 % und Savinase um 42-71 % [Pettitt et al., 2004]. Leroy et al. konnten zeigen, dass Savinase den stärksten inhibitorischen Effekt auf die Adhäsion von *Pseudoalteromonas* sp. D41 an Polystyrolplatten und Glasobjektträgern hat [Leroy et al., 2008a; Leroy et al., 2008b]. Cordeiro et al. immobilisierten Subtilisin A auf Maleinsäureanhydrid aktivierten Polymeroberflächen und fanden eine um 44 % verminderte Besiedlung mit *Pseudomonas aeruginosa* [Cordeiro et al., 2011]. Auch Hangler et al. konnten durch den Einsatz von Subtilisin E und Esperase HPF gute *Antifouling*-Eigenschaften an einem multibakteriellen Biofilm nachweisen [Hangler et al., 2009]. Weiter konnten Argüello et al. zeigen, dass durch den Einsatz von Alcalase und anderer Enzympräparate, die maßgeblich Subtilisin enthielten, die Reinigungseffizienz von mit Proteinen verunreinigten Ultrafiltrationsmembranen bei >90 % liegt [Argüello et al., 2002; Argüello et al., 2003]. Auch bei der Bekämpfung von mikrobiell verursachter Zahn-Plaque wurde Alcalase bereits erfolgreich eingesetzt [Budtz-Jorgensen et al., 1983].

Die Enzymklasse der Esterasen besitzt neben den Serinproteasen ebenfalls ein hohes Potential in der Biofilmbekämpfung, weil extrazelluläre DNA in vielen bakteriellen EPS eine wichtige Rolle im Aufbau spielt [Qin *et al.*, 2007; Whitchurch *et al.*, 2002]. Besonders unspezifische Nukleasen sind zur Abbau geeignet. DNase I-haltige Sprays werden zum Beispiel in der Therapie von Mukoviszidosepatienten eingesetzt [Shak *et al.*, 1990]. Dadurch sollen Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* behandelt werden [Kaplan, 2009]. Mann *et al.* konnten die degradierende Wirkung von DNase I auf *Staphylococcus aureus*-Biofilme zeigen, welche besonders in den ersten 24 h der Wachstumsperiode sehr sensitiv gegen eine DNase I-Behandlung waren [Mann *et al.*, 2009]. Nijland *et al.* ist es gelungen, mit Hilfe löslicher Nuklease NucB aus *Bacillus licheniformis*, Biofilme verschiedener Bakterien aufzulösen [Nijland *et al.*, 2010].

Die an diesen Beispielen gezeigten positiven Effekte im Hinblick auf die Bekämpfung von Biofilmen und *Biofouling*, mithilfe von Serinproteasen und Esterasen soll der Hauptgrund für den Fokus der vorliegenden Arbeit darstellen.

Tabelle 1-1: Übersicht der bislang verwendeten Enzymklassen zur Vermeidung von *Biofouling* bzw. Biofilmbildung. Vergleich zwischen löslich eingesetzten Enzympräparaten und immobilisierten bzw. eingeschlossenen Enzymen (z.B. Farben). Adaptiert nach [Kristensen *et al.*, 2008].

EC-Nummer	Enzymklasse	Referenz	
		Löslich	Immobilisiert/ eingeschlossen
1	Oxidoreduktasen	1	1
1.1.3	Enzyme mit Sauerstoff als Akzeptor	3	3, 4
1.3	Aktiv an der CH-CH Gruppe des Donors	5	
1.10.3	Aktiv am Diphenol oder verwandten Substanzen als Donors	5	
1.11.1	Peroxidasen	5	6
2	Transferasen	1	1
2.6.1	Transaminase	7	
3	Hydrolasen	1, 2, 5, 7, 8	1, 2
3.1	Esterasen		2
3.1.1	Carboxylesterase	9, 10, 11, 12, 13	
3.1.3	Phosphatasen	15	15
3.2	Glycosylasen	5,	
3.2.1	Glycosidasen	2, 3, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18	2, 4,
3.4.11	Aminopeptidasen	12, 13	
3.4.17	Carboxypeptidasen		19
3.4.21-25	Endopeptidase,-Protease	8, 15, 20	
3.4.21	Serin-Endopeptidasen	10, 12, 13, 15, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	28, 29, 30
3.4.22	Cystein-Endopeptidasen	12, 31	
3.4.24	Metallo-Endopeptidasen	13	
3.5.1	Acylasen	2, 32, 33	2
4	Lyasen	1	1
4.2.2	Aktiv an Polysacchariden	34, 35, 36	
5	Isomerasen	1	1
6	Ligasen	1	1

1: [Hamade *et al.*, 1998], 2: [Hamade und Yamamori, 2000], 3: [Huijs *et al.*, 2006], 4: [Poulsen und Kragh, 2002], 5: [Johansen *et al.*, 1997] 6: [Dekker *et al.*, 1995], 7: [Barton, 2005], 8: [Marion, 2005], 9: [Aldridge *et al.*, 1994], 10: [Argüello *et al.*, 2003], 11: [Dobretsov *et al.*, 2007], 12: [Leroy *et al.*, 2008a], 13: [Pettitt *et al.*, 2004], 14: [Appendini und Hotchkiss, 1997], 15: [Allermann und Schneider, 2001], 16: [Kaplan *et al.*, 2004], 17: [Lee *et al.*, 2008], 18: [Loiselle und Anderson, 2003], 19: [Bonaventura *et al.*, 1999], 20: [Kolter und O'toole, 1999], 21: [Boles und Horswill, 2011], 22: [Chaignon *et al.*, 2007], 23: [Hangler *et al.*, 2009], 24: [Izano *et al.*, 2009], 25: [Molobela, 2010], 26: [Muñoz-Aguado *et al.*, 1996], 27: [Petrus *et al.*, 2008], 28: [Shi *et al.*, 2010], 29: [Cordeiro *et al.*, 2011], 30: [Tasso *et al.*, 2009b], 31: [Whittaker *et al.*, 1984], 32: [Dong, 2004], 33: [Yeon *et al.*, 2008], 34: [Manyak *et al.*, 2005], 35: [Boyd und Chakrabarty, 1994], 36: [Christensen *et al.*, 2001]

### 1.2.3 Proteasen

Proteolytische Enzyme, auch als Proteasen, Proteinasen oder Peptidasen bezeichnet, kommen in allen Organismen vor und sind an einer Vielzahl von physiologischen Reaktionen beteiligt. Industriell betrachtet machen Proteasen 35 % der gesamten Enzymproduktion aus [Cherry und Fidantsef, 2003]. Sie gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen und katalysieren die Hydrolyse der Peptidbindungen, durch die Aminosäuren miteinander verknüpft sind. Proteasen werden in sechs Untergruppen unterteilt: Serin-, Threonin-, Cystein-, Aspartat-, Glutamat- und Metalloproteasen [Rawlings *et al.*, 2013]. Sie besitzen oft eine geringe Substratspezifität gegenüber Proteinen und können sich sogar selbst verdauen (Autolyse) [Hehemann *et al.*, 2008]. Neben den natürlichen Substraten existiert mittlerweile eine große Palette synthetischer Substrate. In der Regel werden kleine Peptide verwendet, welche an N- oder C-terminaler Seite eine abspaltbare Gruppe tragen, die nach Hydrolyse direkt oder indirekt detektiert werden kann [Carter und Wells, 1988; Markland und Smith, 1971].

Serinproteasen spalten ihr Substrat über die katalytische Triade Serin-Histidin-Aspartat [Carter und Wells, 1988; Hedstrom, 2002]. Der Reaktionsmechanismus der Serin-Proteasen ist in Abbildung 1-4 dargestellt. Sie gliedern sich in zwei Unterkategorien: die Trypsin-ähnlichen und die Subtilisin-ähnlichen. Die Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen, kurz Subtilisine, werden meist durch die grampositiven Bakterien der Gattung *Bacillus* produziert, gehören zur Peptidase S8 Familie, besitzen Sequenzhomologien von >55 % [Siezen und Leunissen, 1997] und eine gute Stabilität über einen breiten pH-Bereich [Rawlings *et al.*, 2013].

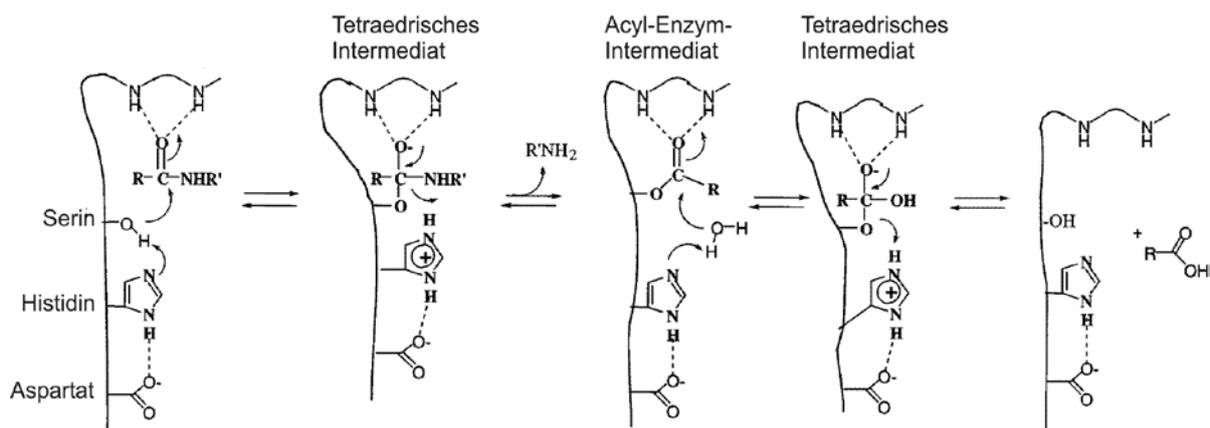


Abbildung 1-4: Hydrolyse von Peptidbindungen durch Subtilisin. Adaptiert nach [Hedstrom, 2002]. Das Polypeptidsubstrat bindet im aktiven Zentrum des Subtilisins. Das Serin attackiert nukleophil den Carbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung, unterstützt durch Histidin, das als generelle Base agiert. Das tetraedrische Intermediat wird gebildet. Das positiv geladene Histidin wird über eine Wasserstoffbrücke vom Aspartat und dem Oxyanion des tetraedrischen Intermediats stabilisiert. Die Peptidbindung zwischen Stickstoff und Kohlenstoff wird gebrochen. Das protonierte Histidin dient als Säure, wodurch das Acyl-Enzym-Intermediat gebildet wird. Histidin bindet ein Proton des Wassers und die Deacetylierung erfolgt, wodurch ein weiteres tetraedrisches Intermediat entsteht und zerfällt.

Subtilisine werden meist ins extrazelluläre Medium sekretiert, wozu sie eine native Signalsequenz besitzen. Außerdem werden sie in einer zymogenen Vorstufe exprimiert. So findet wie bei den meisten Subtilisinen nach der Sekretion eine autokatalytische Spaltung des Propeptids statt, welche die Protease in ihre aktive Form umwandelt [Ikemura und Inouye, 1988; Ikemura *et al.*, 1987]. Die Prosequenz dient weiter als intramolekulares Chaperon [Inouye, 1991; Li *et al.*, 1995]. Eine Ausnahme unter den Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen bildet die Proteinase K (PK). Sie wird im Gegensatz zu den bakteriellen Subtilisinen von einem Pilz produziert und weist fünf Cysteine auf [Betzel *et al.*, 1988]. Die PK gehört zu den effektivsten bekannten Endopeptidasen [Betzel *et al.*, 1986; Ebeling *et al.*, 1974; Müller *et al.*, 2002].

### 1.2.3.1 Proteinase K aus *Tritirachium album*

Die Serinprotease PK (EC 3.4.21.64) wird durch den Schlauchpilz *Tritirachium album*, auch *Engyodontium album* genannt, produziert und gehört zu den Subtilisinen. Sie stellt, aufgrund der vorhandenen Cysteine und des eukaryotischen Ursprungs, eine evolutionäre Weiterentwicklung bakterieller Subtilisine dar [Jany und Mayer, 1985].

Aufgrund der hohen Stabilität gegenüber chaotropen Substanzen und Detergenzien [Dolashka *et al.*, 1992] sowie Toleranzen bei Temperaturen bis zu 65 °C [Bajorath *et al.*, 1988] oder einem pH-Bereich zwischen 7,5 und 12,0 [Ebeling *et al.*, 1974] zählt die PK zu den Proteasen mit dem breitesten Anwendungsspektrum. In Anwesenheit von Urea oder Natriumdodecylsulfat (SDS) kann die Aktivität sogar gesteigert werden. Im Vergleich zur RNase I toleriert PK die zehnfache Dodecylsulfatkonzentration und wird erst bei 1 % SDS inhibiert [Hilz *et al.*, 1975]. Aufgrund ihrer Fähigkeit nicht nur denaturierte-, sondern auch native Proteine zu hydrolysieren, wird PK oft als molekularbiologisches Instrument eingesetzt. Unter anderem wird PK zur Isolation und Reinigung von, mit Proteinen bzw. Enzymen kontaminierter DNA oder RNA eingesetzt [Hilz *et al.*, 1975; Rao *et al.*, 1998]. Dadurch kann die Klonierungseffizienz von PCR-Ansätzen gesteigert werden [Crowe *et al.*, 1991]. PK wird weiterhin verwendet, um die inaktive Vorstufe der rekombinanten mikrobiellen Transglutaminase aus *E.coli* zu aktivieren [Marx *et al.*, 2007]. Auch der Einsatz in Bezug auf Biofilmbekämpfung hat gezeigt, dass PK eine sehr gute Alternative zu typischen Subtilisinpräparaten, wie Alcalase, darstellt und einen starken *Antifouling*-Effekt hat. Izano *et al.* zeigten sowohl eine Inhibierung der Biofilmbildung als auch ein signifikantes Ablösen von reifen *Haemophilus influenzae*-Biofilmen [Izano *et al.*, 2009]. Auch bei der PK-Behandlung von Biofilmen der pathogenen Bakterien *Staphylococcus haemolyticus* [Fredheim *et al.*, 2009] und *Staphylococcus aureus* [Boles und Horswill, 2008; O'Neill *et al.*, 2008] konnte ein inhibitorischer und degradierender Effekt gezeigt werden (50-90 %). Selbst die Biofilmmatrix von Pilzen wie *Candida albicans* und *Candida tropicalis* wurde durch den Einsatz von PK gestört [Al-Fattani und Douglas, 2006]. Zahlreiche weitere Veröffentlichungen zeigen die Einsatzmöglichkeiten von PK zur Biofilmbekämpfung. Abdelhady *et al.* und Nicholson *et al.*

verwendeten PK zur Reduktion von Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Biofilme [Abdelhady *et al.*, 2013; Nicholson *et al.*, 2013]. Ebenso konnten Seidl *et al.* und Chaignon *et al.* eine Verringerung von *Staphylococcus aureus*-Biofilmen beim Einsatz von PK zeigen [Chaignon *et al.*, 2007; Seidl *et al.*, 2008]. Bei der Untersuchung der strukturellen Integrität von Biofilmen immobilisierter Mikroorganismen führte eine PK-Behandlung zu signifikanter Desintegration [Xiong und Liu, 2013].

Die PK verdankt ihren Namen der Fähigkeit Haare, d.h. natives Keratin, abzubauen. Bevorzugt werden hydrophobe, aliphatische und aromatische Aminosäuren z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Alanin, Isoleucin, Valin und Leucin erkannt und C-terminal gespalten, weshalb die PK als sehr unspezifische Protease gilt [Kraus und Femfert, 1976; Morihara und Tsuzuki, 1975]. Im Entdeckungsjahr 1974 wurde für das globuläre Protein PK ein Molekulargewicht von 18,5 kDa bestimmt [Ebeling *et al.*, 1974]. Etwa ein Jahrzehnt später wurde das Molekulargewicht auf 29 kDa korrigiert [Bajorath *et al.*, 1988; Jany und Mayer, 1985]. Die dreidimensionale Struktur wurde bereits 1984 aufgeklärt [Pähler *et al.*, 1984]. Die AS-Sequenz besteht aus einem N-terminalen Signalpeptid mit 15 AS, einer Propeptid-Sequenz mit 90 AS und dem reifen Protein mit 279 AS [Ebeling *et al.*, 1974; Gunkel und Gassen, 1989] (die Nukleotid- und Aminosäuresequenz finden sich im Anhang 8.1.2). Die PK besteht aus sechs  $\alpha$ -Helices sowie 16  $\beta$ -Strängen, die antiparallel angeordnet sind und beinhaltet fünf Cysteine, von denen Cystein 34 und 123 sowie Cystein 176 und 249 jeweils eine Disulfidbrücke ausbilden (Abbildung 1-5). Das aktive Zentrum der PK beherbergt die katalytische Triade Aspartat 39, Histidin 69 und Serin 224. An der Substratbindung sind Glycin 100, Serin 101, Tyrosin 104, Serin 132, Leucin 133 und Glycin 134 beteiligt [Betzel *et al.*, 1988; Tao *et al.*, 2010]. Stabilisiert wird die PK über eine schwache- und eine starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung. Die schwache Bindung befindet sich in der Nähe des N- und C-Terminus (Threonin 16 und Aspartat 260) und die starke Bindung in Form einer pentagonalen Bipyramide zwischen Aspartat 200, Prolin 175 und Valin 177 [Betzel *et al.*, 1988]. Kalzium schützt vor Autoproteolyse und hat eine regulatorische Funktion bei der Substratbindung. Die Aktivität wird nur gering durch die Kalziumkonzentration beeinflusst [Muller *et al.*, 1994]. Bei völliger Abwesenheit von Kalzium sinkt die Enzymaktivität jedoch um bis zu 80 % [Bajorath *et al.*, 1988; Genov *et al.*, 1995]. *Tritirachium album* sekretiert neben der PK noch Proteinase R und Proteinase T [Samal *et al.*, 1991]. Deren enzymatische Aktivität ist signifikant geringer als die der PK [Kolvenbach *et al.*, 1990]. Die katalytische Effizienz von PK gegenüber einer Vielzahl synthetischer Substrate ist, im Vergleich zu den bakteriellen Subtilisinen, höher [Georgieva *et al.*, 2006].

Derzeit wird PK kommerziell über die Fermentation von *Tritirachium album* gewonnen (Merck Stamm 2429 und ATCC Stamm 22563) [Müller *et al.*, 2002]. Aufgrund der niedrigen Wachstumsrate, zahlreicher Fermentationszusätze, wie Magermilch, BSA oder Sojamehl und der schlechten genetischen Manipulierbarkeit sowie geringer Zelldichten [Ebeling *et al.*,

1974; Müller *et al.*, 2002; Samal *et al.*, 1990; Samal *et al.*, 1991], wurde dazu übergegangen PK heterolog in anderen Produktionsorganismen herzustellen.

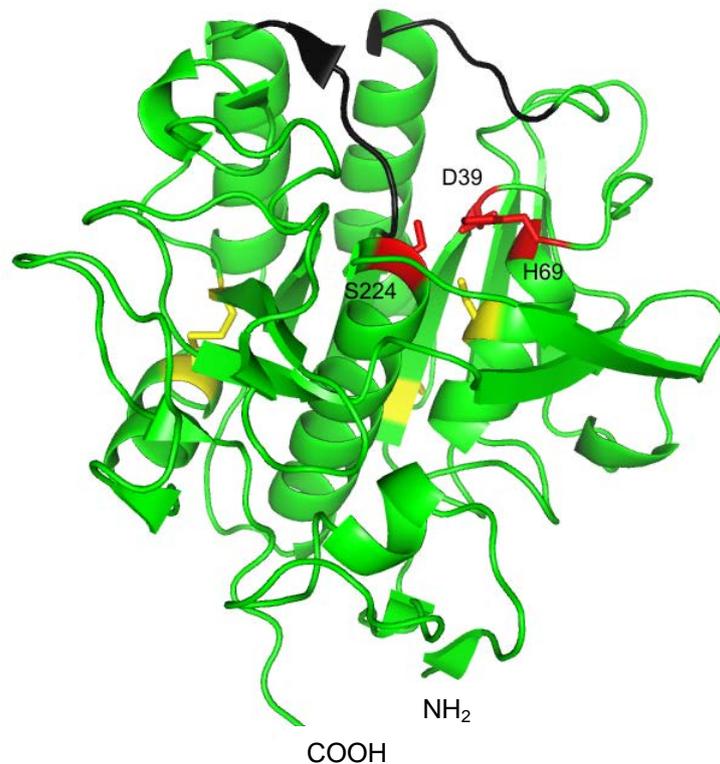


Abbildung 1-5: 3D-Struktur von Proteinase K: PDB: 2PKC [Müller *et al.*, 1994]; erstellt mit PyMOL 1.3. Grün: Cartoon-Darstellung der Tertiärstruktur. Rot: Kennzeichnung der katalytischen Triade aus D39, H69 und S224 als *sticks*. Schwarz: Markiert die Substratbindestelle aus zwei Segmenten: G100-Y104 und S132-G136. Gelb: Zeigt die Cysteine C34, C73, C123, C176 und C249 als *sticks*.

*E. coli* eignet sich zur heterolog rekombinanten Produktion von PK nur bedingt. Zum Einen, weil PK wegen ihrer physiologischen Toxizität zum Zelltod führt und zum Anderen, weil der Großteil als inaktive *inclusion bodies* gebildet wird [Gunkel und Gassen, 1989]. Hinzu kommt die Schwierigkeit der notwendigen Sekretion in das Periplasma (oxidierendes Zellkompartiment), um die Disulfidbrückenausbildung zu gewährleisten, wodurch das Expressionslevel eher gering ist [Gunkel und Gassen, 1989; Larsen *et al.*, 2006]. Auch der Versuch von Liao *et al.*, verschiedene PK-Varianten in *E. coli* zu produzieren, führte zu Volumenaktivitäten von unter 1 U/L Kulturmedium [Liao *et al.*, 2007]. Samal *et al.* gelang nur die Produktion inaktiver Proteinase T (1 mg/mL) [Samal *et al.*, 1989]. Ein weiterer kommerzieller Ansatz zur PK-Gewinnung besteht in der heterologen Produktion in der Hefe *Pichia pastoris* (Thermo Scientific, # EO0491). Die Firma Roche besitzt ein Patent sowohl zur Produktion in *Pichia pastoris* [Müller *et al.*, 2002] als auch in *E. coli* [Müller *et al.*, 2008]. Die Verfügbarkeit einer PK-Variante für eine zielgerichtete Immobilisierung (Kapitel 1.2.5) ist nicht gegeben. Mittlerweile wird *Pichia pastoris* X33 unter dem Namen *Komagataella phaffii* geführt [Huang *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 1995]. Aufgrund der langjährigen Nutzung und der Verwendung der alten Bezeichnung in der Mehrheit aller Publikationen, wird im Folgenden weiter die alte Bezeichnung *Pichia pastoris* X33 verwendet.

## 1.2.4 Nukleasen

Nukleasen gehören wie die Proteasen zur Enzymklasse der Hydrolasen. Dabei spalten sie vorwiegend Phosphodiesterbindungen zwischen Nukleotiduntereinheiten, weshalb sie zu der Kategorie der Esterasen gehören (EC 3.1). Nukleasen werden in zwei Klassen eingeteilt. Während Exonukleasen Nukleinsäuren 5' oder 3' endständig abbauen, spalten Endonukleasen intern. Als Substrate dienen einzel- und/oder doppelsträngige DNA- und/oder RNA-Moleküle. Einige Nukleasen, z.B. Restriktionsenzyme, sind hoch sequenzspezifisch, während andere sequenzabhängig spalten. Linn und Arber isolierten 1968 ein Enzym aus *E. coli*, welches die Phagenvermehrung im Bakterium unterbindet und bezeichneten dieses Enzym als Restriktionsnuklease [Linn und Arber, 1968]. Heutzutage werden Nukleasen als vielseitige analytische Werkzeuge in der Molekularbiologie oder zur Aufklärung von Nukleinsäurestrukturen eingesetzt [Reddy und Shankar, 1993]. Berlin *et al.* verwendeten immobilisierte alkalische Phosphatase zur Analyse synthetischer Deoxyoligoribonukleotide [Berlin *et al.*, 1974]. Knorre *et al.* setzten immobilisierte Phosphodiesterase aus Schlangengift zur Aufklärung von 5'-Enden von Oligonukleotiden ein [Knorre *et al.*, 1973]. In der Industrie wird die P1-Nuklease für die Produktion von Geschmacksverstärkern (5'GMP) eingesetzt und in Kombination mit Adenosindeaminase zur Produktion von Mononukleotiden verwendet [Gutcho, 1970]. Auch in der Krebsforschung erlangen Nukleasen zunehmend an Bedeutung [Bartosova und Krejci, 2014]. Die extrazelluläre Nuklease aus *Staphylococcus aureus* wird aufgrund ihrer sequenzabhängigen Spaltung meist zur Proteinpräparation verwendet, d.h. zum Abbau von Nukleinsäuren in Proteinlösungen. Michalon *et al.* benutzten diese Nuklease immobilisiert an Polystyrolkugeln, um Chromatinstrukturen aufzuklären [Michalon *et al.*, 1993].

### 1.2.4.1 Nuklease aus *Staphylococcus aureus*

Die Nuklease aus *Staphylococcus aureus* (EC 3.1.31.1) ist eine intensiv untersuchte extrazelluläre Phosphodiesterase, welche sowohl DNA als auch RNA hydrolysiert und dadurch Dinukleotide und 3'-Mononukleotide erzeugt (Abbildung 1-6) [Cone *et al.*, 1971]. In der Literatur wird sie meist unter den Namen *staphylococcal nuclease* oder *micrococcal nuclease* geführt. Weitere Bezeichnungen sind SNase, S7-Nuklease, V8-Nuklease oder Foggi-Nuklease, bezogen auf *Staphylococcus aureus* Stämme. Die verwirrende Namensgebung begründet sich aus der von Alex Ogston 1883 eingeführten Nomenklatur [Ogston, 1882]. Er bezeichnete mit dem Begriff *Staphylococcus* eine Gruppe von Mikrokokken die Entzündungen und Vereiterungen hervorriefen. 1886 wurde durch den deutschen Hygieniker Carl Flügge der Genus *Staphylococcus* von dem des *Micrococcus* getrennt [Flügge, 1886]. Die Genera wurden darauf später wieder in der Familie der *Micrococcaceae* vereint. In der vorliegenden Arbeit wird die *micrococcal nuclease* unter der Bezeichnung MicNuc verwendet.

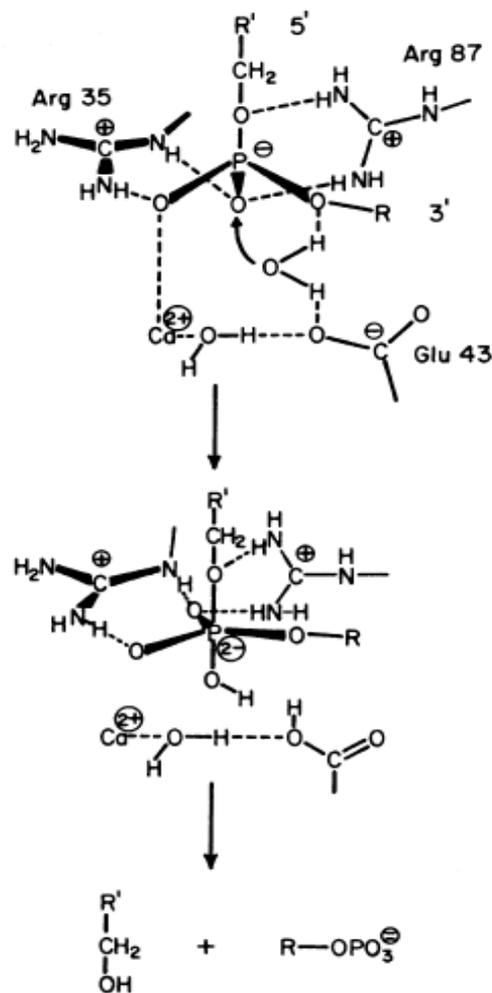


Abbildung 1-6: Der Hydrolysemechanismus der MicNuc [Cotton *et al.*, 1979]. Der nukleophile Angriff des H<sub>2</sub>O-Moleküls zwischen Glu 43 und dem O<sub>2</sub>-Atom des 5'-Phosphats wird begünstigt, durch die Interaktion zwischen dem 5'-Phosphat, Kalzium- und dem Guanidiniumion von Arg 35 und Arg 87.

Bereits kurz nach der Entdeckung der MicNuc durch Cunningham *et al.* [Cunningham *et al.*, 1956] wurde vermutet, dass sie am Abbau der bakteriellen EPS beteiligt ist [Catlin und Cunningham, 1958]. Neuere Untersuchungen konnten das hohe *Antifouling*-Potential der MicNuc am Beispiel *Staphylococcus aureus*- und *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmprävention zeigen [Tang *et al.*, 2011].

Anfinsen *et al.* konnten 1971 sowohl die AS-Sequenz, als auch den katalytischen Mechanismus und die Struktur des aktiven Zentrums aufklären [Anfinsen *et al.*, 1971]. Der Proteinvorläufer besteht aus 231 AS, darunter ein 26 AS langes Signalpeptid und zwei Untereinheiten, Nuklease A (149 AS) und Nuklease B (168 AS). Während Nuklease B membranständig vorkommt, ist die eigentlich aktive und sekretierte Form, Nuklease A. Nuklease A ist ein kleines globuläres Enzym mit einem Molekulargewicht von 16,8 kDa [Cotton *et al.*, 1979; Tucker *et al.*, 1978] und besteht aus fünf  $\beta$ -Strängen und drei  $\alpha$ -Helices

[Ye *et al.*, 2000]. Nach der Aufklärung der sekundären Protein-Struktur durch die Arbeitsgruppe von Cotton 1979 (Abbildung 1-7), konnte Shortle 1983 das Nuklease A-Gen in *E. coli* klonieren [Shortle, 1983] und exprimieren [Shortle, 1986; Takahara *et al.*, 1985]. Ein Analogon der Nuklease A ist die Nuklease R mit 17,5 kDa (Anhang 8.1.1). Sie verfügt N-terminal zusätzlich über ein Hexapeptid, welches einem Teil der Nuklease B entspricht und weist die gleiche Aktivität wie die Nuklease A auf [Jing *et al.*, 1992]. Diese MicNuc-Variante, Nuklease R, wurde zu den durchgeführten Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit verwendet.

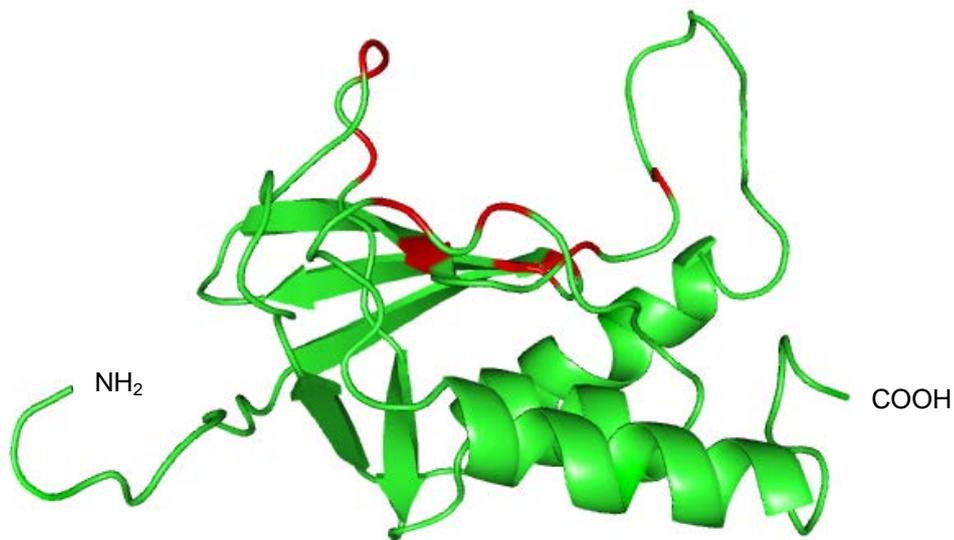


Abbildung 1-7: 3D-Struktur von Nuklease A: PDB: 1SNS [Cotton *et al.*, 1979], erstellt mit PyMOL 1.3. Grün: Cartoon-Darstellung der Tertiärstruktur. Rot: Kennzeichnung der AS, die am katalytisch aktiven Zentrum beteiligt sind.

Die Aktivität der MicNuc ist kalziumabhängig. Die optimale Kalzium-Konzentration für DNase- und RNase-Aktivität liegt bei 10 mM. Ohne Kalzium oder bei zu hohen Konzentrationen wird die Aktivität stark inhibiert [Cuatrecasas *et al.*, 1967a]. MicNuc ist sehr hitzestabil [Cuatrecasas *et al.*, 1967b] und Natriumchlorid kann aktivitätssteigernd wirken [Udou und Ichikawa, 1980]. MicNuc besitzt eine höhere Affinität zu DNA als zu RNA. Ihre Aktivität ist größer bei hitzedenaturierter DNA, als bei nativer DNA und auch größer bei einzelsträngiger DNA, als bei doppelsträngiger DNA [Cuatrecasas *et al.*, 1967b]. MicNuc wird kommerziell durch die Fermentation von *Staphylococcus aureus* oder rekombinant in *E. coli* produziert. Die Expression der rMicNuc erfolgt überwiegend als *inclusion bodies* im Cytoplasma und erfordert eine anschließende Proteinrückfaltung [Jing *et al.*, 1992; Ye *et al.*, 2000]. Takahara *et al.* gelang die überwiegend lösliche Expression mittels Sekretionssignal ins Periplasma [Takahara *et al.*, 1985]. Die am häufigsten verwendeten Promotoren sind über Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) oder Temperaturänderung induzierbar.

### 1.2.5 Immobilisierung von Enzymen

Der Einsatz immobilisierter Enzyme gehört zu den Standardmethoden im industriellen Maßstab. Sie finden Anwendung zur Synthese von Feinchemikalien, in der Pharmazie [Sheldon, 2007] sowie in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie [Hasan *et al.*, 2006; Kirk *et al.*, 2002]. Proteasen werden z.B. in Waschmitteln eingeschlossen [Cherry und Fidantsef, 2003] oder an Kontaktlinsen immobilisiert, um Eiweißpartikeln zu entfernen [Kumar und Takagi, 1999]. Die Strategie der Enzymimmobilisierung ermöglicht eine ökonomische Wiederverwendbarkeit von Enzymen und liefert oft eine Verbesserung der enzymatischen Stabilität [Guisan *et al.*, 1993; Reddy und Shankar, 1993; Wang *et al.*, 2001], Selektivität oder Aktivität [Marin-Zamora und Rojas-Melgarejo, 2006; Mateo *et al.*, 2007]. Zudem können neue Anwendungsfelder erschlossen werden, wie der Einsatz immobilisierter Enzyme in der Biosanierung [Bizily *et al.*, 1999] oder der *Biofouling*-Prävention [Dobretsov *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2007].

Die meisten Immobilisierungsmethoden zur Proteinkopplung an feste Träger basieren auf einer unspezifischen Adsorption oder der natürlich auftretenden Reaktion von funktionellen Gruppen auf der Proteinoberfläche, mit geeigneten funktionellen Gruppen auf der Trägeroberfläche [Camarero, 2008; Lee *et al.*, 2002]. In Abbildung 1-8 ist eine Übersicht über generelle Methoden zur Enzymimmobilisierung dargestellt. Durch diese Kopplungen werden Enzyme meist in zufälliger Orientierung an Oberflächen immobilisiert, was zum Verlust der biologischen Aktivität führen kann [Hanefeld *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2009]. Eine Enzymimmobilisierung ist nur dann wirklich sinnvoll, wenn die Aktivität des Enzyms erhalten bleibt. Zielgerichtete Immobilisierung ist somit von besonderem Interesse (Abbildung 1-9).

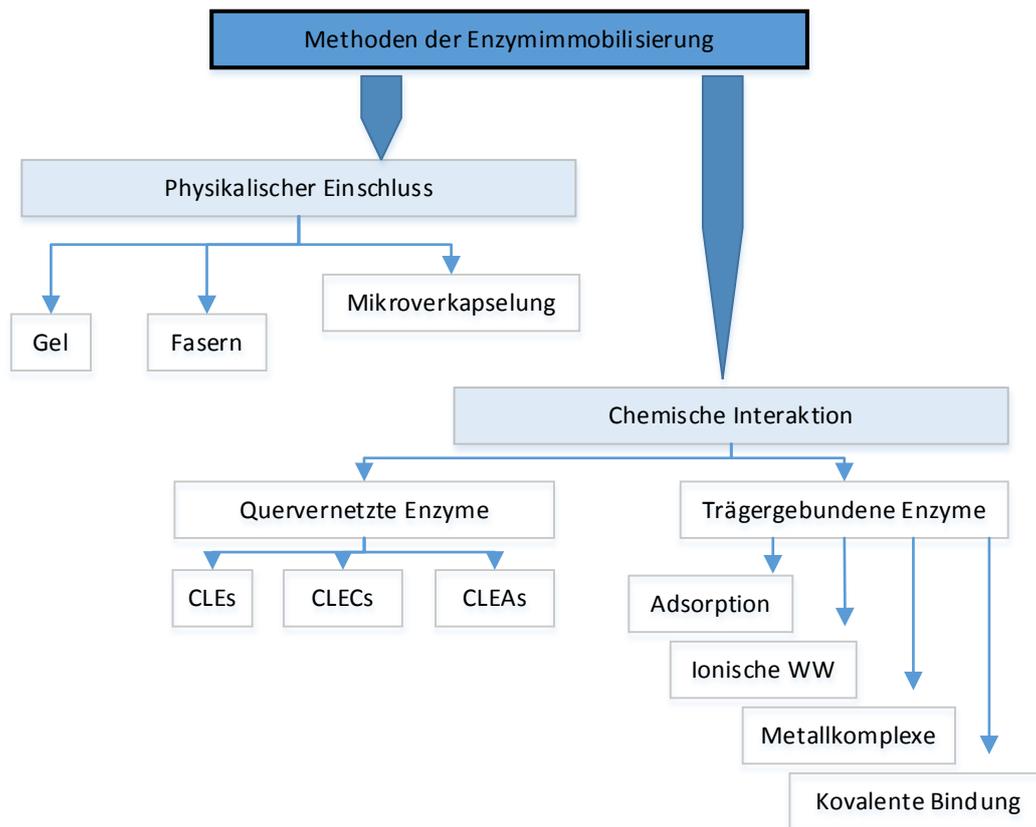


Abbildung 1-8: Übersicht über trägergebundene Enzymimmobilisierung und andere Immobilisierungsstrategien. Adaptiert nach [Cantone *et al.*, 2013]. CLEs: *cross-linked enzymes*; CLECs: *cross-linked enzyme crystals*; CLEAs: *cross-linked enzyme aggregates*.

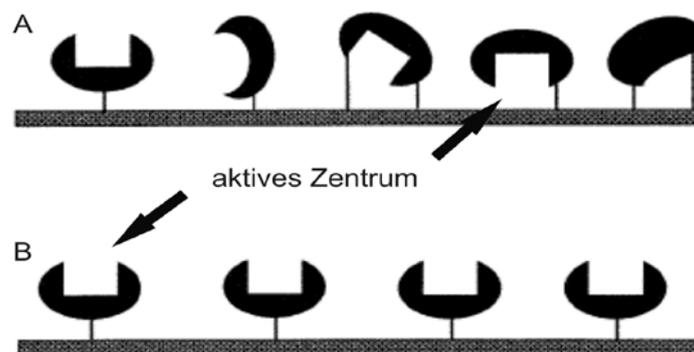


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung der ungerichteten und zielgerichteten Proteinimmobilisierung. Adaptiert nach [Wang *et al.*, 2001]. **(A)**: Ungerichtete Immobilisierung bei der das aktive Zentrum des Enzyms teilweise oder vollständig blockiert ist. **(B)**: Zielgerichtete Immobilisierung mit freiem Zugang für das Substrat zum aktiven Zentrum.

Mithilfe von molekularbiologisch eingeführten Peptid-*tags* oder speziellen Aminosäuren ist es möglich, gezielte Ausrichtungen von Enzymen auf Trägern zu erzeugen, welche eine wiederholte Kopplung ermöglichen [Wong *et al.*, 2009]. Es ist bekannt, dass besonders durch die Bindung eines Enzymmoleküls über mehrere Interaktionen (*multipoint attachment*) eine Verbesserung der Enzymstabilität eintritt [Cowan und Fernandez-Lafuente, 2011; Hernandez und Fernandez-Lafuente, 2011; Mateo *et al.*, 2007].

Bezogen auf die Biofilmbekämpfung wurde gezeigt, dass immobilisierte Subtilisine besonders effektiv sind [Regina *et al.*, 2012; Tasso *et al.*, 2009a]. Der Einsatz von MicNuc und anderer DNasen hatte einen positiven *Antifouling*-Effekt. Nukleasen wurden jedoch bisher nur in löslicher bzw. nicht-immobilisierter Form zur Biofilmbekämpfung eingesetzt [Mann *et al.*, 2009; Tang *et al.*, 2011].

Weitere Immobilisierungsversuche mit Subtilisinen [Huang *et al.*, 1997; Viswanath *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001] und Nukleasen [Alcantara *et al.*, 1988; Guisan *et al.*, 1993; Michalon *et al.*, 1993], zeigten eine verbesserte Stabilität sowie enzymatische Aktivität und bestärken den Einsatz enzymgekoppelter Oberflächen damit.

### 1.3 Motivation

Da Biofilme in vielen industriellen und medizinischen Anwendungen zu Problemen und erhöhten Kosten führen, besteht ein enormes wirtschaftliches Interesse daran, *Biofouling* zu vermeiden [Bereschenko *et al.*, 2011; Dobretsov *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2005]. Im Hinblick auf Umweltbewusstsein und Nachhaltigkeit sollte der Einsatz von Bioziden und Chemikalien durch Verwendung biologisch aktiver und weitgehend unbedenklicher Biokatalysatoren abgelöst werden. Dabei ist von besonderem Interesse, Mikroorganismen bereits an der Besiedlung von Oberflächen zu hindern und den Aufbau einer EPS zu erschweren bzw. zu vermeiden. Ebenso sollte die Entstehung des *conditioning film* verhindert werden. Da sowohl lebende als auch abgetötete Zellen an Oberflächen adhäsieren, führt die nachträgliche Abtötung von Mikroorganismen zu keiner Inhibition von Biofilmen [Flemming, 1995b]. Die Bekämpfung der Biofilmbildung zu Beginn könnte eine neue und vielversprechende Methode zur Vermeidung von Biofilmen sein. Es konnte bereits an Beispielen gezeigt werden, dass, mit Enzymen immobilisierte Oberflächen, das Anheften und Bewachsen mit Mikroorganismen stark verlangsamen oder verhindern [Cordeiro *et al.*, 2011; Tasso *et al.*, 2009b].

Je nach Aufbau der EPS verschiedener Bakterien, besitzen einige Enzyme positive *Antifouling*-Eigenschaften. Besonders vielversprechend zeigte sich eine Untergruppe der Serinproteasen, die Subtilisine. Ein Vertreter dieser Klasse, die PK, ist eine der aktivsten bekannten Endopeptidasen, mit hoher Stabilität und Toleranz gegenüber Detergenzien, Temperatur und pH-Wert. Der Einsatz in löslicher Form bestätigte bereits das Potential als Antibiofilmagens. Bislang ist die kommerzielle PK nur unmodifiziert erhältlich und deshalb nicht für eine zielgerichtete Immobilisierung geeignet. Zudem bietet die wiederholte Nutzung von Enzymen in der Biofilmvermeidung großes Potential. Bislang wurde PK ungerichtet an Acrylatpolymere (Eupergit® C) immobilisiert [Boller *et al.*, 2002; Knezevic-Jugovic *et al.*, 2011]. Die Produktion von Eupergit® C wurde allerdings eingestellt, Restbestände sind bei Sigma-Aldrich® unter der Bestellnummer 82452 zu erwerben. Darüber hinaus wurde PK

ungerichtet an mit Carboxylgruppen beschichteten magnetischen Partikeln über 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysulfosuccinimid immobilisiert und die Aktivität anhand N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilid Umsatz nachgewiesen [Slováková et al., 2008]. Die zielgerichtete Immobilisierung von PK wurde bisher nicht gezeigt und auch das *Antifouling*-Potential immobilisierter PK wurde nicht untersucht. Bis auf die Produktion rekombinanter PK-Varianten mit C-terminalem 6xHis-tag in *E. coli* (Enzymaktivitäten 0,1-1 U/L Kulturmedium) [Liao et al., 2007] gibt es bislang keine andere Publikation über die rekombinante Produktion von PK mit Peptid-tag.

Eine zweite äußerst vielversprechende Enzymklasse zur Biofilmbekämpfung ist die der Esterasen bzw. Nukleasen. Die MicNuc wurde bereits erfolgreich zur Prävention von *Staphylococcus aureus*- und *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen eingesetzt [Tang et al., 2011]. Es wurden jedoch keine *Antifouling*-Untersuchungen mit MicNuc immobilisierten Oberflächen durchgeführt. Bis auf die Arbeiten von Yuanhe et al. wurde MicNuc bisher ohne weitere Peptid-tags oder andere Modifikationen hergestellt, welche eine zielgerichtete Immobilisierung ermöglichen würden. Yuanhe et al. konnten eine rMicNuc mit N-terminalem 6xHist-tag in *E. coli* produzieren [Yuanhe et al., 1997]. Kommerziell erhältlich sind homolog oder rekombinant produzierte MicNuc-Varianten.

Aufgrund der inhomogenen Zusammensetzung der EPS ist es sinnvoll mehr als eine Enzymklasse für die Biofilmbekämpfung zu verwenden. Laut Olsen et al. sollen mindestens zwei Klassen von Enzymen beteiligt sein, um eine gute *Antifouling*-Wirkung zu gewährleisten [Olsen et al., 2007]. Der mögliche Einsatz löslicher PK und DNase I zur Biofilmdegradation, zeigt das Potential beider Enzymklassen im Bezug auf *Antifouling* [Fredheim et al., 2009; Izano et al., 2009; Madhyastha et al., 2009].

## 1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die rekombinante Herstellung von aktiver PK und MicNuc. Beide Enzyme sollten C-terminal mit einem Histidin-*tag* versehen werden, um sowohl die chromatographische Aufreinigung als auch eine zielgerichtete Immobilisierung zu ermöglichen. Des Weiteren sollten im Fall der PK bereits vorhandene Cysteine in der AS-Sequenz auf die Möglichkeit zur zielgerichteten Immobilisierung untersucht werden. Im Fall der rMicNuc wurden, auf Basis rationalen Proteindesigns, neue Cysteine ins Protein eingeführt. Im Anschluss an die Produktion sollten beide Enzyme und deren Varianten auf eine zielgerichtete und wiederholte Immobilisierung an geeigneten Trägern untersucht werden. Im Besonderen sollten poröse Träger aufgrund ihrer großen Oberfläche, einfachen Handhabung und verschiedener kommerziell erhältlicher Oberflächenmodifikationen für diese Untersuchungen eingesetzt werden. Im Vordergrund der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung auf eine generelle Immobilisierbarkeit, Ausbeute, wiederholte Nutzung und die trägergebundene Aktivität sowie die Lagerstabilität. Anschließend sollten erste Untersuchungen von Oberflächen, die mit rPK und rMicNuc beschichtet waren, auf die Besiedlung mit *Pseudomonas fluorescens* durchgeführt werden. Die Auswertung sollte mit bildgebenden Methoden durchgeführt werden. Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen das *Antifouling*-Potential von MicNuc sowie PK und generell die Nutzung von immobilisierten Enzymen zur Biofilmprävention zu verstehen und neue Enzymvarianten für ein breites Anwendungsspektrum hervorzubringen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Alle verwendeten Gerätschaften mit Herstellernamen sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt.

Tabelle 2-1: Übersicht der verwendeten Geräte und deren Anbieter.

Bezeichnung	Gerätebezeichnung	Anbieter
Autoklav	Varioklav, Dampfsterilisation	H+P Labortechnik GmbH
Äkta	Äkta Explorer	Amersham Bioscience
Bioreaktor und Zubehör	Biostat C	B.Braun Biotech International, Sartorius Stedim Biotech
Brutschrank	n/a	Binder
Elektrophorese	<i>Electrophoresis Power Supply</i> EPS 301	Amersham Biosciences
	<i>Mighty Small II for 8x7 cm Gels</i>	Amersham Biosciences
	<i>HE 33 mini horizontal submarine unit</i>	Amersham Biosciences
	<i>The Unleadable Horizontal minigel system</i>	Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH
	<i>Semi-Dry-Blotter</i>	Biostep®
Elektroporator	<i>Electroporator</i> 2510	Eppendorf AG
Feinwaage	APX-100	Denver Instrument (Satorius AG)
Flow Box	Flow Box NUAIR, Biological Safety Cabinet	Zapf Instrument Sarstedt Deutschland
Geldokumentation	<i>Gene Genius Bio Imaging System</i>	VWR International
Hochdruckhomogenisator	EmulsiFlex-C5	Avestin
Leitfähigkeitsmessgerät	Qcond 2200	VWR International GmbH
Magnetrührplatte	Variomag Mono	Thermo Scientific
Massenspektrometer	LTQ Orbitrap XL™ Hybrid Ion Trap- Orbitrap Massenspektrometer	Thermo Scientific
Mikroskop	Leica TCS SL-CLSM	Leica
PCR	<i>T-Personal</i>	Biometra®
	<i>T-Professional Basic Gradient</i>	Biometra®

Bezeichnung	Gerätebezeichnung	Anbieter
pH-Meter	FE20 – FiveEasy™ pH	Mettler Toledo
Photometer	<i>Ultrospec™</i> 3300 pro <i>Genesys 6</i> <i>FLUOstar Galaxy</i>	Amersham Biosciences Thermo Spectronic BMG LabTechnologies GmbH
Pipetten	0,1-2,5 µL Research 0,5-10 µL Research 2-20 µL Research 10-100 µL Research 20-200 µL Research 100-1000 µL Research 500-5000 µL Research	Eppendorf AG Eppendorf AG Eppendorf AG Eppendorf AG Eppendorf AG Eppendorf AG Eppendorf AG
Pipetten Multi (8x)	100 µL Research Plus 300 µL Research Plus	Eppendorf AG Eppendorf AG
Rollermixer	SRT1 Roll Mixer TMT BR1 Premiere	Bibby Stuart Scientific OCS.tec GmbH&Co.KG
Schlauchpumpe	Typ 101 U/R	Watson Marlow
Schüttler	Roll Mixer Wippschüttler Rocky RT-1S Multitron II Innova 4230 <i>Thermomixer comfort</i> Orbitalshaker PSU-10i <i>Lab dancer</i>	Premiere® Rocky® Infors HT AG New Brunswick Scientific Eppendorf AG Grant Bio IKA®
Thermostat	DC 10	Thermo Haake
Trockenschrank	Model 100-800	Memmert GmbH & Co. KG
Ultrafiltrationsanlage	MSP007888 CUF 0,1 m²	Millipore
Zentrifugen	<i>Avanti™</i> J-30 I <i>Centrifuge</i> <i>Concentrator</i> 5301 <i>Centrifuge</i> 5810 R <i>Centrifuge</i> 5415 R Schnellzentrifuge Z41G	Beckman Coulter™ Eppendorf AG Eppendorf AG Eppendorf AG Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH

## 2.2 Sonstige Materialien

In Tabelle 2-2 sind zusätzlich verwendete Materialien und Kleinstrumente mit Anbieter aufgelistet.

Tabelle 2-2: Übersicht weiterer verwendeter Materialien.

Material	Anbieter
0,5 mL <i>Microtubes</i>	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH
1,5 mL <i>Microtubes</i>	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH
2,0 mL <i>Microtubes</i>	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH
10 µL ZipTip mit 0,6 µL C <sub>18</sub> -Silicamatrix	Merk Millipore
10 - 0,1 µL epT.I.P.S Standard	Eppendorf AG
1000 - 100 µL epT.I.P.S Standard	Eppendorf AG
200 - 10 µL epT.I.P.S Standard	Eppendorf AG
300 - 20 µL epT.I.P.S Standard	Eppendorf AG
5000 - 500 µL epT.I.P.S Standard	Eppendorf AG
15 mL Röhrchen	Greiner bio-one
50 mL Röhrchen	Greiner bio-one
6x MTP Multiwell-Zellkulturplatten	Falcon®
96x MTP BD <i>Microtest™ Flat Bottom</i> (transparent)/ 200 µL	Falcon®
96x DW MTP <i>Deepwell</i> Platten / 2000 µL	Eppendorf AG
BioTrace™ NT Nitrozellulose Transfermembran	PALL Corporation
<i>Breathseal</i>	Greiner bio-one
Dialyseschlauch Spectra/POR 6-8 kDa	Spectrum laboratories Inc.
<i>Electroporation Cuvette</i> (1 mm, 2 mm)	Eppendorf AG
<i>Gas Permeable Adhesive Seals</i>	Thermo Scientific
Gel-Blotting-Papiere (Dicke: 1,5 mm)	Carl Roth®
<i>GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit</i>	Thermo Scientific
Glasfritte Por4/ G4	n/a
Hybridisierungsflaschen (L: 150 mm)	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH
Kryoröhrchen (2 mL, steril)	Carl Roth®
<i>Kvick Lab Cassette</i> UFELA0010010ST	GE Healthcare
MSB® <i>Spin PCRapace Kit</i>	Invitak
PD-10 Säule	GE-Healthcare
PP-Folien (A: 100 cm <sup>2</sup> )	Fraunhofer IGB (Dr. J. Barz; Stuttgart)
PP-Spritzen 2 mL (PE-Filtereinsatz)	MultiSynTech GmbH

Material	Anbieter
Ratiolab® Küvetten, Halbmikro, PS (1 mm)	Ratiolab® GmbH
Rundkanüle Sterican Ø 0,8x22 mm	B.Braun Melsungen AG/ Carl Roth®

## 2.3 Chemikalien

Folgende Chemikalien und Enzyme wurden für die Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien verwendet (Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3: Übersicht sämtlicher Chemikalien bzw. Enzyme und deren Anbieter.

Chemikalie (Reinheit)	Anbieter
2-Mercaptoethanol (reinst)	Serva
6x Loading Dye Solution	Thermo Scientific
Acrylamid, 2x Krist. (≥ 98 %)	Carl Roth®
Agar – Agar, Kobe I	Carl Roth®
AgNO <sub>3</sub> (≥ 99,9 %)	Carl Roth®
Ammoniumsulfat	Carl Roth®
Ampicillin	AppliChem GmbH
APS (≥ 98 %)	Carl Roth®
ATS	GE Healthcare
Biotin	Carl Roth®
Brillant Blau G 250	Carl Roth®
Brillant Blau R 250	Carl Roth®
Bromphenolblau, Natriumsalz	Carl Roth®
BSA	Fluka BioChemika
CaCl <sub>2</sub> 2xH <sub>2</sub> O	Carl Roth®
CaSO <sub>4</sub>	Carl Roth®
CoCl <sub>2</sub>	Fluka
CuSO <sub>4</sub> 5xH <sub>2</sub> O	Merck
D-(+)-Biotin (≥ 98,5 %)	Carl Roth®
dATP dCTP dGTP dTTP	Thermo Scientific
DMSO (≥ 99,9 %)	Sigma-Aldrich®
DNA-Natriumsalz (Heringssperma)	Sigma-Aldrich®
<i>Dpnl</i>	Thermo Scientific
D-Sorbit (≥ 98 %)	Carl Roth®
DTT	Carl Roth®
<i>EcoRI</i>	Thermo Scientific

Chemikalie (Reinheit)	Anbieter
Essigsäure (100 %)	Carl Roth®
Ethanol Rotipuran® (≥ 99,8 %)	Carl Roth®
Ethidiumbromidlösung (1 %, 10 mg/mL)	Carl Roth®
<i>Fast AP</i>	Thermo Scientific
FeSO <sub>4</sub> 7xH <sub>2</sub> O	Carl Roth®
Formaldehyd Rotipuran® (≥ 37 %)	Carl Roth®
<i>GeneRuler™ DNA Ladder Mix</i>	Thermo Scientific
Glucose (D) Monohydrat	Merck
Glycerin Rotipuran® (≥ 99,5 %)	Carl Roth®
Glycin (≥ 98,5 %)	Carl Roth®
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96 %)	Carl Roth®
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (99,5 %)	Carl Roth®
HCl (37 %)	Carl Roth®
Hefeextrakt	Carl Roth®
Hefeextrakt KAV D (feucht)	OHLY®
IPTG	Carl Roth®
Isopropanol (≥ 99,95 %) (Rotisolv®)	Carl Roth®
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (≥ 99 %)	Carl Roth®
KCl (≥ 99,5 %)	Carl Roth®
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (≥ 99 %)	Carl Roth®
KOH (≥ 85 %)	Carl Roth®
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Carl Roth®
Magermilchpulver	AppliChem GmbH
MgSO <sub>4</sub> 7xH <sub>2</sub> O	Carl Roth®
Mäuse Anti-Polyhistidin mAK	Sigma-Aldrich®
Methanol Rotisolv®	Carl Roth®
MgCl <sub>2</sub> 7xH <sub>2</sub> O (≥ 99 %)	Carl Roth®
MgSO <sub>4</sub> 7xH <sub>2</sub> O (≥ 99 %)	Carl Roth®
MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	Carl Roth®
N, N' Methylene-bis-acrylamid (≥ 98 %)	Carl Roth®
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (≥ 99,5 %)	Carl Roth®
Na <sub>2</sub> EDTA 2xH <sub>2</sub> O (≥ 99 %)	Carl Roth®
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2xH <sub>2</sub> O (≥ 99,5 %)	Carl Roth®
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2xH <sub>2</sub> O	Merck
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5xH <sub>2</sub> O (≥ 99,5 %)	Carl Roth®
NaCl (≥ 99,5 %)	Carl Roth®

Chemikalie (Reinheit)	Anbieter
NaI	Carl Roth®
NaN <sub>3</sub> (≥ 99 %)	Carl Roth®
NaOH (≥ 99 %)	Carl Roth®
NH <sub>3</sub>	Carl Roth®
Nickel(II)-sulfat Hexahydrat (≤99 %)	Carl Roth®
Ni-Sepharose™ high performance	GE Healthcare
Ortho-Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth®
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i> (PPL)	Thermo Scientific
<i>PCR Master Mix</i>	Thermo Scientific
peqGold Universal Agarose	peqLab
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Thermo Scientific
<i>PmeI</i>	Thermo Scientific
PMSF (≥ 98,5 %)	Sigma-Aldrich®
pNA	Fluka
Propidiumiodid	Carl Roth®
Proteinase K-Präparat	Thermo Scientific
Roti®-Stock 20 % SDS	Carl Roth®
<i>SacI</i>	Thermo Scientific
Salzsäure, reinst (32 %)	Carl Roth®
SIGMAFAST™ BCIP®/NBT	Sigma-Aldrich®
Streamline SP-XL	GE Healthcare
Struktol J673	Schill+Seilacher GmbH
Suc-AAPF-pNA	Bachem Holding AG
Syto®9	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Thermo Scientific
TEMED (99 %)	Carl Roth®
TRIS Pufferan® (≥ 99,9 %)	Carl Roth®
Trypton/ Pepton aus Casein	Carl Roth®
TWEEN® 20	Carl Roth®
<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i> (MW)	Thermo Scientific
<i>XbaI</i>	Thermo Scientific
YNB	Invitrogen
Zeocin™	Invivogen

Chemikalie (Reinheit)	Anbieter
Ziegen Anti-Maus IgG AP pAK	Sigma-Aldrich®
ZnCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich®

## 2.4 Puffer, Lösungen und Medien

Die in Tabelle 2-4 aufgeführten Puffer, Lösungen und Medien wurden in der vorliegenden Arbeit hergestellt und verwendet.

Tabelle 2-4: Übersicht der verwendeten Lösungen und Medien mit Zusammensetzung.

Medium/ Lösung	Zusammensetzung
Acrylamidlösung	30 % (v/v) Acrylamid; 9 g/L N, N' Methylene-bis-acrylamid
Agarosegel	10 g/L Agarose; 571 µg/L Ethidiumbromid, TAE-Puffer
AP-Substratlösung	1 Tablette SIGMAFAST™ BCIP®/NBT auf 10 mL dH <sub>2</sub> O; pH 9,5
Blockierlösung	50 g/L Magermilchpulver; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,6
BMGY	10 g/L Hefeextrakt; 20 g/L Trypton/ Pepton; 100 mM KPP, 13,4 g/L YNB; 4 mg/L Biotin; 1 % (v/v) Glycerin
BMMY	10 g/L Hefeextrakt; 20 g/L Trypton/ Pepton; 100 mM KPP, 13,4 g/L YNB; 4 mg/L Biotin; 0,5 % (v/v) Methanol
Bradford-Lösung	0,1 g/L Coomassie-Brilliant-Blau G 250; 5 % (v/v) Ethanol; 8,5 % (v/v) ortho-Phosphorsäure; 10 % (v/v) Glycerin
BSM	0,93 g/L CaSO <sub>4</sub> ; 18,2 g/L K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 14,9 g/L MgSO <sub>4</sub> 7xH <sub>2</sub> O; 4,13 g/L KOH; 40 g/L ( <i>batch</i> ) oder 20 g/L (VK) Glycerin; 26,7 mL/L Phosphorsäure (85 %); 12 mL/L 0,02 % Biotin; 4,35 mL/L ( <i>batch</i> ) oder 12 mL/L ( <i>fed-batch</i> ) PTM <sub>1</sub>
Coomassie-Färbelösung	1 g/L Coomassie-Brillant-Blau R 250; 20 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	20 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Entwicklerlösung	60 g/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; 1,85 % (v/v) Formaldehyd; 4 mg/L Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5 x H <sub>2</sub> O

Medium/ Lösung	Zusammensetzung
Fast-AP-Puffer (1x) (Thermo Scientific)	100 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 100 mM KCl; 0,2 % (v/v) TritonX-100; 1 mg/mL BSA
Fixierlösung	50 % (v/v) Methanol; 12 % (v/v) Essigsäure; 1,85 % (v/v) Formaldehyd
GB <sub>(Amp)</sub> -Medium	50 g/L Hefeextrakt (feucht); 10 g/L Glycerin; 0,5 g/L NH <sub>4</sub> Cl; 8,4 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,1 g/L MgSO <sub>4</sub> 7xH <sub>2</sub> O; (100 mg/L Ampicillin); pH 7
IMAC-MN-Bindingpuffer	50 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; 500 mM NaCl; 6 M Urea; pH 7,5
IMAC-MN-Elutionspuffer	50 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; 500 mM NaCl; 500 mM Imidazol; pH 7,5
IMAC-MN-Rückfaltungspuffer	50 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; 500 mM NaCl; pH 7,5
IMAC-PK-Bindingpuffer	50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl; pH 8,0
IMAC-PK-Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol; pH 8,0
Immobilisierungspuffer-MN	50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl; pH 7,5
Immobilisierungspuffer-PK	50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl; pH 8
Kathodenpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (v/v) SDS; 0,001 % (v/v) NaN <sub>3</sub>
KIA-Bindingpuffer	20 mM Natriumacetatpuffer; pH 5
KIA-Elutionspuffer	20 mM Natriumacetatpuffer; 0,5 M NaCl; pH 5
KPP	1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 6,0
LB <sub>(Amp)</sub> - Agarplatten	10 g/L Trypton/ Pepton; 15 g/L Agar; 10 g/L NaCl; 5 g/L Hefeextrakt; (100 mg/L Ampicillin); pH 7,5
LB <sub>(Amp)</sub> - Medium	10 g/L Trypton/ Pepton; 10 g/L NaCl; 5 g/L Hefeextrakt; (100 mg/L Ampicillin); pH 7,5
LSLB-(Zeocin <sup>TM</sup> )-Agarplatten	10 g/L Trypton/ Pepton; 15 g/L Agar; 5 g/L NaCl; 5 g/L Hefeextrakt; (25 mg/L Zeocin <sup>TM</sup> ); pH 7,5
LSLB-(Zeocin <sup>TM</sup> )-Medium	10 g/L Trypton/ Pepton; 5 g/L NaCl; 5 g/L Hefeextrakt; (25 mg/L Zeocin <sup>TM</sup> ); pH 7,5
Minimalmedium nach Brunner (MMB)	5,45 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2xH <sub>2</sub> O; 2,63 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 g/L (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 0,2 g/L MgSO <sub>4</sub> 7xH <sub>2</sub> O; 0,05 g/L CaCl <sub>2</sub> 2xH <sub>2</sub> O; 9,9 mL/L Spurenelementlösung 4; pH 7
MN-Substratlösung	25 mM Tris/HCl, 10 mM CaCl, pH 7,5 und 50 µg/mL hitzedenaturierte DNA (Heringssperma)

Medium/ Lösung	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,6
PBSB	50 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 150 mM NaCl; 2 g/L BSA; pH 7,2
PBST	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,05 % (v/v) TWEEN®-20; pH 7,6
<i>Pfu</i> -Puffer mit MgSO <sub>4</sub> (1x) (Thermo Scientific)	20 mM Tris/HCl pH 8,8; 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 10 mM KCl; 1 mg/mL BSA; 1 % (v/v) Triton X-100; 20 mM MgSO <sub>4</sub>
PK-Substratlösung	50 mM Tris/HCl; pH 8,0; 1,25 mg/mL Suc-AAPF-pNA (in DMSO)
Probenpuffer (SDS)	225 mM Tris/HCl; pH 6,8; 5 % (v/v) SDS; 0,5 g/L Bromphenolblau; 40 % (v/v) Glycerin
PTM <sub>1</sub>	6 g/L CuSO <sub>4</sub> 5xH <sub>2</sub> O; 0,08 g/L NaI, 3 g/L MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O; 0,2 g/L Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2xH <sub>2</sub> O; 0,02 g/L H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0,5 g/L CoCl <sub>2</sub> , 20 g/L ZnCl <sub>2</sub> ; 65 g/L FeSO <sub>4</sub> 7xH <sub>2</sub> O; 0,2 g/L Biotin, 5 mL/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Puffer B (1x) (Thermo Scientific)	10 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 mg/mL BSA
Sacl-Puffer (1x) (Thermo Scientific)	10 mM Bis-Tris-Propan-HCl pH 6,5; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 mg/mL BSA
Sammelgelpuffer	500 mM Tris/HCl; pH 6,8; 0,4 % (v/v) SDS; 0,01 % (v/v) NaN <sub>3</sub>
Sensitivierlösung	0,2 g/L Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5xH <sub>2</sub> O
Silberfärbelösung	0,5 g/L AgNO <sub>3</sub> ; 2,775 % (v/v) Formaldehyd
SOC-Medium	20 g/L Trypton/ Pepton; 5 g/L Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM Glucose
Spurenelementlösung 4	0,35 g/L EDTA; 0,2 g/L FeSO <sub>4</sub> 7x H <sub>2</sub> O; 100 mL/L Spurenelementlösung 6
Spurenelementlösung 6	0,1 g/L ZnSO <sub>4</sub> 7xH <sub>2</sub> O; 0,03 g/L MnCl <sub>2</sub> 4x H <sub>2</sub> O; 0,3 g/L H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0,2 g/L CoCl <sub>2</sub> 6x H <sub>2</sub> O; 0,01 CuCl <sub>2</sub> 2xH <sub>2</sub> O; 0,02 g/L NiCl <sub>2</sub> 6xH <sub>2</sub> O; 0,03 g/L Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2xH <sub>2</sub> O
Stopplösung	50 % (v/v) Methanol; 12 % (v/v) Essigsäure
Stripping-Puffer	50 mM Tris/HCl; 0,5 M NaCl; 50 mM EDTA; pH 8
T4-DNA-Ligase Puffer (1x) (Thermo Scientific)	40 mM Tris/HCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM DTT; 0,5 mM ATP; pH 7,8

Medium/ Lösung	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Tris; 1 mM EDTA; 20 mM Essigsäure
Tango-Puffer (1x) (Thermo Scientific)	33 mM Tris-Acetat pH 7,9; 10 mM Magnesiumacetat; 66 mM Kaliumacetat; 0,1 mg/mL BSA
Transferpuffer	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) MeOH; 0,1 % (v/v) SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl; pH 8,8; 0,4 % (v/v) SDS; 0,01 % (v/v) NaN <sub>3</sub>
Trocknerlösung	10 % (v/v) Glycerin; 20 % (v/v) Ethanol
YPD-Medium	20 g/L Trypton/ Pepton; 10 g/L Hefeextrakt; 20 g/L Glucose
YPDS-Zeocin™-Agarplatten	20 g/L Trypton/ Pepton; 10 g/L Hefeextrakt; 20 g/L Glucose; 20 g/L Agar; 1 M D-Sorbit; 100 mg/L Zeocin™

## 2.5 Übersicht verwendeter Primer

Alle Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt und lyophilisiert von der Firma Eurofins MWG Operon hergestellt. Vor Verwendung wurden die Primer mit vollentsalztem Wasser (VE-H<sub>2</sub>O) auf DNA-Konzentrationen von 100 pmol/μL gebracht, bei -20 °C gelagert und für PCR-Ansätze 1:4 (v/v) bzw. 1:8 (v/v) verdünnt. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2-5 zusammengefasst.

Tabelle 2-5: Übersicht verwendeter Primer mit zugehöriger Nukleotidsequenz und Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>). for: Vorwärtsprimer, rev: Rückwärtsprimer.

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> [°C]
<u>PCR-Primer zur Amplifikation der Pre-Pro-PK</u>		
PPICZa-Ins-for	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	57,9
PGAPZa-Ins-rev	GCAAATGGCATTCTGACATC	54,3
<u>PCR-Primer zur Insertion vom 6xHis-tag am PK C-terminus</u>		
PK-CT-6xHis-for	GGCTGAAGCTGAATTCGCACCTGCTGTC	69,5
PK-CT-6xHis-rev	AAAGCTCTAGAGCTCAATGATGATGATGATGATGAG CTTGGTAGTTGTT	71,9
<u>PCR-Primer zur Amplifikation der rMicNuc</u>		
T7-for	TAATACGACTCACTATAGGG	53,2
T7-rev	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	56,7

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> [°C]
<u>PCR-Primer zur Generierung von Cystein-Varianten der rMicNuc</u>		
Pcys10-for	GTATTCTGCTACCTGTACCAAG	58,4
Pcys10-rev	TACCTGTACCAAGAACTGCATA	57,1
Pcys135-for2	CATCTGCGTAAGTGCGAAG	56,7
Pcys135-rev2	TTTGCCTGAGCTTCGCACTTA	57,9
Pcys154-for	CGAAGACAATGCCGATTGTGGTC	62,4
Pcys154-rev	ATGGTGATGCTGACCACAATCGG	62,4

## 2.6 Zelllinien und Vektoren

Tabelle 2-6: Übersicht verwendeter Plasmide und Zelllinien.

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pGAPZαA	GAP Promoter, N-terminale α-Faktor Signalsequenz; C-terminal myc und 6xHis-tag, MCS; Zeo <sup>R</sup>	Probiodrug AG Halle (Saale); (Birgit Koch); [Invitrogen, 2008]
pGAPZαA-Pro-PK	pGAPZαA mit 1106 Bp EcoRI/XbaI Pro-PK-Gen aus <i>Tritirachium album</i>	Eurofins MWG Operon; diese Arbeit
pPICZαA	AOX1 Promoter, N-terminale α-Faktor Signalsequenz; C-terminal myc und 6xHis-tag, MCS; Zeo <sup>R</sup>	Probiodrug AG Halle (Saale); (Birgit Koch); [Invitrogen, 2010b]
pPICZαA-Pro-PK	pPICZαA mit 1106 Bp EcoRI/XbaI Pro-PK-Gen aus <i>Tritirachium album</i>	Vorliegende Arbeit
pPICZαA-Pro-PK-CT-6xHis	pPICZαA mit 1130 Bp EcoRI/XbaI Pro-PK-CT-6xHis-Gen	Vorliegende Arbeit
pET20b(+)	Expressionsvektor mit C-terminalen His-tag, T7 Promoter, <i>pelB</i> , Amp <sup>R</sup>	Novagen [Novagen, 2005]
pET20b-MicNuc (R)-6xHis	pET20b(+) mit 492 Bp NdeI/XhoI-MicNuc-Gen	Vorliegende Arbeit
pET20b-MicNuc Einfach	pET20b(+) mit 492 Bp NdeI/XhoI-MicNuc-Gen, S10C	Vorliegende Arbeit
pET20b-MicNuc Zweifach	pET20b(+) mit 492 Bp NdeI/XhoI-MicNuc-Gen, S10 154C	Vorliegende Arbeit
pET20b-MicNuc Dreifach	pET20b(+) mit 492 Bp NdeI/XhoI-MicNuc-Gen, S10 135 154C	Vorliegende Arbeit
Zelllinien	Eigenschaft	Referenz
<i>E. coli</i> DH5α	F- Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	Novagen
<i>E. coli</i> BL21Gold (DE3)	<i>E. coli</i> B F- dcm+ Hte ompT hsdS(r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) gal λ (DE3) endA Tet <sup>r</sup>	Satorius [Satorius, 1999]

Zelllinien	Eigenschaft	Referenz
<i>Pichia pastoris</i> X33	WT Mut <sup>+</sup> , Selektion Zeo <sup>R</sup> - Expressionsvektoren	Probiodrug AG Halle (Birgit Koch)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Migula 1895; Biovar: I (742); isoliert aus Vorfiltertank (UK)	DSM 50090

## 2.7 Restriktionsverdau

Zweimal 1 µg Plasmid pGAPZαA-Pro-PK bzw. das PCR-Amplifikat der Pro-PK und der Vektor pPICZαA wurden separat in 2x Tangopuffer (Tabelle 2-4) mit 20 U XbaI und 10 U EcoRI für 2 h bei 37 °C verdaut. Die Reaktion wurde bei 65 °C für 20 min abgestoppt. Alle Inkubationsschritte wurden in einem *Thermocycler T-Personal* durchgeführt. Zuletzt wurden alle inaktivierten Ansätze aufgereingt (Kapitel 2.11).

## 2.8 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis und zur Trennung unterschiedlicher Größen an DNA-Fragmenten wird im Allgemeinen die Agarose-Gelelektrophorese verwendet [Sambrook *et al.*, 2001]. Zur Herstellung eines 1 % Gels (w/v) wurden 0,35 mg Agarose mit 35 mL 1x TAE-Puffer (Tabelle 2-4) erhitzt. Die Agarose-Lösung wurde nach Abkühlen auf 55 °C mit 20 µL Ethidiumbromid (1 µg/µL) versetzt und in einen Gelschlitten mit Gelkamm gegossen. Nach 30 min Aushärten konnten die Geltaschen mit einem DNA-Marker (5 µL Generuler DNA Ladder Mix von Thermo Scientific) und den zu untersuchenden Proben beladen. Dabei wurde je Probe eine 1x *Loading Dye*-Konzentration eingestellt. Die Elektrophorese wurde entweder in der HE 33 *mini horizontal submarine unit* oder in der *Unleable Horizontal minigel system* Elektrophoresekammer mit dem *Electrophoresis Power Supply* EPS 301 für 1 h bei 80 V und 400 mA durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Dokumentation des mit Ethidiumbromid behandelten Gels mittels *Gene Genius Bio Imaging System* und der dazugehörigen Gene-Tool Software.

## 2.9 Agarose-Gelextraktion

Mit Hilfe der Gel-Dokumentation *GeneSnap* und des *GeneJET Gel Extraction Kit* [Thermo-Scientific, 2011a] wurde die gewünschte DNA aus dem Agarosegel isoliert. Es wurde analog der Herstellerangaben verfahren. Die Elution der DNA erfolgte mit sterilfiltriertem VE-H<sub>2</sub>O (50 °C).

## 2.10 Ligation

Prinzip und Durchführung der Ligation basierten auf standard-molekularbiologischen Methoden [Sambrook *et al.*, 2001]. Die Pro-PK-Sequenz aus dem EcoRI/XbaI-Verdau von

pGAPZ $\alpha$ A wurde einer Dephosphorylierung unterzogen, um eine Selbstligation des Plasmids in der Ligationreaktion zu vermeiden. Hierzu wurden 20  $\mu$ L des Vektorfragments in 1x *Fast-AP*-Puffer (Tabelle 2-4) für 10 min bei 37 °C mit 2 U *Fast-AP* und anschließend zur Inaktivierung für 20 min bei 80 °C inkubiert. Zusätzlich wurde das dephosphorylierte Pro-PK-Genfragment nach Protokoll gereinigt (Kapitel 2.11). Der Elutionsschritt wurde mit sterilen 12  $\mu$ L VE-H<sub>2</sub>O (50 °C) durchgeführt.

Für die Ligation von Insert (Pro-PK) und Vektor (pPICZ $\alpha$ A) wurde folgender 20  $\mu$ L-Ansatz verwendet: 6  $\mu$ L Insert; 2  $\mu$ L Vektor, 1x T4 DNA Ligase-Puffer (Tabelle 2-4) und 1 U T4 DNA-Ligase. Die Inkubation erfolgte 16 h bei 16 °C. Anschließend wurde der Ansatz mittels *MSB*<sup>®</sup> *Spin PCRapace Kit* erneut gereinigt (Kapitel 2.11).

## 2.11 Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen

Zur Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA aus PCR- oder Restriktionsverdauansätzen wurde das *MSB*<sup>®</sup> *Spin PCRapace Kit* [Invitex, 2008] verwendet. Hierdurch können DNA-Fragmente im Bereich 80 bis 30.000 Bp von Nukleotiden, Primern, Puffern, Proteinen und Salzen getrennt werden. Nach der DNA-Bindung an das Säulenmaterial erfolgte die Elution stets mit 10  $\mu$ L sterilfiltriertem VE-H<sub>2</sub>O (50 °C).

## 2.12 Transformation von *E. coli*

### 2.12.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

In einem 15 mL Falcon-Röhrchen wurden 5 mL LSLB-Medium (Tabelle 2-4) mit einer *E. coli* DH5 $\alpha$ -Einzelkolonie angeimpft und für 18 h bei 37 °C angezogen. In einem Schüttelkolben wurden 100 mL LSLB-Medium mit 3 mL dieser Kultur beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 bei 37 °C schüttelnd inkubiert (110 RPM, Multitron II). Es folgte ein Kühschritt auf Eis von 15 min, anschließend das Überführen in 50 mL Falcons (eiskalt) und eine Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 5000 RPM (*Centrifuge 5810 R*). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 5 mL eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Danach folgten zwei Waschschrirte, bei denen jeweils mit 50 mL kaltem sterilem Wasser gewaschen und für 20 min bei 4 °C und 5000 RPM zentrifugiert wurde. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 8 mL kaltem, sterilem 10 % Glycerin pro Falcon resuspendiert (Zentrifugation 10 min, 4 °C, 5000 RPM). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet mit 200  $\mu$ L kaltem, sterilem 10 % Glycerin resuspendiert. Zuletzt wurden jeweils 40  $\mu$ L in vorgekühlte *Microtubes* aliquotiert, mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und diese bei -80 °C gelagert.

## 2.12.2 Elektroporation

Zur Amplifikation, Mutagenese, Lagerung und Sequenzierung wurden die pPICZαA-PK-Varianten in DH5α-Zellen eingebracht [Taylor *et al.*, 1993]. 40 µL hergestellte kompetente DH5α-Zellen wurden pro Ansatz mit 2 µL gereinigter Plasmid oder PCR-DNA in Elektroporationsküvetten mit einer Spaltbreite von 1 mm gemischt. Bei einer Spannung von 1800 V wurden die Zellen einem Stromimpuls ausgesetzt, der die Bakterienmembran durchlässig für DNA-Moleküle macht. Dieser Vorgang wird auch als Elektroporation bezeichnet [Sambrook *et al.*, 2001]. Zur Erholung wurden anschließend 1000 µL SOC-Medium [Hanahan, 1983] (Tabelle 2-4) zu den Zellen gegeben und für 60 min bei 37 °C und 1200 RPM im *Thermomixer comfort* geschüttelt. Abschließend wurden je 50 µL und 100 µL transformierte Zellen auf LSLB-Zeocin™-Agarplatten ausgestrichen. Die restlichen Zellen wurden für 2 min bei 13200 RPM in der *Centrifuge 5415 R* sedimentiert, in ca. 100 µL Überstand resuspendiert und ausplattiert. LSLB-Zeocin™-Platten mit transformierten Zellen wurden für 16 h bis 18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

## 2.12.3 Hitzeschocktransformation

Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte über die Behandlung mit CaCl<sub>2</sub> laut Sambrook *et al.* [Sambrook *et al.*, 2001]. Für die Transformation wurden 3 µL einer DNA-Lösung in eine *E. coli*-Kryokultur (BL21Gold (DE3); DH5α) vorsichtig auf Eis eingerührt und für 30 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde für 45 s bei 42 °C geschockt, 2 min bei 0 °C abgekühlt, die Suspension in 400 µL SOC-Medium überführt und für 1 h bei 37 °C, 1200 RPM (*Centrifuge 5415 R*) inkubiert. Zum Schluss wurde auf LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten ausplattiert und diese bei 37 °C für 18 h inkubiert.

## 2.13 Transformation von *Pichia pastoris* X33

### 2.13.1 Herstellung elektrokompenter X33

In einem 100 mL Schüttelkolben wurden zunächst 10 mL YPD-Medium (Tabelle 2-4) mit X33-Zellen (Kryokultur) beimpft und 18 h bei 30 °C und 110 RPM im Infors-Schüttler inkubiert. Mithilfe dieser Vorkultur wurden weiter 2-L-Schüttelkolben mit 500 mL frischem YPD-Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,15 angeimpft und bei 30 °C, 80 RPM (Multitron II ) bis auf eine OD<sub>600</sub> von 1,3-1,5 (Blank gegen Wasser) inkubiert. Die optische Dichte wurde im Photometer *Genesys 6* bei 600 nm überprüft. Für die Ernte wurden die Zellen mit der *Avanti™ J-30 I Centrifuge (JA-10 Fixed-Angle Rotor)* bei 2200 x g und 4 °C für 5 min sedimentiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 250 mL eiskaltem, sterilem VE-H<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen und das Pellet mit 125 mL eiskaltem sterilen VE-H<sub>2</sub>O gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das neue Pellet wurde in 20 mL eiskaltem, sterilem 1 M Sorbitol resuspendiert, in ein 50 mL Röhrchen überführt und mit der *Centrifuge 5810 R* 5 min bei 2200 x g und 4 °C

zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand verworfen, die kompetenten X33-Zellen in 1 mL eiskaltem, sterilem 1 M Sorbitol gelöst und in 80 µL Aliquots in 1,5 mL Röhren überführt [Invitrogen, 2010b]. Die Aliquots konnten direkt oder nach schockfrosteten in flüssigem Stickstoff für bis zu vier Wochen verwendet werden (Lagerung bei -80 °C).

### 2.13.2 Linearisierung von pPICZαA-Vektoren

Für die heterologe Proteinexpression in *Pichia pastoris* X33 ist es von Vorteil, dass Proteinase K-Gen in das X33-Genom zu integrieren. Hierbei ist das Mittel der Wahl die homologe Rekombination. Dabei werden homologe DNA-Bereiche zwischen dem Vektor pPICZαA und dem *Pichia pastoris*-Genom verwendet [Higgins, 2001]. Zur Verbesserung der Effizienz wurde eine Linearisierung der Vektoren innerhalb des AOX1-Promoters durchgeführt [Cregg *et al.*, 1985]. Der Vektor pPICZαA-Pro-PK wurde einem *SacI*-Verdau unterzogen. Dazu wurden 5-10 µg Plasmid in einem 60 µL Ansatz mit 1x *SacI*-Puffer und 30 U *SacI* für 2 h bei 37 °C verdaut und anschließend für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

Für den Vektor pPICZαA-PK-CT-6xHis, welcher zwei *SacI*-Schnittstellen besitzt, wurde mittels *PmeI* linearisiert. Dies erfolgte analog zum *SacI*-Verdau mit folgenden Ausnahmen: 1x Puffer B (Tabelle 2-4) und 15 U *PmeI*. 1 µL je Verdau wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.8) untersucht. Zum Schluss wurden die linearisierten Plasmide für die Transformation mittels *MSB® Spin PCRapace Kit* gereinigt (2.11).

### 2.13.3 Elektroporation von X33

Die Transformation in X33-Zellen erfolgte über Elektroporation [Becker und Guarente, 1991]. Hierzu wurden 5-10 µg linearisiertes Plasmid mit 80 µL kompetenten X33-Zellen gemischt, in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (Spaltenbreite 2 mm) überführt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Küvettenoberfläche wurde trocken gewischt und die X33-Zellen bei 1800 V im *Electroporator* 2510 einem Stromimpuls für mindestens 4 ms unterzogen. Sofort nach Pulszugabe wurden die Zellen in 1 mL 1 M Sorbitol (RT) aufgenommen, in ein 15 mL Röhren überführt und 2 h bei 30 °C im *Thermomixer comfort* regeneriert. Nach je 30 min wurde einmal invertiert. Transformierte Zellen wurden mit der *Centrifuge* 5810 R sedimentiert, die Hälfte des Überstands verworfen und die Zellen im restlichen Überstand resuspendiert. 50 µL, 100 µL und die restliche Zellsuspension wurden auf separate YPDS-Zeocin™-Agarplatten (Tabelle 2-4) ausplattiert und für 2-3 Tage bis zur sichtbaren KBE-Bildung bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Reinigung wurden bis zu 200 Einzelkolonien erneut auf YPDS-Zeocin™-Agarplatten ausgestrichen.

## 2.14 Plasmidpräparation

Zur Plasmidvermehrung wurden Einzelkolonien in Zellkulturen angezogen. Dafür wurde je ein 15 mL Falconröhren mit 5 mL Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) und einer

Bakterienkolonie für 18 h bei 37 °C und 180 RPM (Multitron II) inkubiert. Die Zellen wurden bei 4000 x g für 10 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20 °C eingefroren. Zur Extraktion der Plasmid-DNA wurde das *GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit* [Thermo-Scientific, 2011b] verwendet, es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Nach Reinigung über eine Silica-Säule wurde die Plasmid-DNA mit 50 µL sterilisiertem VE-H<sub>2</sub>O (50 °C) eluiert. Zur Kontrolle wurden 5 µL des Eluats auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen.

## 2.15 Polymerasekettenreaktionen (PCR)

### 2.15.1 Kolonie-PCR

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion [Mullis *et al.*, 1986] ist es möglich ausgewählte DNA-Abschnitte gezielt unter Einsatz spezieller Primer amplifizieren. Auf Agarplatten gewachsene Einzelkolonien von *E. coli* wurden in je 25 µL VE-H<sub>2</sub>O und Einzelkolonien von *Pichia pastoris* in je 25 µL 20 mM NaOH-Lösung für 10 min bei 95 °C aufgeschlossen und anschließend mit der *Centrifuge* 5415 R für 5 s anzentrifugiert. 1 µL des Überstands wurde als Template eingesetzt und der PCR-Ansatz wie in Tabelle 2-7 oben gezeigt zusammenpipettiert. Hierfür wurden die PCR-Primer zur Amplifikation und eine *Taq*-Polymerase verwendet. Die PCR wurde in einem *Thermocycler T-Personal* mit dem Programm, wie in Tabelle 2-7 unten gezeigt, durchgeführt. Für die Anlagerungstemperatur wurde je Primerpaar die geringste Schmelztemperatur abzüglich 1 °C gewählt.

Tabelle 2-7: Ansatz für eine Kolonie-PCR (Tabelle oben) und PCR-Programm (Tabelle unten).

Komponente	Ausgangskonzentration	Zielkonzentration	Volumen [µL]
<i>Taq</i> -PCR-MM	10x	1x	12,5
Primer for	25 µM	0,5 µM	0,5
Primer rev	25 µM	0,5 µM	0,5
Template-DNA	-	-	1
Nuclease-freies Wasser	-	-	10,5
Gesamt			25
PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	30	
Anlagerung	X	30	31
Elongation	72	Y	
Finale Elongation	72	420	1

X= Temperatur entsprechend der verwendeten Primer

Y= Dauer entsprechend der Ampifikatgröße (*Taq*-Polymerase: 1 kB/min)

### 2.15.2 Ortsgerichtete Mutagenese-PCR

Durchführung und Prinzip der gerichteten Mutagenese [Hutchison *et al.*, 1978; Weiner *et al.*, 1994] basierten auf der konventionellen PCR [Mullis *et al.*, 1986] und standardmolekularbiologischen Methoden [Sambrook *et al.*, 2001]. Damit nur der gewünschte Basenaustausch vollzogen wird, ist eine thermostabile DNA-Polymerase mit geringer Fehlerrate nötig. Deswegen wurde in der gerichteten Mutagenese die *Pfu*-DNA-Polymerase (0,5 kB/min) verwendet. Durch die Korrekturlesefunktion weist diese gegenüber der üblich verwendeten *Taq*-Polymerase eine deutlich verminderte Fehlerrate bei der DNA-Synthese auf [Lundberg *et al.*, 1991]. Für die Anlagerungstemperatur wurde je Primerpaar die geringste Schmelztemperatur abzüglich 1 °C gewählt.

Tabelle 2-8: Ansatz für eine ortsgerechte Mutagenese-PCR von pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK und pET20b-MicNuc (R)-6xHis (oben), das PCR-Programm von pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK (mitte) und von pET20b-MicNuc (R)-6xHis sowie der Cystein-Varianten (unten)

Komponente	Ausgangskonzentration	Zielkonzentration	Volumen [ $\mu$ L]
<i>Pfu</i> -Puffer mit MgSO <sub>4</sub>	10x	1x	5
dNTP-Mix	2 mM	0,2 mM	5
Primer for	12,5 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	2
Primer rev	12,5 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	2
Template-DNA	unverdünnt		1
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	2,5 U/ $\mu$ L	1,25 U	0,5
Steriles VE-H <sub>2</sub> O			34,5
Gesamt			50

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	120	1
Zugabe der <i>Pfu</i> DNA-Polymerase			
Denaturierung	95	30	
Anlagerung	68,5	30	29
Elongation	72	150	
Finale Elongation	72	420	1

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	120	1
Zugabe der <i>Pfu</i> DNA-Polymerase			
Denaturierung	95	30	30
Anlagerung	X	30	
Elongation	72	540	
Finale Elongation	72	600	1

X= Temperatur entsprechend T<sub>m</sub> der verwendeten Primer

## 2.16 *Dpn* I-Verdau

1  $\mu\text{L}$  *Dpn* I (10 U/ $\mu\text{L}$ ) wurde direkt zum PCR-Ansatz zugeben, sorgfältig gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Ein weiterer Mikroliter *Dpn* I wurde analog in den Ansatz pipettiert. Danach wurde das Enzym bei 85 °C für 20 min inaktiviert. Zur Überprüfung des gewünschten Amplifikats mit entsprechender Größe wurden 2  $\mu\text{L}$  der PCR auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen (Kapitel 2.8).

## 2.17 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte durch Eurofins MWG Operon; Anziger Straße 7a; D-85560 Ebersberg; [www.eurofinsdna.com](http://www.eurofinsdna.com). Circa 10 ng Plasmid-DNA waren für eine Sequenzierung nötig. Anschließend wurden die Ergebnisse über die frei zugängliche NCBI/blastx-Datenbank ausgewertet.

## 2.18 Bestimmung von Konzentrationen

### 2.18.1 DNA-Konzentration mittels UV-Absorption bei 260 nm

Die DNA-Konzentration wurde mit dem Spectrophotometer Ultraspec 3300pro und der Helma Präzisions-Messküvette, nach dem internen Photometerprogramm MolB zur DNA-Quantifizierung bestimmt. Dabei wurde eine Referenzlösung von 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zu Grunde gelegt, die in einer Küvette (10 mm Durchmesser) eine  $\text{OD}_{260}$  von 1,0 Å besitzt. Das Absorptionsverhältnis von  $A_{260}/A_{280}$  für reine DNA liegt bei 1,8.

### 2.18.2 Proteinkonzentration mittels BRADFORD-Test

Für das Farbreagens wurden 100 mg Coomassie-Brillantblau G-250 in 50 mL 95 % Ethanol gelöst, 100 mL 85 % Phosphorsäure zugesetzt und mit VE- $\text{H}_2\text{O}$  auf 600 mL aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung filtriert, 100 mL Glycerin hinzugegeben und mit VE- $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 L aufgefüllt. Nach 24 h konnte das Reagens verwendet werden. Für den Test wurden 50  $\mu\text{L}$  Proteinlösung mit 2 mL Farbreagens versetzt, gut gemischt und bei 595 nm die Extinktion gegen einen Blindwert ermittelt. Als Kalibrierprotein wurde BSA eingesetzt. Der lineare Bereich für den Test nach Bradford [Bradford, 1976] liegt zwischen 5 und 500  $\mu\text{g}$  Protein/mL.

## 2.19 Zellkultivierung

### 2.19.1 Proteinexpression im DW-MTP-Maßstab

Zur Expressionsuntersuchung und anschließenden Aktivitätsmessung wurden X33-Transformanten in 96x *Deepwell*-Mikrotiterplatten (DW-MTP) angezogen. Unter Abbildung 2-1 ist die Versuchsdurchführung der Kultivierung gezeigt. Die Auftragung innerhalb der DW-MTP ist in Tabelle 2-9 schematisch dargestellt.

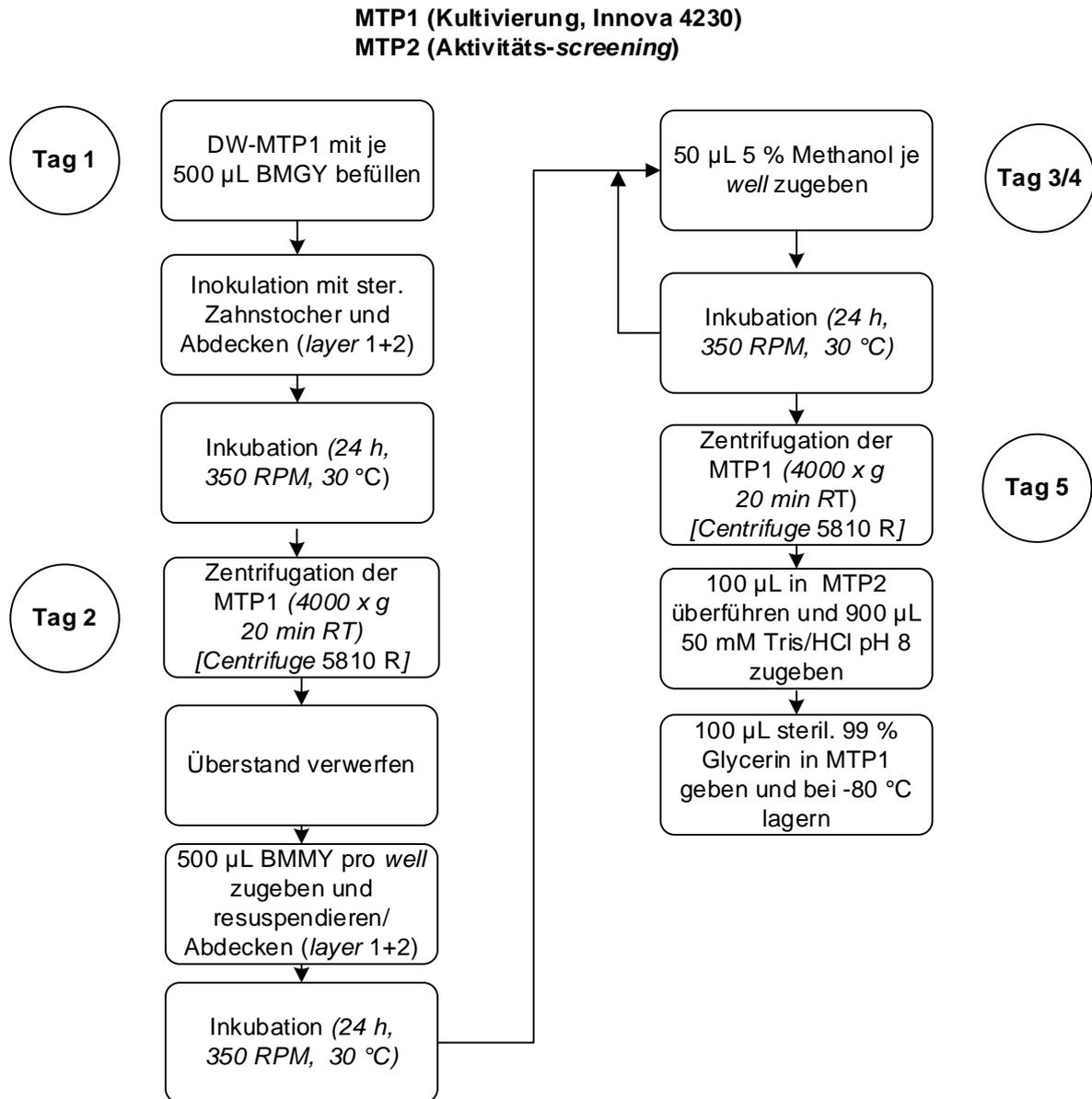


Abbildung 2-1: Ablaufschema der Kultivierung von X33-Transformanten für Aktivitätsuntersuchungen. *Layer 1: Breathseal; Layer 2: Gas Permeable Adhesive Seal*. Die Kultivierung verlief über fünf Tage. Alle Arbeitsschritte wurden steril durchgeführt. Dieser Ablaufplan orientiert sich an: [Chiruvolu *et al.*, 1997; Invitrogen, 2010b; Salah *et al.*, 2009].

Tabelle 2-9: DW-MTP-Template mit *well*-Belegung einer X33/pPICZαA Kultivierung. K= X33/pPICZαA-Pro-PK-Klon; WT= X33-Wildtyp; B= pures Medium/Blank; X= eventuell weitere Referenzen. Auftragung von A1 nach H1 usw.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	WT
B	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	WT
C	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	WT
D	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	WT
E	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	B
F	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	B
G	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	B/X
H	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	B/X

## 2.19.2 Proteinexpression im Schüttelkolben-Maßstab

### 2.19.2.1 rPK

In Abbildung 2-2 ist der Ablauf der Schüttelkolbenkultivierung zur Produktion rekombinater PK (rPK) dargestellt.

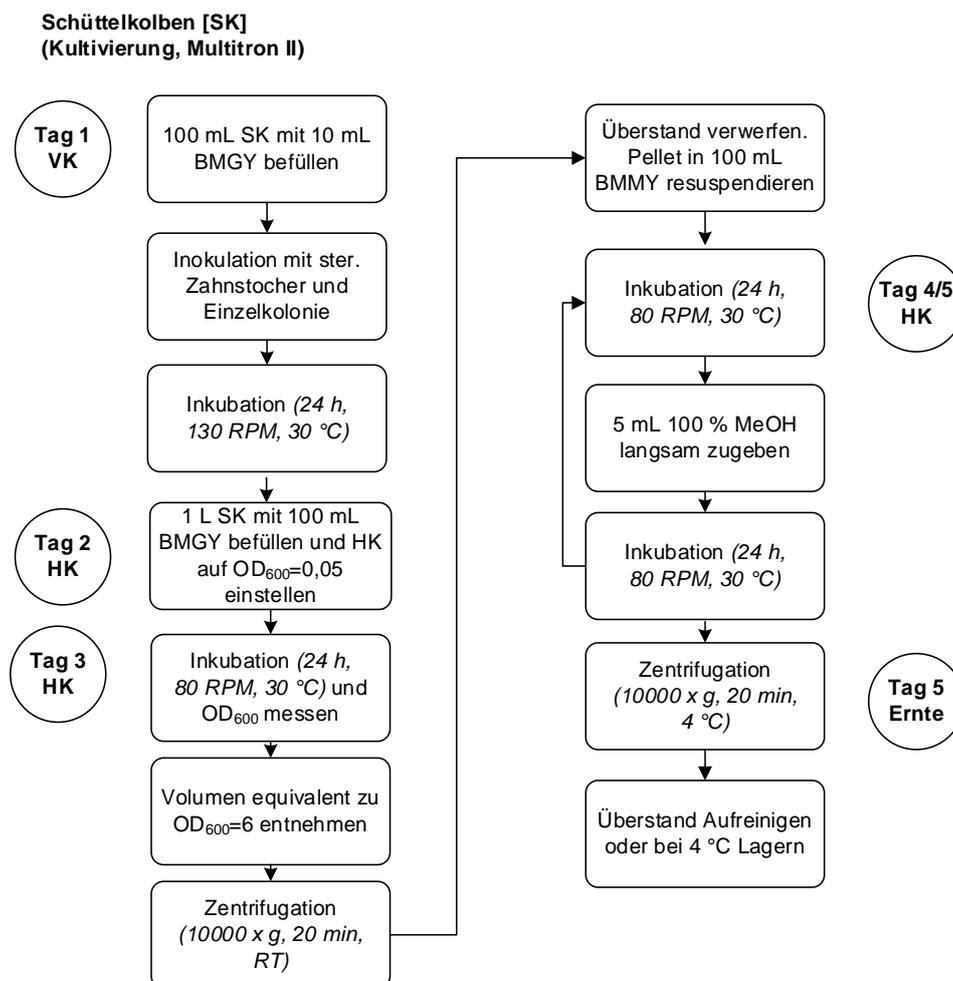


Abbildung 2-2: Ablaufschema der SK-Kultivierung von X33-Transformanten für Aktivitätsuntersuchungen. Die Kultivierung verlief über fünf Tage. Alle Arbeitsschritte sind steril durchzuführen. VK: Vorkultur, HK: Hauptkultur. Dieser Ablaufplan wurde konzipiert nach: [Chiruvolu *et al.*, 1997; Invitrogen, 2010b; Salah *et al.*, 2009].

### 2.19.2.2 rMicNuc

In Abbildung 2-3 ist der Ablauf der Schüttelkolbenkultivierung zur Produktion rekombinater MicNuc (rMicNuc) dargestellt.

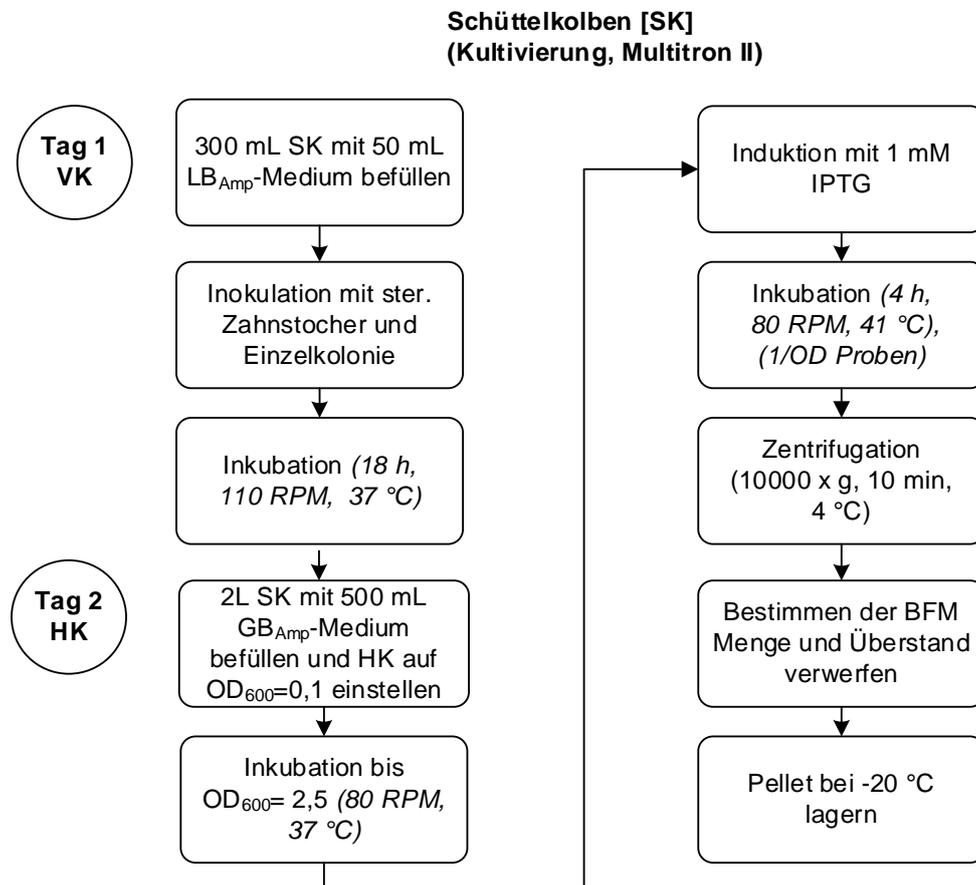


Abbildung 2-3: Ablaufschema der SK-Kultivierung von *E. coli* BL21Gold (DE3)-Transformanten. Die Kultivierung verlief über zwei Tage. VK: Vorkultur, HK: Hauptkultur. Alle Arbeitsschritte sind steril durchzuführen.

### 2.19.3 Fermentation im Bioreaktor

Die Hochzelldichtefermentation wurde nach angepasstem Protokoll [Higgins *et al.*, 1998b; Invitrogen, 2002; Jahic *et al.*, 2002] in einem 30 L Bioreaktor Biostat C durchgeführt. 650 mL einer BSM-Vorkultur von X33/pPICZαA-Pro-PK Klon 7 mit einer OD<sub>600</sub> von 7 wurden in 18 L Glycerin-*batch* inokuliert und folgende Betriebsparameter eingestellt. PH-Wert: pH 5,0 (mit 25 % NH<sub>3</sub> eingestellt); Betriebstemperatur: 30 °C; Antischaumemulsion: 20 % Struktol J673; Rührgeschwindigkeit: eingestellt über pO<sub>2</sub>-Regler; min. 400 RPM bis max. 1000 RPM. Nach Erreichen der maximalen Rührgeschwindigkeit wurde der pO<sub>2</sub> über den *airflow* geregelt. Der pO<sub>2</sub> betrug 30 % über die gesamte Fermentationsdauer. Die Reaktorsterilisation und die Kalibrierung aller verwendeten Sonden wurden nach dem Betriebshandbuch von Satorius [Satorius, 1999] durchgeführt. Über das Prozessleitsystem MFCS (Multi Fermenter Control System) wurden die Luftzufuhr im Reaktor, Rührgeschwindigkeit, Druck, pH-Wert,

Sauerstoffpartialdruck im Medium sowie die über eine Schlauchpumpe zugegebene Menge an *feed*-Lösung während der Fermentation geregelt. Durch Entnahme von Kulturproben konnten *Offline*-Daten der Fermentation, wie  $OD_{600}$ , Aktivität, Proteinkonzentration, Glycerinkonzentration und Biotrockenmasse verfolgt werden.

Die Fermentation gliederte sich in drei Abschnitte. Gestartet wurde mit einer konstanten Glycerin-*batch*-Phase für 23,15 h. Anschließend folgte für 4,85 h die erste *fed-batch*-Phase mit Glycerin bei einer initialen Zufütterungsrate von 38,5 mL/h und einer exponentiellen Steigerung von 0,18 mL/h. In der zweiten *fed-batch*-Phase (Induktionsphase) wurde Methanol dreistufig für 44 h zugefüttert. Begonnen wurde mit 10 mL/h bei einer exponentiellen Steigerung von 0,12 mL/h für 4 h, gefolgt von konstant 28 mL/h für 15 h und 35 mL/h für die restlichen 25 h. Nach der Gesamtfermentationszeit von 72 h wurde die Kultursuspension von final 20 L geerntet. Fermentationsproben (je 1 mL) wurden 5 min bei 13200 RPM zentrifugiert (*Centrifuge* 5415 R) und der Überstand auf PK-Aktivität und Proteinkonzentration untersucht. Die optische Dichte ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) wurde direkt durch Probennahme von der X33-Zellkultur gemessen. Die Biotrockenmasse (BTM) wurde pro Zeitpunkt aus drei Pellets von je 1 mL Zellkultur (2x mit Leitungswasser gewaschen) nach Zentrifugation und Trocknung durch Auswiegen bestimmt (24 h bei 80 °C im Brutschrank).

Der Glycerin-*batch* mit einem Startvolumen von 18 L bestand aus BSM [Invitrogen, 2002] (Tabelle 2-4). Die *feed*-Lösungen für die erste *fed-batch*-Phase mit 555 g/L Glycerin [Jahic *et al.*, 2002] und die Zweite mit 780 g/L Methanol [Jahic *et al.*, 2002] enthielten zusätzlich noch 12 mL/L  $PTM_1$  und 12 mL/L 0,02 % Biotin.

### 2.19.4 1/OD Probenanlage

Das Volumen ( $\mu\text{L}$ ) einer Bakteriensuspension wurde nach Division von 1/OD in *Microtubes* überführt, 5 min (4 °C) bei 13200 RPM zentrifugiert (*Centrifuge* 5415 R), der Überstand verworfen und das Pellet bei -20 °C gelagert.

### 2.19.5 Kryokulturen

Für das Anlegen von Krokulturen wurde, wenn nicht weiter angegeben, ein Verhältnis von 1:2 (v/v) verwendet. 500  $\mu\text{L}$  Zellkultur wurden direkt nach Inkubation mit 500  $\mu\text{L}$  99 % Glycerin in Kryoröhrchen überführt und für 30 s auf einem *lab dancer* gemischt. Im Anschluss erfolgte die Lagerung stets bei -80 °C.

## 2.20 Proteinbiochemische Methoden

### 2.20.1 Präzipitation von Proteinen

Proteinpräzipitation aus Expressionsüberständen erfolgte entweder mithilfe von Ethanol [Cohn *et al.*, 1947; Yoshikawa *et al.*, 2012] oder Ammoniumsulfat [Ebeling *et al.*, 1974]. Organische Lösungsmittel wie Ethanol entziehen Proteinen aus der Solvathülle das Wasser,

wodurch Proteine präzipitiert werden [Yoshikawa *et al.*, 2012]. Ammoniumsulfat vergrößert die hydrophoben Wechselwirkungen in der Lösung und fördert Proteinaggregationen [Hofmeister, 1888]. Zur Ethanol-fällung wurden Proteinlösungen 1:4 mit 4 °C kaltem 99,8 %-igen Ethanol (75 % (v/v) Ethanol Endkonzentration) gemischt und zur Ammoniumsulfat-fällung wurden Proteinlösungen mit 80 % (w/v) Ammoniumsulfat versetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 4 °C und 1200 RPM im *Thermomixer*. Im Anschluss wurde mit der *Centrifuge* 5415 R für 5 min bei 4 °C und 13200 RPM sedimentiert, der Überstand verworfen und das Sediment im *Concentrator* 5301 für 30 min bei 30 °C getrocknet. Die Sedimente wurden entweder in 1/10 des Ausgangsvolumens mit Probenpuffer oder in 1/10 des Ausgangsvolumens mit 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) für weitere Analysen resuspendiert. Proteinlösungen für die SDS-PAGE wurden vor Probenpufferzugabe mit 0,75- 1 mM PMSF [Sinha *et al.*, 2004] für 10 min bei Raumtemperatur behandelt, um den Selbstabbau der PK bei Kontakt mit SDS [Hilz *et al.*, 1975] zu unterbinden [Ebeling *et al.*, 1974].

## 2.20.2 Bestimmung der rPK-Aktivität

### 2.20.2.1 Extinktionskoeffizient von pNA

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von pNA ( $\epsilon = 138,19 \text{ g/mol}$ ) wurde eine Stammlösung von 100 mg/mL pNA in DMSO hergestellt und Lösungen mit Konzentrationen von 0,1 bis 4 mg/mL angefertigt. In einer Küvette wurden 10  $\mu\text{L}$  der jeweiligen pNA-Lösung zu 1 mL 50 mM Tris/HCl pH 8 gegeben, gemischt und bei 25 °C sowie einer Wellenlänge von 405 nm im *Ultrospec™* 3300 pro gemessen. In Tabelle 2-10 sind die Konzentration und die Stoffmenge im Küvettenansatz und die gemessene Absorption bei 405 nm gezeigt und in Abbildung 2-4 ist die Absorption gegen die Konzentration aufgetragen. Demnach ergibt sich ein Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  von rund  $10,4 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

Tabelle 2-10: Übersicht der pNA-Verdünnungen zur Bestimmung des molaren, dekadischen Extinktionskoeffizienten mit Stoffmenge und Konzentration sowie die gemessenen Absorptionen. n/a nicht angegeben.

Masse [mg]	Masse [g]	Stoffmenge n [ $\mu\text{mol}$ ]	Konzentration c [ $\mu\text{mol/mL}$ ]	Stoffmenge n im Ansatz [ $\mu\text{mol}$ ]	Konzentration c im Ansatz [ $\mu\text{mol/mL}$ ]	Absorption [405 nm]
4	0,004	28,946	28,946	0,287	0,284	<b>2,925</b>
3	0,003	21,709	21,709	0,215	0,213	<b>n/a</b>
2	0,002	14,473	14,473	0,143	0,142	<b>1,519</b>
1	0,001	7,236	7,236	0,072	0,071	<b>0,717</b>
0,5	0,0005	3,618	3,618	0,036	0,035	<b>n/a</b>
0,2	0,0002	1,447	1,447	0,014	0,014	<b>0,158</b>
0,1	0,0001	0,724	0,724	0,007	0,007	<b>0,075</b>

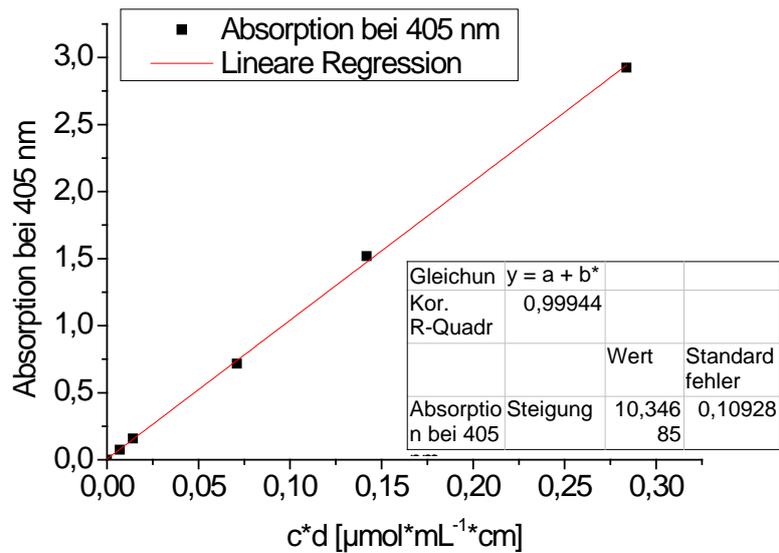


Abbildung 2-4: Diagramm des molaren, dekadischen Extinktionskoeffizienten (Anstieg). Aufgetragen ist die Absorption gegen die Konzentration [c] multipliziert mit der Schichtdicke [d] der Messküvette.

### 2.20.2.2 96-Well Mikrotiterplatte

Überstände aus den Proteinexpressionen im DW-MTP Maßstab (Kapitel 2.19.1) wurden in transparenten 96-Well Platten (BD-Microtest™ Flat Bottom) im FLUOstar Galaxy MTP-Lesegerät auf aktive rPK untersucht. Dazu wurden 240 µL PK-Substratlösung (Tabelle 2-4) pro Well vorgelegt, 10 µL Überstand der X33-Transformanten-Kultur zugegeben, 5 min bei 25 °C und 750 RPM im Thermomixer comfort inkubiert, die Enzymreaktion mit 17 µL 15 mM PMSF (in Isopropanol) abgestoppt und bei 405 nm gemessen. Als Nullwert wurden die unbewachsenen Blank-Well's verwendet, welche mit BMMY gefüllt waren. Überstände vom X33-WT wurden als Referenzwerte für die rPK-Aktivität genutzt.

Aktive PK katalysiert durch Proteolyse die Bildung von pNA aus dem Modellsubstratpeptid Suc-AAPF-p-Nitroanilid [Müller *et al.*, 2002]. Bei einer Wellenlänge von 405 nm absorbiert pNA das Licht >290 nm, wodurch es möglich ist, die gebildete Produktmenge spektrometrisch zu ermitteln und daraus die Aktivität der rPK zu bestimmen.

Dabei ist eine Unit definiert, als die Bildung von 1 µmol pNA pro Minute bei 25 °C und einem pH-Wert von 8,0.

Berechnung der volumetrischen Aktivität:

$$\text{Volumenaktivität} \left[ \frac{U}{mL} \right] = \frac{\Delta E \times V_{\text{Test}} \times F_{\text{PMSF}} \times F_{\text{Verd}}}{\epsilon_{\text{pNA}} \times d_{\text{MTP}} \times V_{\text{PK}} \times t}$$

$$\left[ \frac{U}{mL} \right] = \left[ \frac{mL \times mmol \times cm}{\text{min} \times L \times cm \times mL} \right] = \left[ \frac{mmol}{\text{min} \times L} \right] = \left[ \frac{\mu mol}{\text{min} \times mL} \right]$$

$\Delta E$	Absorptionsänderung [ - ]
$V_{\text{Test}}$	Reaktionsvolumen ( $V_{\text{Test}} = 0,25 \text{ mL}$ )
$F_{\text{Verd}}$	Verdünnungsfaktor [ - ]
$F_{\text{PMSF}}$	PMSF-Verdünnungsfaktor ( $F_{\text{PMSF}} = 1,068$ )
$\epsilon_{\text{pNA}}$	Extinktionskoeffizient von para-Nitroanilin ( $\epsilon_{\text{pNA}} = 10,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
$d_{\text{MTP}}$	Lichtweg durch 267 $\mu\text{L}$ Probe pro MTP-well ( $d = 0,757 \text{ cm}$ )
$V_{\text{rPK}}$	eingesetztes Volumen an Proteinase K ( $V_{\text{rPK}} = 0,01 \text{ mL}$ )
$t$	Zeit des Enzymtests ( $t = 5 \text{ min}$ )

Der PMSF-Verdünnungsfaktor setzt sich aus dem Verhältnis von der Summe aus dem Reaktionsvolumen und dem eingesetzten Volumen an PMSF ( $V_{\text{PMSF}}$ ) zum Reaktionsvolumen zusammen:

$$F_{\text{PMSF}} [-] = \frac{V_{\text{Test}} + V_{\text{PMSF}}}{V_{\text{Test}}} = \frac{(250 \mu\text{L} + 17 \mu\text{L})}{250 \mu\text{L}} = 1,068$$

Der Lichtweg durch die Probe im MTP-well ( $d_{\text{MTP}}$ ) wurde über die Volumenberechnung des Zylinders ( $V_{\text{well}} = 0,267 \text{ cm}^3$ ) und dem gemessenen Durchmesser vom MTP-well ( $d_{\text{well}} = 0,67 \text{ cm}$ ) berechnet:

$$V_{\text{well}} = \frac{\pi \times d_{\text{well}}^2 \times d_{\text{MTP}}}{4}$$

$$d_{\text{MTP}} = \frac{4 \times V_{\text{well}}}{\pi \times d_{\text{well}}^2} = \frac{4 \times 0,267 \text{ cm}^3}{\pi \times 0,67^2 \text{ cm}^2} = 0,757 \text{ cm}$$

### 2.20.2.3 Volumenaktivität

Für die Bestimmung der rPK-Aktivität im Überstand der Proteinexpressionen im Schüttelkolben-Maßstab wurden die Aktivitätstests in Halbmikroküvetten mit dem Photometer *Ultrospec™ 3300 pro* bei 25 °C durchgeführt. Dazu wurden 1000  $\mu\text{L}$  50 mM Tris/HCl (pH 8,0) und 10  $\mu\text{L}$  125 mg/mL Suc-AAPF-pNA (in DMSO) in der Küvette vorgelegt, der Test durch Zugabe von 25  $\mu\text{L}$  Überstand gestartet und die Absorptionsänderung bei 405 nm über 3 min im Photometer aufgezeichnet. Die Volumenaktivität der rekombinanten rPK-Varianten wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Volumenaktivität} \left[ \frac{U}{\text{mL}} \right] = \frac{\Delta E / \text{min} \times V_{\text{Test}} \times F_{\text{Verd}}}{\epsilon_{\text{pNA}} \times d_{\text{K}} \times V_{\text{PK}}}$$

$$\left[ \frac{U}{\text{mL}} \right] = \left[ \frac{\text{mL} \times \text{mmol} \times \text{cm}}{\text{min} \times \text{L} \times \text{cm} \times \text{mL}} \right] = \left[ \frac{\text{mmol}}{\text{min} \times \text{L}} \right] = \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{mL}} \right]$$

$\Delta E/\text{min}$	Absorptionsänderung pro Minute
$V_{\text{Test}}$	Reaktionsvolumen ( $V_{\text{Test}} = 1,035 \text{ mL}$ )
$F_{\text{Verd}}$	Verdünnungsfaktor [ - ]
$\epsilon_{\text{pNA}}$	Extinktionskoeffizient von para-Nitroanilin ( $\epsilon_{\text{pNA}} = 10,4 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )
$d_K$	Schichtdicke der Küvette ( $d = 1 \text{ cm}$ )
$V_{\text{rPK}}$	eingesetztes Volumen an Proteinase K ( $V_{\text{rPK}} = 0,025 \text{ mL}$ )

#### 2.20.2.4 Poröser Träger

Für die Bestimmung der rPK-Aktivität auf Ni-Sepharose und ATS wurden die Aktivitätstests in 1,5 mL *Microtubes* durchgeführt und die Absorptionsmessung erfolgte in Halbmikroküvetten mit dem Photometer *Ultrospec™ 3300 pro* bei 25 °C. Dazu wurden ca. 1 g enzymgekoppelter Träger zunächst auf einer Glasfritte Por4/ G4 mit 3x 10 mL Immobilisierungspuffer-PK gewaschen und die gesamte Flüssigkeit mittels Unterdruck abgetrennt. Anschließend 28–30 mg abgetropftes Trägermaterial in *Microtubes* aliquotiert. Die PK-Substratlösung wurde vor und nach Inkubation bei 405 nm gemessen und die Absorptionsänderung pro Minute ermittelt. Gestartet wurde der Test durch Zugabe von 1000 µL PK-Substratlösung zur Trägermenge. Die Inkubation erfolgte für 35–40 s bei 25 °C und 1400 RPM (*Thermomixer comfort*). Der Reaktionsstopp erfolgte durch das Abtrennen der Flüssigkeit von den *beads*. Dazu wurden 2 mL PP-Spritzen mit integriertem PE-Vorfilter (25 µm Porengröße) und stumpfen Rundkanülen verwendet.

$$\text{Aktivität am Träger} \left[ \frac{U}{g_{\text{beads}}} \right] = \frac{\Delta E / \text{min} \times V_{\text{Test}} \times 1000}{\epsilon_{\text{pNA}} \times d_K \times m_{\text{beads}}}$$

$\Delta E/\text{min}$	Absorptionsänderung pro Minute
$V_{\text{Test}}$	Reaktionsvolumen ( $V_{\text{Test}} = 1 \text{ mL}$ )
$\epsilon_{\text{pNA}}$	Extinktionskoeffizient von para-Nitroanilin ( $\epsilon_{\text{pNA}} = 10,4 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )
$d_K$	Schichtdicke der Küvette ( $d = 1 \text{ cm}$ )
$m_{\text{beads}}$	eingesetzte Menge an porösem Träger feucht ( $m_{\text{beads}} = 28\text{-}30 \text{ mg}$ )

#### 2.20.2.5 PP-Folie

Für die Bestimmung der rPK-Aktivität auf PP-Folien wurden die Aktivitätstests in Hybridisierungsflaschen durchgeführt. Die Absorptionsmessung erfolgte in Halbmikroküvetten mit dem Photometer *Ultrospec™ 3300 pro* bei 25 °C. Dazu wurden PP-Folien (100 cm<sup>2</sup>) in Hybridisierungsflaschen überführt und mit 10,1 mL PK-Substratlösung für 17 min bei 23 °C und 19 RPM auf einem Rollermixer inkubiert. Die PK-Substratlösung wurde vor Versuchsbeginn und alle 2 min bei 405 nm vermessen und die Absorptionsänderung pro Minute ermittelt. Dazu wurde je Zeitpunkt 1 mL der Lösung entnommen, vermessen und wieder zurückgeführt.

$$\text{Aktivität am Träger} \left[ \frac{\text{mU}}{\text{cm}^2} \right] = \frac{\Delta E / \text{min} \times V_{\text{Test}} \times 1000}{\varepsilon_{\text{pNA}} \times d_K \times A_{\text{PP}}}$$

$\Delta E / \text{min}$	Absorptionsänderung pro Minute
$V_{\text{Test}}$	Reaktionsvolumen ( $V_{\text{Test}} = 10,1 \text{ mL}$ )
$\varepsilon_{\text{pNA}}$	Extinktionskoeffizient von para-Nitroanilin ( $\varepsilon_{\text{pNA}} = 10,4 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ )
$d_K$	Schichtdicke der Küvette ( $d = 1 \text{ cm}$ )
$A_{\text{PP}}$	eingesetzte Fläche an PP-Folie ( $A = 100 \text{ cm}^2$ )

### 2.20.3 Bestimmung der rMicNuc-Aktivität

#### 2.20.3.1 Volumenaktivität

Die Bestimmung der Nukleaseaktivität wurde in Halbmikro-UV/Vis-Küvetten mit dem Photometer *Ultrospec™ 3300 pro* bei 25 °C durchgeführt. 20 µL Enzymlösung wurden zu 980 µL MN-Substratlösung gegeben und die Absorption bei 260 nm verfolgt [Cuatrecasas *et al.*, 1967b; Jing *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2010].

Eine Unit an Enzymaktivität ist definiert als Enzymmenge, die einen Anstieg von einer Absorptionseinheit in einer Minute bei 260 nm verursacht.

$$\text{Volumenaktivität} \left[ \frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = \frac{\Delta E / \text{min} \times V_{\text{Test}} \times F_{\text{Verd}}}{d_K \times V_{\text{MicNuc}}}$$

$\Delta E / \text{min}$	Absorptionsanstieg pro Minute
$V_{\text{Test}}$	Reaktionsvolumen ( $V_{\text{Test}} = 1 \text{ mL}$ )
$F_{\text{Verd}}$	Verdünnungsfaktor [ - ]
$d_K$	Schichtdicke der Küvette ( $d = 1 \text{ cm}$ )
$V_{\text{rMicNuc}}$	eingesetztes Volumen an rMicNuc ( $V_{\text{rMicNuc}} = 0,02 \text{ mL}$ ).

#### 2.20.3.2 Reduktion von Disulfidbrücken

Die enzymatische Aktivität der rMicNuc-Varianten wurde sowohl unter reduzierenden als auch nicht reduzierenden Bedingungen bestimmt. Dazu wurden Enzymlösungen mit 25 mM Tris/HCl, 10 mM CaCl, pH 7,5 100-fach verdünnt, 10 mM DTT [Cleland, 1964; GE-Healthcare, 2008; Mansfeld *et al.*, 1999] zugesetzt, für 30 min bei RT und 1000 RPM (*Thermomixer comfort*) inkubiert und anschließend die Nukleaseaktivität gemessen (Kapitel 2.20.3.1). Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt (Kapitel 2.18.2). Für die SDS-PAGE Gelanalyse der rMicNuc-Varianten wurde dem Probenpuffer einmal 2-Mercaptoethanol zugesetzt (Kapitel 2.25) oder Probenpuffer ohne 2-Mercaptoethanol verwendet.

### 2.20.3.3 Poröser Träger

Für die Bestimmung der rMicNuc-Aktivität auf Ni-Sepharose und ATS wurden die Aktivitätstests in 1,5 mL *Microtubes* durchgeführt. Die Absorptionsmessung erfolgte in Halbmikro-UV/Vis-Küvetten mit dem Photometer *Ultrospec™ 3300 pro* bei 25 °C. Die Waschprozedur wurde wie im Fall der rPK durchgeführt (Kapitel 2.20.2.4). Anschließend wurde 28-30 mg abgetropftes Trägermaterial in *Microtubes* aliquotiert. Der Absorptionsanstieg pro Minute wurde nach Zugabe der MN-Substratlösung bei 260 nm gemessen. Aufgrund der adsorptiven Eigenschaft der DNA wurde als Negativkontrolle (Blank) der Wert verwendet, welcher bei Inkubation von 28-30 mg Träger ohne Enzymkopplung nach 60 Sekunden mit der MN-Substratlösung ermittelt wurde. Gestartet wurde der Test durch Zugabe von 1000 µL MN-Substratlösung zur Trägermenge. Die Inkubation erfolgte für 60 Sekunden bei 25 °C und 1400 RPM (*Thermomixer comfort*). Der Reaktionsstopp erfolgte durch das Abtrennen der Flüssigkeit von den *beads* mithilfe von 2 mL PP-Spritzen mit integriertem PE-Vorfilter (25 µm Porengröße) und stumpfen Rundkanülen.

$$\text{Aktivität am Träger} \left[ \frac{U}{g_{\text{beads}}} \right] = \frac{\Delta E / \text{min} \times V_{\text{Test}} \times 1000}{d_K \times m_{\text{beads}}}$$

$\Delta E / \text{min}$	Absorptionsänderung pro Minute
$V_{\text{Test}}$	Reaktionsvolumen ( $V_{\text{Test}} = 1 \text{ mL}$ )
$d_K$	Schichtdicke der Küvette ( $d = 1 \text{ cm}$ )
$m_{\text{beads}}$	eingesetzte Menge an porösem Träger feucht ( $m_{\text{beads}} = 28\text{-}30 \text{ mg}$ ).

### 2.20.3.4 PP-Folie

Für die Bestimmung der rMicNuc-Aktivität auf PP-Folien wurden die Aktivitätstests in Hybridisierungsflaschen durchgeführt. Die Absorptionsmessung erfolgte in Halbmikro-UV/Vis-Küvetten mit dem Photometer *Ultrospec™ 3300 pro* bei 25 °C. Dazu wurden PP-Folien (100 cm<sup>2</sup>) in Hybridisierungsflaschen überführt und mit 10 mL MN-Substratlösung für ca. 20 min bei 23 °C und 19 RPM auf einem Rollermixer inkubiert. Die MN-Substratlösung wurde vor Versuchsbeginn und aller 2 min bei 260 nm vermessen und der Absorptionsanstieg pro Minute ermittelt.

$$\text{Aktivität am Träger} \left[ \frac{mU}{\text{cm}^2} \right] = \frac{\Delta E / \text{min} \times V_{\text{Test}} \times 1000}{d_K \times A_{\text{PP}}}$$

$\Delta E / \text{min}$	Absorptionsänderung pro Minute
$V_{\text{Test}}$	Reaktionsvolumen ( $V_{\text{Test}} = 10 \text{ mL}$ )
$d_K$	Schichtdicke der Küvette ( $d = 1 \text{ cm}$ )
$A_{\text{PP}}$	eingesetzte Fläche an PP-Folie ( $A = 100 \text{ cm}^2$ ).

## 2.21 Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator

Für den Zellaufschluss wurde der HDH EmulsiFlex-C5 der Firma Avestin verwendet. Dafür wurde die BFM (1-4 g) in 40 mL IMAC-MN-Bindingpuffer (Tabelle 2-4) resuspendiert, auf Eis gelagert und anschließend mit einem Rührstab resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte in drei Passagen bei einem Druck von 1.000 bar. Der so erhaltene Rohenzymextrakt wurde für 40 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand chromatographisch aufgereinigt.

## 2.22 Ultrafiltration

Zum Konzentrieren größerer Mengen an Überstand oder zum Umpuffern von Lösungen wird unter anderem die Ultrafiltration angewendet. Dabei werden Makromoleküle oder gelöste Stoffe (z.B. Proteine) ihrer Größe nach über eine semipermeable Membran voneinander getrennt [Cheryan, 1990]. Mithilfe der Millipore-Ultrafiltrationsanlage und einer Ultrafiltrationskassette (Kwick lab Cassette) wurde der Fermentationsüberstand von X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK Klon 7 nach Herstellerangaben aufkonzentriert [GE-Healthcare, 2006].

## 2.23 Dialyse

Die zur Umpufferung verwendete Dialyse wurde, wenn nicht anders vermerkt, mit einem Dialyseschlauch Spectra/Por 6-8 kDa zweimal im Verhältnis 1:100 gegen VE-H<sub>2</sub>O oder Dialysepuffer bei 4 °C für je 1 h unter Rühren durchgeführt.

## 2.24 Chromatographie

Alle Chromatographieläufe wurden mit dem System Äkta Explorer von Amersham Bioscience durchgeführt. Die Datenaufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Unicorn 4.1 der Firma Amersham Bioscience. Alle bei der Chromatographie verwendeten Puffer und Lösungen wurden entgast und filtriert. Nach dem Lauf wurden alle verwendeten Säulen mit 3 CV VE-H<sub>2</sub>O gespült und in 20 % Ethanol gelagert. Es wurde von allen Fraktionen die UV-Absorption bei 280 nm und für ausgewählte Proben die Enzymaktivität bestimmt.

### 2.24.1 Immobilisierte Metallaffinitätschromatographie

Als Säulenmaterial kam Ni-Sepharose High Performance zum Einsatz. Vor der Verwendung der Säule wurde diese zur Entfernung des EtOH mit mindestens 3 CV VE-H<sub>2</sub>O gespült und anschließend mit Binding-Puffer äquilibriert.

### 2.24.1.1 IMAC von rPK-CT-His120

Der Probenauftrag erfolgte über eine Kombination von Direktbeladung und einem 150 mL Probenapplikator (*Superloop*<sup>TM</sup>) bei 3 mL/min auf eine Säule von 14 mL. Äquibriert und gewaschen wurde mit 3 CV IMAC-PK-Bindingpuffer. Eluiert wurde mit IMAC-PK-Elutionspuffer und einem Gradienten von 0 bis 100 % über 4 CV. Die Fraktionierungsvolumen betragen je 1,5 mL.

### 2.24.1.2 IMAC von rMicNuc-Varianten

Eine Säule von 9 mL wurde mit 3 CV IMAC-MN-Bindingpuffer äquibriert. Der Rohenzymextrakt aus dem HDH-Aufschluss wurde über einen 50 mL Probenapplikator (*Superloop*<sup>TM</sup>) mit 3 mL/min aufgetragen. Darauf folgte der Rückfaltungsschritt über einen Gradienten mit 3 CV auf 100 % IMAC-MN-Rückfaltungspuffer bei 1 mL/min. Eluiert wurde über einen 1x Stufengradienten (100 %) mit 5 CV IMAC-MN-Elutionspuffer bei 3 mL/min und einem Fraktionierungsvolumen von 2 mL.

## 2.24.2 Kationenaustauschchromatographie

Als Säulenmaterial kam Streamline SP-XL zum Einsatz. Vor der Verwendung der Säule wurde diese zur Entfernung des Ethanol mit mindestens 2 CV VE-H<sub>2</sub>O gespült und anschließend mit 3 CV KIA-Bindingpuffer äquibriert. Lösungen wurden entweder direkt oder über einen 150 mL Probenapplikator (*Superloop*<sup>TM</sup>) mit 5 mL/min auf eine Säule (CV= 75 mL) geladen. Nach Probenauftrag wurde die Säule mit 2 CV KIA-Bindingpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen. Danach wurde ein 1x Stufengradient auf 100 % KIA-Elutionspuffer über eine Verzögerung (*delay*) von 200 mL mit 5 mL/min gefahren. Das Fraktionierungsvolumen betrug 5 mL.

## 2.24.3 Gel-Permeations-Chromatographie

Mittels PD-10 Säule mit Sephadex G-25M als Säulenmaterial wurden Enzymlösungen umgepuffert. Die Prozedur zum Waschen und Äquilibrieren wurde laut Anleitung von GE-Healthcare mit entsprechendem Immobilisierungspuffer (Tabelle 2-4) durchgeführt [GE-Healthcare, 2007]. Anschließend erfolgte die Säulenbeladung mit max. 2,5 mL Enzymlösung und die Fraktionierung mit je 3,5 mL Immobilisierungspuffer.

## 2.25 Proteinanalyse mittels SDS-PAGE

Das Prinzip und die Durchführung der SDS-PAGE basierten auf der Methode von Laemmli [Laemmli, 1970]. Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden 1:2 in Probenpuffer aufgenommen oder 1/OD-Pellets in 100 µL Probenpuffer resolubilisiert, 5 min bei 99 °C im *Thermostat* inkubiert. Dem Probenpuffer wurde 1 % (v/v) 2-Mercaptoethanol zugefügt. Die Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele ist in Tabelle 2-11 aufgeführt. Die

Elektrophorese erfolgte zweistufig, pro Gel zuerst auf Stufe 1 für 6 min bei 300 V und 40 mA (konstant) und dann auf Stufe 2 für 40 min bei 300 V und 30 mA in Kathodenpuffer. Dazu wurde die *Mighty Small II* mit dem *Electrophoresis Power Supply* EPS 301 verwendet. Es wurden je 10  $\mu\text{L}$  Probe im Gel aufgetragen und anschließend entweder mit Coomassie [Neuhoff *et al.*, 1990] (2.25.1) oder Silber gefärbt [Blum *et al.*, 1987] (2.25.2). Als Referenz der Molekülgrößen wurden 5  $\mu\text{L}$  MW-Marker oder, sollte im Anschluss ein *Western Blot* durchgeführt werden [Burnette, 1981], 2  $\mu\text{L}$  PPL verwendet.

Tabelle 2-11: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele. Trenn- plus Sammelgel besaßen folgendes Format: 80 x 70 x 1 mm (Breite x Länge x Tiefe).

Komponente	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (4,5 %)
Gelpuffer	1,25 mL	625 $\mu\text{L}$
VE-H <sub>2</sub> O	1,65 mL	1,5 mL
Acrylamidlösung (30 %)	2,1 mL	375 $\mu\text{L}$
TEMED	5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$
Gesättigte APS-Lösung	10 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$

### 2.25.1 Färbung von SDS-PAGE Gelen mittels Coomassie

Bei der Coomassie-Färbung bindet der Coomassie-Farbstoff direkt basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren über Adsorption durch physikalische Kräfte [Winkler *et al.*, 2007]. Das SDS-Gel wurde über Nacht mit Färbelösung auf dem Wippschüttler RT-1S inkubiert. Nach der Färbung wurde das Gel mit VE-H<sub>2</sub>O abgespült und mit 3x 100 mL Entfärbelösung bis zum maximalen Kontrast entfärbt. Nach erneutem Spülen mit VE-H<sub>2</sub>O wurden die Gele für 30 min in 100 mL Trocknerlösung inkubiert. Die Gele wurden luftblasenfrei mit 1-2 mL Trocknerlösung zwischen zwei feuchte Cellophanfolien gelegt. Die anschließende Trocknung erfolgte durch Einspannen in einen Trocknungsrahmen für 1-2 Tage. Die densitometrische Analyse der Gele erfolgte mit dem *Gene Genius Bio Imaging System* und der Software *Gene Snap*.

### 2.25.2 Färbung von SDS-PAGE Gelen mittels Silber

Während der Silberfärbung wird das Gel mit Silberionen (Ag<sup>+</sup>) gesättigt. Silberionen binden bevorzugt basische AS [Winkler *et al.*, 2007] oder schwefelhaltige AS [Merril, 1986] der Proteine, die durch die Reduktion zum elementaren Silber angefärbt werden. Abbildung 2-5 zeigt die Durchführung.

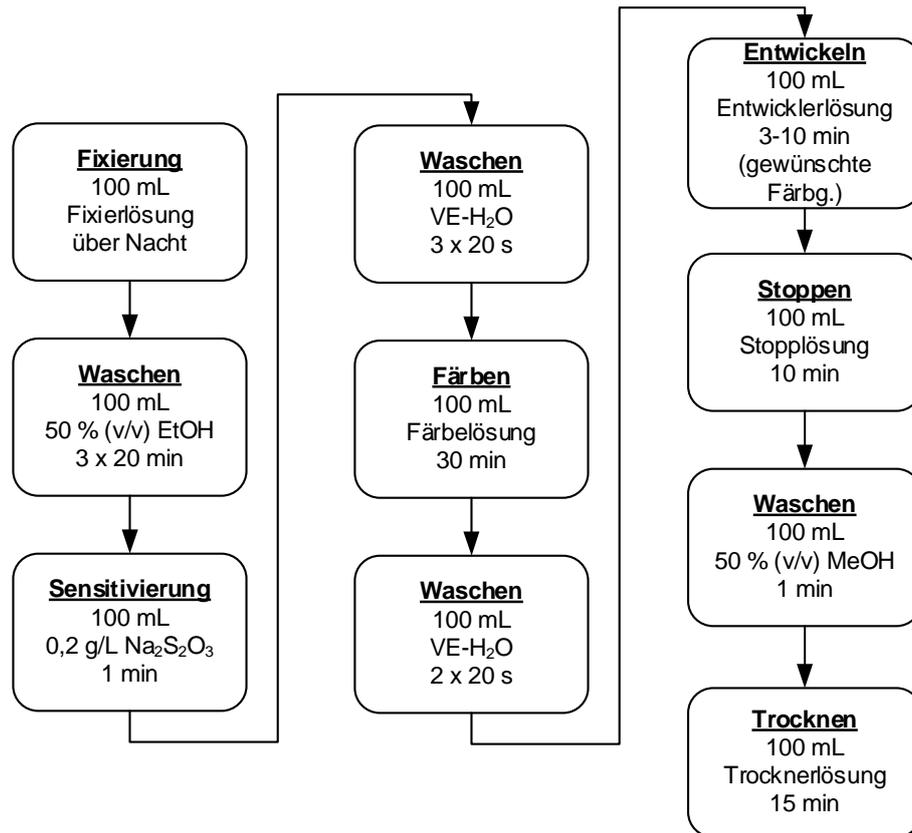


Abbildung 2-5: Übersicht der Durchführung zur Silberfärbung von Proteingelen nach Blum. Nach dem Trocknen wurden die Gele wie unter 2.25.1 beschrieben in Rahmen eingespannt. Unter Tabelle 2-4 sind die benötigten Lösungen aufgelistet.

## 2.26 Western Blot zum 6xHis-tag Nachweis

Zum Nachweis des 6xHis-tags wurden *Western Blots* durchgeführt [Burnette, 1981]. Dazu wurden auf SDS-PAGE Gel geladene Proteinproben auf Nitrozellulosemembranen übertragen und Proteine mit 6xHis-tag mittels Antikörper nachgewiesen. Als Positivkontrolle im *Western Blot* wurde bei der SDS-PAGE eine modifizierte Variante der mikrobiellen Transglutaminase (S2P-6xHis) [Marx *et al.*, 2008b] mitgeführt. S2P-6xHis wurde mit PBSB auf eine Konzentration von 0,5 oder 0,1 mg/mL eingestellt und für die SDS-PAGE 1:2 (v/v) mit Probenpuffer verdünnt. Für das *Blotting* der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden pro *Blot* sechs Gel-*Blotting*-Papiere und die Nitrozellulosemembran in Transferpuffer eingelegt und dann der *Blot* in der angegebenen Reihenfolge luftblasenfrei aufgebaut: Anode, drei Gel-*Blotting*-Papiere, Nitrozellulosemembran, Gel aus der SDS-PAGE, drei Gel-*Blotting*-Papiere und Kathode. Der Transfer fand 1 h bei 250 mA und konstanten 25 V im *Semi-Dry-Blotter* mit dem *Electrophoresis Power Supply* EPS 301 statt. Um unspezifische Bindestellen von primären mAK zu sättigen wurde die mit Protein besetzte Nitrozellulosemembran für 1 h auf dem Wippschüttler RT-1S in 15 mL Blockierlösung inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min mit 15 mL PBST gewaschen, 2 h in

10 mL 1:1000 (in Blockierlösung) verdünnter Maus-Anti-Polyhistidin-mAK-Lösung inkubiert und dreimal für 5 min mit 15 mL PBST gewaschen. Darauf folgte ein einstündiger Inkubationsschritt in 10 mL 1:5000 (in PBST) verdünnter Ziegen-Anti-Maus-IgG-AP-pAK-Lösung. Nach dreimal 5 min Waschen mit PBST wurde die Membran zur Signalbildung für 10-15 min in 10 mL AP-Substratlösung eingelegt. Abschließend wurde die Membran mit VE-H<sub>2</sub>O abgespült, luftgetrocknet und zur Dokumentation eingescannt.

Bei der Signalbildung durch die Alkalische Phosphatase wird das AP-Substrat BCIP durch die AP dephosphoryliert und in Anwesenheit von NBT zu einem unlöslichen blau-violetten Indigofarbstoff umgesetzt, der sich auf der Membranoberfläche absetzt [Sigma-Aldrich, 2008].

## 2.27 ESI-MS Analyse von Proteinen

Mittels Elektrosprayionisation (ESI) können in einer Proteinlösung Ionen erzeugt werden, indem an der Spitze einer Metallkapillare ein elektrisches Feld angelegt wird. An dieser Stelle treten nun gleichgeladene ionisierte Moleküle kegelförmig aus und werden vernebelt. Dabei verdampft das Lösungsmittel und in Abhängigkeit von der Oberflächenspannung bilden sich immer kleinere Tröpfchen. Die darin enthaltenen Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt, ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis gemäß sortiert und in einer Massenspektrometer-gekoppelten Ionenfalle analysiert. Somit ist es möglich, die Masse eines Moleküls zu bestimmen [Cole und Editor, 1997; Yunker *et al.*, 2013]. Durch weiteres Fragmentieren mittels Spannungsänderungen können Proteine unter Kenntnis der einzelnen Aminosäuremassen sequenziert werden. Oftmals kommt es zur Bildung sogenannter Addukt-Ionen bei denen Bestandteile des Puffers enthalten sein können (z.B. Natrium oder Wasserstoff).

Proteinlösungen wurden zunächst mit 50 mM Tris/HCL, pH 8 auf Konzentrationen von 0,5-1 mg/mL eingestellt, weiter verdünnt und über ZipTip-Spitzenaufsätze mit C<sub>18</sub>-Silicamatrix laut Herstellerangaben gereinigt. Im Anschluss wurde die Probe direkt in ein LTQ Orbitrap XL<sup>TM</sup>-Massenspektrometer injiziert und analysiert.

## 2.28 Immobilisierung an poröse Träger

### 2.28.1 Ni-Sepharose<sup>TM</sup> high performance

3 g Ni-Sepharose wurden für die rMicNuc-Enzymimmobilisierung 3x mit Immobilisierungspuffer-MN (Tabelle 2-4) gewaschen. Dazu wurde eine Glasfritte Por4/ G4 verwendet, welche über einen Dichtungsring auf einen Erlenmeyerkolben mit Seitenrohr aufgesetzt wurde. Der Kolben wurde an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und ein Unterdruck erzeugt, um die Lösung von den *beads* zu trennen. Die gleiche Prozedur erfolgte

für die Ni-Sepharose zur PK-Kopplung, wobei als Waschpuffer 3x 30 mL Immobilisierungspuffer-PK (Tabelle 2-4) verwendet wurde. Sämtliche Enzymlösungen wurden vor Inkubation mit der Ni-Sepharose über Gel-Permeations-Chromatographie (Kapitel 2.24.3) auf den jeweiligen Immobilisierungspuffer überführt und auf 0,1 mg/mL eingestellt. Zur Reduktion von gewünschten Cystein-Varianten wurden diese Enzymlösungen vor der Gel-Permeations-Chromatographie auf dem Rollermixer für 30 min bei 23 °C mit 15 mM DTT inkubiert.

Circa 1 g gewaschene Ni-Sepharose wurde mit 10-12 mL einer 0,1 mg/mL Enzymlösung in einem 15 mL Röhrchen für 90 min bei 4 °C und 19 RPM auf einem Rollermixer inkubiert. Die Enzymaktivität wurde vor und nach der Inkubation im Überstand sowie in allen Waschphasen gemessen. Außerdem wurde die Aktivität auf dem Träger und die Aktivität nach der Elution im Überstand bestimmt. Die Aktivitätsdifferenz beschreibt die nach Inkubation im Überstand fehlende Aktivität, d.h. die Initialaktivität subtrahiert mit der Aktivität nach Immobilisierung, subtrahiert mit der Aktivität in den Waschphasen. Pro Ansatz wurden die *beads* 3x mit 30 mL Immobilisierungspuffer gewaschen, wobei die letzte Waschphase unter Hochsalz erfolgte. Die Hochsalzkonzentration wurde durch Zugabe von 0,5 bzw. 1 M NaCl zum jeweiligen Immobilisierungspuffer hergestellt. Die Standardabweichung bei der Messung der Aktivität am Träger lag bei ca. 5 %. Zur Untersuchung der Eluierbarkeit der Enzyme vom Träger wurden 100 mg Enzym gekoppelte Ni-Sepharose mit 1,8 mL Immobilisierungspuffer und 500 mM Imidazol [GE-Healthcare, 2005] für 30 min bei 25 °C und 1400 RPM (*Thermomixer comfort*) inkubiert. Nach 5 min Sedimentierung konnte der Überstand im Aktivitätsassay vermessen werden (Kapitel 2.20.3.3).

### **2.28.2 Aktivierte Thiol-Sepharose 4B**

300 mg ATS (trocken) [Mansfeld *et al.*, 1999] wurden laut Anleitung gequollen [GE-Healthcare, 2008] und jeweils dreimal mit 10 mL Immobilisierungspuffer-MN oder -PK auf einer Glasfritte Por4/ G4 gewaschen (Kapitel 2.28.1). Circa 1 g ATS (feucht) wurde mit 12 mL Enzymlösung (rPK 0,15 mg/mL und rMicNuc 0,1 mg/mL) für 3 h bei 4 °C und 19 RPM in einem 15 mL Röhrchen auf einem Rollermixer inkubiert. Die Messung der Enzymaktivitäten und die Bilanzierung erfolgte wie unter Kapitel 2.28.1 beschrieben. Dabei lag die durchschnittliche Standardabweichung bei der Aktivitätsmessung für rPK und rMicNuc am Träger bei 5 %. Sämtliche Enzymlösungen wurden vor Inkubation mit der ATS über Gel-Permeations-Chromatographie (Kapitel 2.24.3) auf den jeweiligen Immobilisierungspuffer überführt und auf 0,1 mg/mL (rMicNuc-Varianten) bis 0,15 mg/mL (rPK-Varianten) eingestellt. Zur Reduktion von gewünschten Cystein-Varianten wurden diese Enzymlösungen vor der Gel-Permeations-Chromatographie auf dem Rollermixer für 30 min bei 23 °C mit 10-15 mM DTT inkubiert.

## 2.29 Immobilisierung an PP-Folie

Die Plasmamodifikation und die nasschemische Lysinmodifikation wurden durch Herrn Dr. Jakob Barz (Fraunhofer IGB Stuttgart) durchgeführt. Kommerzielle PP-Folien wurden zu 100 cm<sup>2</sup> großen Stücken zugeschnitten und mit Isopropanol gereinigt. Da PP chemisch inert ist, wurden zunächst Folien mithilfe von Niederdruckplasma bei einer kontinuierlichen Leistung von 40 W für 10 min mit 2,3-Epoxypropylmethacrylat (EPMA) beschichtet, um Epoxidgruppen zu generieren. Im Anschluss erfolgte an epoxidierten Folien die Anbindung eines NTA-Analogons. Die Folien wurden dazu bei RT für 24 h mit 250 mM  $\alpha,\alpha$ -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin in 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Puffer pH 11 inkubiert und anschließend mit reinem Puffer und VE-H<sub>2</sub>O gespült. Die erfolgreiche Anbindung der Epoxidgruppen (PP<sub>epoxid</sub>-Folien) und des Lysins wurde über Infrarotspektroskopie (FTIR) mit Diamant-ATR (*attenuated total reflection*-Infrarotspektroskopie) und XPS (Röntgenphotoelektronenspektroskopie) nachgewiesen [Daten nicht gezeigt]. Dabei wurde die Beschichtung mit einer Monolage durch Herrn Dr. Barz bestätigt, da der Anteil der Sauerstoffgruppen und der Stickstoffgruppen anstieg, während die aliphatischen Kohlenstoffe absanken.

Als letzter Modifikationsschritt wurden  $\alpha,\alpha$ -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin beschichtete PP-Folien jeweils mit 10 mL 0,1 M Nickelsulfat bei 23 °C für 30 min bei 19 RPM (Rollermixer) in Hybridisierungsflaschen inkubiert und zweimal mit je 10 mL VE-H<sub>2</sub>O gewaschen (PP<sub>Ni-NTA</sub>-Folien).

### 2.29.1 Zielgerichtete und ungerichtete Immobilisierung der rPK

Für die Kopplung von rPK an unmodifizierte und mit Epoxidgruppen beschichtete PP-Folie wurde rPK verwendet, während für die PP<sub>Ni-NTA</sub>-Folien rPK-CT-His120 eingesetzt wurde. 2 mL Enzymlösung (1 mg/mL) aus der Fermentation X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK-Klon 7, welche über Kationenaustauschchromatographie aufgereinigt wurde (Kapitel 3.1.2.4) und 2 mL aus der Kultivierung von X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK-CT-6xHis Klon 120, mittels IMAC gereinigt, wurden über eine PD10-Säule (Kapitel 2.24.3) auf 1 M KPP pH 7 überführt und eine Startaktivität von 1 U/mL (rPK= 416 U/mg; rPK-CT-His120= 401 U/mg) eingestellt. Somit liegt die Startenzymkonzentration bei etwa 0,0024 mg/mL. Durch eine hohe Ionenstärke wird die Adsorption von Proteinen an Oberflächen begünstigt, was die Reaktion von Epoxid- zu Aminogruppen verbessert. Dazu werden oft Natriumphosphatpuffer [Mateo *et al.*, 2002] oder Kaliumphosphatpuffer [Damjanovic *et al.*, 2011; Minter *et al.*, 2011; Zuza *et al.*, 2007] eingesetzt. Angelehnt an diese Publikationen zur Kopplung von Enzymen an epoxidierte Träger, wurde wie folgt verfahren. Die unbehandelten, epoxidierten und Ni-NTA beschichteten PP-Folien (A=100 cm<sup>2</sup>) wurden mit der reaktiven Seite nach oben in Hybridisierungsflaschen überführt und mit je 10 mL der rPK-Lösung bzw. rPK-CT-His120 Lösung für 20 h bei 23 °C und 19 RPM auf einem Rollermixer inkubiert. Im Anschluss

erfolgte ein Blockschrift, um nicht reagierte Epoxidgruppen abzusättigen. Dazu wurde die Enzymlösung abgenommen und die PP-Folienstücke mit 10 mL 20 mM KPP, 5 % 2-Mercaptoethanol pH 7 für 24 h inkubiert [Mateo *et al.*, 2002]. Nach dem Blockschrift wurde 3x mit je 10 mL 20 mM KPP pH 7 für 5 min gewaschen, wobei beim letzten Waschschrift zusätzlich 500 mM NaCl im Puffer enthalten waren. Durch diese Hochsalzlösung werden über ionische Wechselwirkungen nicht kovalent adsorbierte Proteine heruntergewaschen. Alle Waschfraktionen wurden auf Enzymaktivität untersucht, bis keine volumetrische Aktivität mehr gemessen werden konnte. Die Lagerung der enzymbeladenen Folien erfolgte in 50 mL Röhren in 20 mM KPP pH 7 bei 4 °C.

### **2.29.2 Zielgerichtete und ungerichtete Immobilisierung der rMicNuc**

Für die Kopplung von rMicNuc an unmodifizierte-, epoxidierte und Ni-NTA modifizierte PP-Folie wurde die rMicNuc verwendet. IMAC gereinigte Enzymlösung aus einer Kultivierung von BL21Gold (DE3)/pET20b-MicNuc (R)-6xHis wurde mittels PD10-Säule (Kapitel 2.24.3) auf 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl pH 7 überführt und anschließend auf 1 U/mL eingestellt. Bei einer spezifischen Aktivität der rMicNuc von 456 U/mg, entspricht das etwa einer Startenzymkonzentration von 0,002 mg/mL. Tris-Puffer wurde verwendet um eine Bilanzierung der Aktivitätsmessungen zu gewährleisten, da bei Verwendung von Phosphatpuffer mit dem CaCl in der MN-Substratlösung schwerlösliches Kalziumphosphat ausfällt. Die PP-Folien wurden in Hybridisierungsflaschen überführt und mit je 10 mL der rMicNuc-Lösung für 20 h bei 23 °C und 19 RPM auf einem Rollermixer inkubiert. Auf einen zusätzlichen Blockschrift wurde verzichtet, da dieser direkt als Konkurrenzreaktion zwischen Tris- und Enzym-Aminogruppen durchgeführt wurde. Zuletzt wurden alle PP-Folien bis zu 3x mit je 10 mL 50 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl pH 8 gewaschen, bis keine volumetrische Aktivität mehr gemessen werden konnte. Die Lagerung der enzymbeladenen Folien erfolgte in 50 mL Röhren in 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl pH 8 bei 4 °C.

## 2.30 Bioassay mit *Pseudomonas fluorescens*

### 2.30.1 Auswirkung der *Pseudomonas fluorescens* Kultivierungsbedingungen auf die enzymatische Aktivität von rPK-CT-His120 und rMicNuc

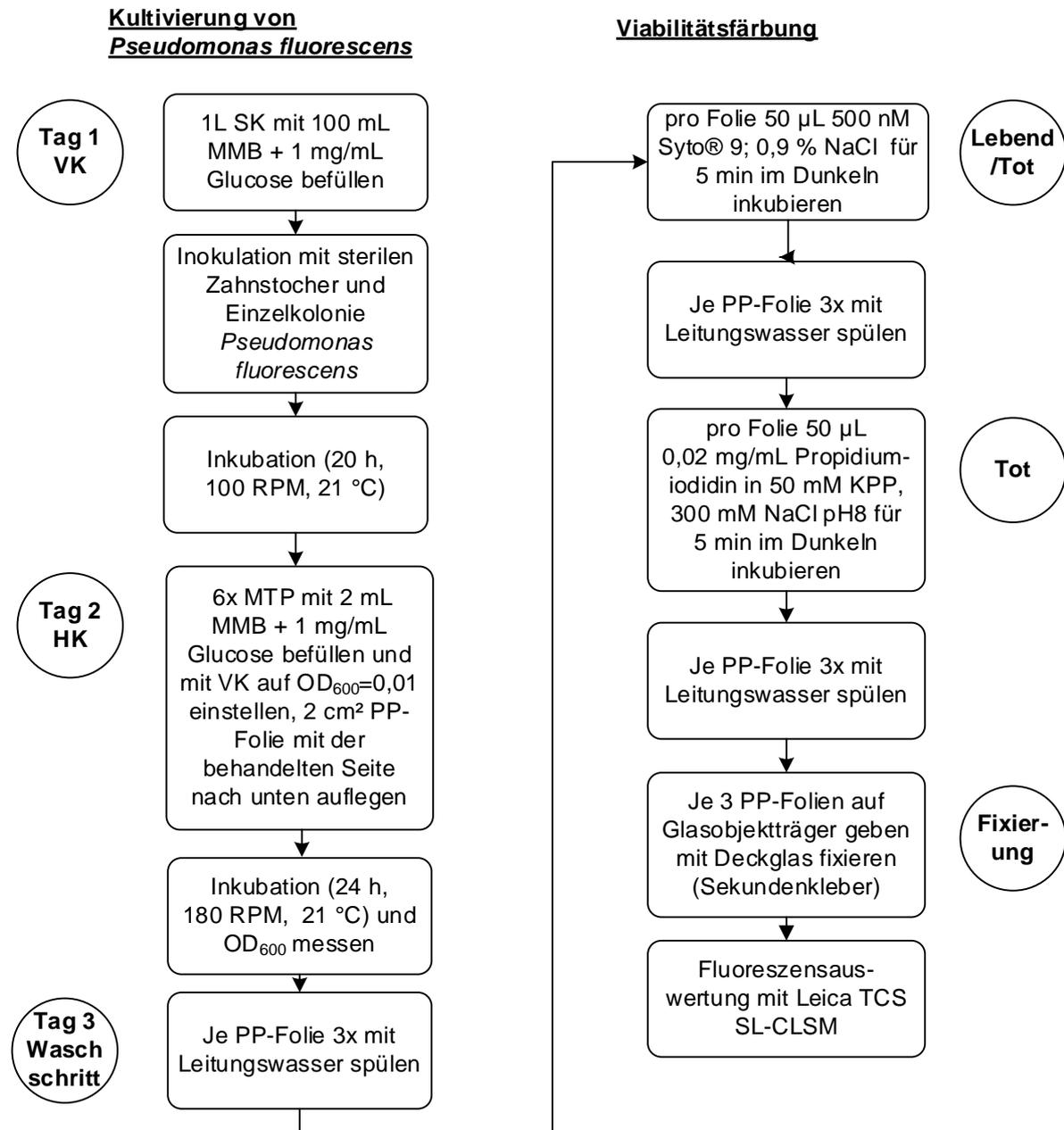
IMAC gereinigte Proteinlösung rPK-CT-His120 aus der Kultivierung X33/pPICZαA-Pro-PK-CT-6xHis Klon 120, über eine PD10-Säule (Kapitel 2.24.3) auf sowohl 50 mM Tris/HCl pH 8,0 (Puffer der PK-Substratlösung) als auch auf Minimalmedium (MM) nach Brunner überführt. Anschließend wurden beide Proteinlösungen mit dem jeweiligen Puffer auf 1 U/mL verdünnt. Für die rMicNuc-Lösung aus *E. coli* BL21Gold (DE3)/pET20b-MicNuc (R)-6xHis (IMAC gereinigt) wurde nach gleichem Prinzip verfahren, nur, dass der Puffer aus der MN-Substratlösung verwendet wurde (25 mM Tris/HCl, 10 mM CaCl pH 7,5). Die Proteinlösungen, welche in Substratpuffer überführt wurden, wurden bei 25 °C und bei 21 °C für 30 min bei 1200 RPM (*Thermomixer comfort*) inkubiert und die Lösungen in MMB nur bei 21 °C. Auch die Bestimmung der volumetrischen Aktivitäten für rPK-CT-His120 (Kapitel 2.20.2.3) sowie für rMicNuc (Kapitel 2.20.3.1) wurde bei den unterschiedlichen Temperaturen und in MMB in einem angepassten Küvettenassay durchgeführt.

### 2.30.2 Durchführung des Bioassays zur Biofilmbildung

Für den Bioassay wurde steril und mit autoklavierten Lösungen gearbeitet. Die modifizierten PP-Folien von A=100 cm<sup>2</sup> wurden zu Beginn mit einer sterilen Schere in 2 cm<sup>2</sup> große Rechtecke zerschnitten. Jeweils ein Stück PP-Folie (aus dem Bereich der Mitte) wurde in ein well der 6x MTP mit *Pseudomonas* kultiviert überführt. Die Start-OD<sub>600</sub> betrug 0,01. Insgesamt wurden pro modifizierter PP-Folie drei Rechteckstücke im Bioassay verwendet. Die Folienstücken wurden mit der behandelten Seite nach unten auf die Kultur gelegt, da die Folie auf der Lösung schwamm. Nach der Kultivierung von 24 h sowie der Viabilitätsfärbung (Abbildung 2-6) wurden die Folienstücke fixiert und mit einem CLSM und der Bildanalysesoftware Cell<sup>^</sup>F v2.6 2007 analysiert. Die Färbung basiert auf der Lebend/Tot Viabilitätsfärbung mit Syto® 9 und Propidiumiodid [Hannig *et al.*, 2007; Honraet und Nelis, 2006; Zvab *et al.*, 2014]. In Abbildung 2-6 ist die Durchführung zur Kultivierung von *Pseudomonas fluorescens* und die Inkubation mit PP-Folien gezeigt. Weiter ist auch die Viabilitätsfärbung der angehefteten *Pseudomonas* auf der PP-Folie dargestellt. Für die Bildgebung wurde mit einem Leica TCS SL-CLSM und der Leica Confokal Software v1.4 2004 gearbeitet. Dabei wurde ein 20x Objektiv verwendet. Die Anregung der Farbstoffe erfolgte bei Syto® 9 mit einem Argonlaser bei 488 nm (grüne Darstellung) und bei Propidiumiodid mit einem Helium-/Neonlaser bei 543 nm (rote Darstellung). Für die Detektoreinstellung wurde für Syto® 9 eine Photomultiplier-Spannung von 498 V und bei Propidiumiodid von 651 V gewählt. Ein Raster von neun Einzelbildern mit einer Fläche von

0,75 mm<sup>2</sup> wurde gescannt und über die Software zu einem 2,25 mm<sup>2</sup> großem Bild mit 24-Bit und einer Auflösung von 1024x1024 Pixel zusammengesetzt.

Zur Analyse der CLSM-Aufnahmen wurde mit der Software *analySIS Cell<sup>AF</sup> v2.6 2007* von der Firma Olympus gearbeitet, die aus dem 24-Bit ein 8-Bit Bild konvertiert. Auch der Bedeckungsgrad wurde mit dieser Software ermittelt.



**Schüttelkolben (SK)**  
(Kultivierung Orbitalshaker PSU-10i)

Abbildung 2-6: Ablaufschema der Schüttelkolben (SK)- bzw. 6x MTP-Kultivierung von *Pseudomonas fluorescens* zur Untersuchung der Biofilmbildung an PP-Folien (links) und anschließender Viabilitätsfärbung an Tag 3 (rechts).

## 3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die rekombinante Produktion zweier Enzyme in aktiver Form, um diese in zielgerichteter, immobilisierter Form zum Abbau von Polymeren zu untersuchen, die beim Biofilmaufbau beteiligt sind. Im Fokus stand die Proteinase K (PK) aus *Tritirachium album* und die *micrococcale nuclease* (MicNuc) aus *Staphylococcus aureus*. Es wurde gezeigt, dass Enzyme aus der Klasse der Subtilisine auf die Degradation von Biofilmen einen positiven Einfluss besitzen [Cordeiro *et al.*, 2011; Leroy *et al.*, 2008b; Molobela, 2010; Pettitt *et al.*, 2004]. Ebenso interessant ist die destabilisierende Wirkung von Nukleasen auf Biofilme [Fredheim *et al.*, 2009; Izano *et al.*, 2009; Mann *et al.*, 2009]. Derzeit wird PK industriell heterolog in *Pichia pastoris* hergestellt. Eine Publikation zur heterologen Produktion in *Pichia pastoris* existiert nicht. Lediglich ein Patent der Firma Roche Diagnostics GmbH ist bekannt [Müller *et al.*, 2002]. Eine kommerzielle PK-Variante mit His-tag ist nicht erhältlich. Im Fall der MicNuc ist die Produktion in *E. coli* bereits publiziert [Jing *et al.*, 1992; Shortle, 1983]. Ebenso konnte eine Variante mit His-tag hergestellt werden [Yuanhe *et al.*, 1997], die jedoch kommerziell nicht verfügbar ist. Eine zielgerichtete Immobilisierung der PK und der MicNuc ist nicht bekannt. Aus diesem Grund soll für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit produzierten Enzyme genetische Modifikationen durchgeführt werden, um die Grundlage für eine zielgerichtete Immobilisierung zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang wurden Histidin-tags und Cysteine in die native AS-Sequenz eingeführt oder vorhandene Cysteine genutzt. Im Anschluss wurde der Einfluss der zielgerichtet immobilisierten Enzyme auf die Biofilmbildung untersucht. Dieser Bioassay wurde am Beispiel von *Pseudomonas fluorescens* durchgeführt.

### 3.1 Bereitstellung der Enzyme und deren Varianten zur gerichteten Immobilisierung

#### 3.1.1 Nuklease aus *Staphylococcus aureus*

##### 3.1.1.1 Gendesign und Synthese

Für die Produktion der rMicNuc in *E. coli* wurde die Gensequenz der Nuklease R (EC 3.1.31.1), eine Sonderform der Nuklease A aus *Staphylococcus aureus* gewählt [Jing *et al.*, 1992; Shortle, 1983]. Um eine optimale Expression zu gewährleisten, wurde eine *Codon usage*-Anpassung für *E. coli* durchgeführt. Dazu wurde das Programm Gene Designer Version 1.1.4.1 (Copyright © 2005 - 2007 DNA 2.0 Inc.) [Villalobos *et al.*, 2006] verwendet und die *codon usage*-Tabelle von *E. coli* über die Kazusa-Datenbank [KDRI, 2007] bezogen (Schwellenwert 10 %). Zudem wurde eine alternierende AS-Sequenz aus CAT/CAC an den nativen rMicNuc-C-Terminus angefügt, welcher für einen 6xHis-tag codiert (die Nukleotid-

und Aminosäuresequenz finden sich in Anhang 8.1.1). Die heterologe Produktion einer His-getaggen rMicNuc ist in der Literatur bereits beschrieben [Yuanhe *et al.*, 1997]. Diese erfolgte mit einem 6xHis-tag am N-Terminus und einer Induktion der Expression über Temperaturänderung. Auch eine Expression der Nuklease A über IPTG-Induktion ist bereits in BL21(DE3)-Zellen gezeigt worden [Tang *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2000]. Die rMicNuc wird zum größten Teil unlöslich als *inclusion bodies* exprimiert, was einen zusätzlichen Renaturierungsschritt notwendig macht. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression ebenfalls durch IPTG-Induktion über den T7-Promoter realisiert. Zudem sollte die Rückfaltung von *inclusion bodies* vereinfacht werden. Für die Klonierung in den Vektor pET20b(+) wurden Restriktionsschnittstellen in der Gensequenz der MicNuc eingebracht und das Konstrukt zur Synthese an die Firma Eurofins MWG Operon übergeben. Die Ligation in den Expressionsvektor pET20b(+) über die Restriktionsschnittstellen NdeI und XhoI wurde ebenfalls durch Eurofins MWG Operon realisiert. Die Vektorkarte des finalen Plasmids pET20b-MicNuc (R)-6xHis ist in Abbildung 3-1 und die Translationskarte für das MicNuc-Gen im Anhang 8.1.1 gezeigt. pET20b(+) ist ein *high copy* Plasmid für die IPTG-induzierbare Expression in *E. coli*. Unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors wird die T7-RNA-Polymerase nach IPTG-Zugabe produziert und im Anschluss, dass unter der Kontrolle des T7-Promotors liegende MicNuc-Gen exprimiert [Studier und Moffatt, 1986].

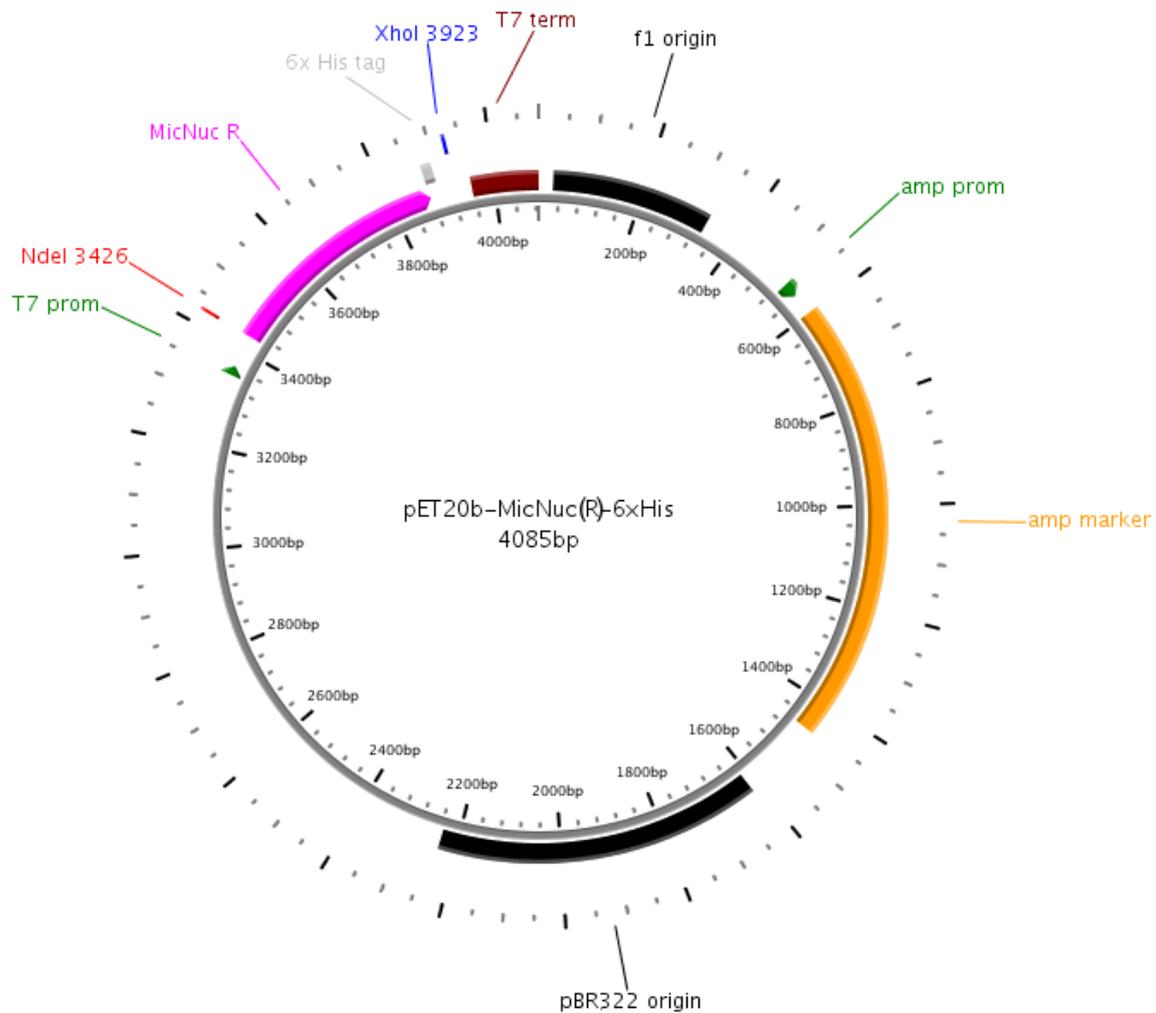


Abbildung 3-1: Vektorkarte von pET20b-MicNuc (R)-6xHis (4085 Bp). Restriktionsschnittstellen (NdeI 3426, XhoI 3923), T7-Promoter (T7 prom), T7-Terminator (T7 term), Replikationsursprung f1 Phage (f1 origin), Ampicillin-Resistenzgen (amp marker) und Promoter (amp prom), pUC-Replikationsursprung (pBR322 origin). Das klonierte MicNuc R-6xHis-Gen ist 492 Bp lang. Diese Plasmidkarte wurde mittels PlasMapper 2.0 generiert [Dong *et al.*, 2004].

### 3.1.1.2 Qualitätskontrolle des synthetisierten MicNuc-Gens und Generierung von Cystein-Varianten

Die von Eurofins MWG Operon synthetisierte DNA wurde in sterilem VE-H<sub>2</sub>O resolubilisiert und für die Amplifikation in *E. coli* DH5α transformiert und ausplattiert (Kapitel 2.12.3). Sechs gewachsene Klone wurden für eine Plasmidpräparation in LB<sub>Amp</sub>-Medium angezogen (Kapitel 2.14). Die isolierten Plasmide wurden in einer Agarose-Gelwertung dokumentiert (Abbildung 3-2). Durch den physischen Stress der Plasmidpräparation liegen aufgereinigte Plasmide oft in drei möglichen Formen im Gel vor. Es kann zwischen der superhelikalen, linearen und offen-zirkulären Form unterschieden werden [Hintermann *et al.*, 1981]. Bei allen sechs isolierten Plasmiden von pET20b-MicNuc (R)-6xHis konnte eine Bande bei 4085 Bp detektiert werden, welche der korrekten linearisierten Plasmidform entspricht. Die

superhelikale Plasmidform dominiert bei ca. 2600 Bp und auch die offen-zirkuläre Form ist bei 6000 Bp zu erkennen. Die Plasmidpräparationen von Klon 1, 4 und 5 von DH5 $\alpha$ / pET20b-MicNuc (R)-6xHis wurden mithilfe von T7-Primern (Tabelle 2-5) in einer Sequenzierung untersucht (Kapitel 2.17) und zeigten alle das korrekte MicNuc-Gen mit alternierendem 6xCAT/CAC-*tag* (Anhang 8.1.1). Klon 1 von DH5 $\alpha$ /pET20b-MicNuc (R)-6xHis wurde erneut von der LB<sub>Amp</sub>-Agarplatte in LB<sub>Amp</sub>-Medium überführt und analog der Plasmidpräparation angezogen (Kapitel 2.14) und als Kryokultur gelagert (Kapitel 2.19.5).

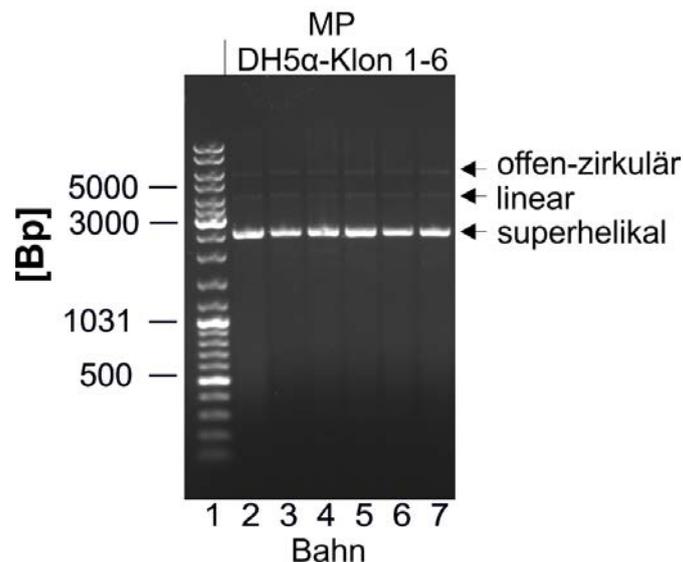


Abbildung 3-2: Agarosegel isolierter Plasmide von pET20b-MicNuc (R)-6xHis aus DH5 $\alpha$ -Klonen. Bahn 1: GeneRuler DNA Ladder Mix [5  $\mu$ L]; Bahn 2-7: Plasmidpräparationen (MP) aus transformierten DH5 $\alpha$ -Klonen (1-6) [10  $\mu$ L]; Knapp unterhalb der 3000 Bp Marke läuft die superhelikale- (2600 Bp), unterhalb der 5000 Bp Marke die lineare- (4085 Bp) und bei 6000 Bp die offen-zirkuläre Plasmidform.

Als alternative Kopplungsmethode, neben der Immobilisierung von Enzymen via His-*tag*, kann über Disulfidbrücken zielgerichtet immobilisiert werden. Zu diesem Zweck wurden rMicNuc-Varianten erzeugt, bei denen ausgewählte Serine durch Cysteine substituiert wurden. In der nativen MicNuc-AS-Sequenz sind keine Cysteine vorhanden. Eine gezielte Insertion von Cystein-Resten zwecks zielgerichteter Immobilisierung über Disulfidbrücken ist bekannt [Zimmermann *et al.*, 2010]. Diese Kopplungsmethode ermöglicht auch einen wiederholten Einsatz von Enzymen, da mithilfe von Reduktionsmitteln Schwefelbrücken gebrochen werden können. Für die Immobilisierung eignen sich modifizierte Oberflächen, die freie Thiolreste tragen oder Epoxidgruppen besitzen [Hernandez und Fernandez-Lafuente, 2011; Mateo *et al.*, 2002; Sheldon, 2007].

Bei der gezielten Aminosäuresubstitution ist entscheidend, die Struktur des Proteins so wenig wie möglich zu beeinflussen, um Fehlfaltungen zu vermeiden. Weiterhin ist darauf zu achten, dass die Position über die immobilisiert werden soll, nicht in der Nähe des aktiven

Zentrums der rMicNuc liegt. So wird das Risiko einer Beeinträchtigung der Substratzugänglichkeit herabgesetzt.

Cystein weist große strukturelle Ähnlichkeit mit Serin auf (Tabelle 3-1). Daher sollte an ausgewählten Positionen ein Austausch der beiden Aminosäuren durchgeführt werden. Dieses Vorgehen sollte den negativen Einfluss auf die native Proteinstruktur minimieren. Die Enzymkopplung über mehrere Thiolreste kann das *multipoint attachment* und somit eine Vergrößerung der Stabilität während der Immobilisierung verbessern [Grazú *et al.*, 2010; Hanefeld *et al.*, 2009; Mansfeld und Ulbrich-Hofmann, 2000].

Es wurden drei Cystein-Varianten der rMicNuc generiert, die in Tabelle 3-2 dargestellt sind. An den AS-Position 10, 135 und 154 wurde Serin zu Cystein substituiert (Abbildung 3-3).

Tabelle 3-1: Eigenschaften von AS Cystein und Serin im Überblick [Taylor, 1986].

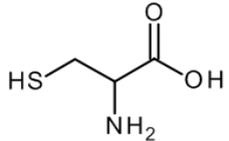
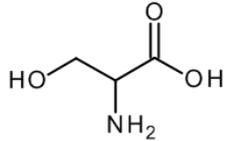
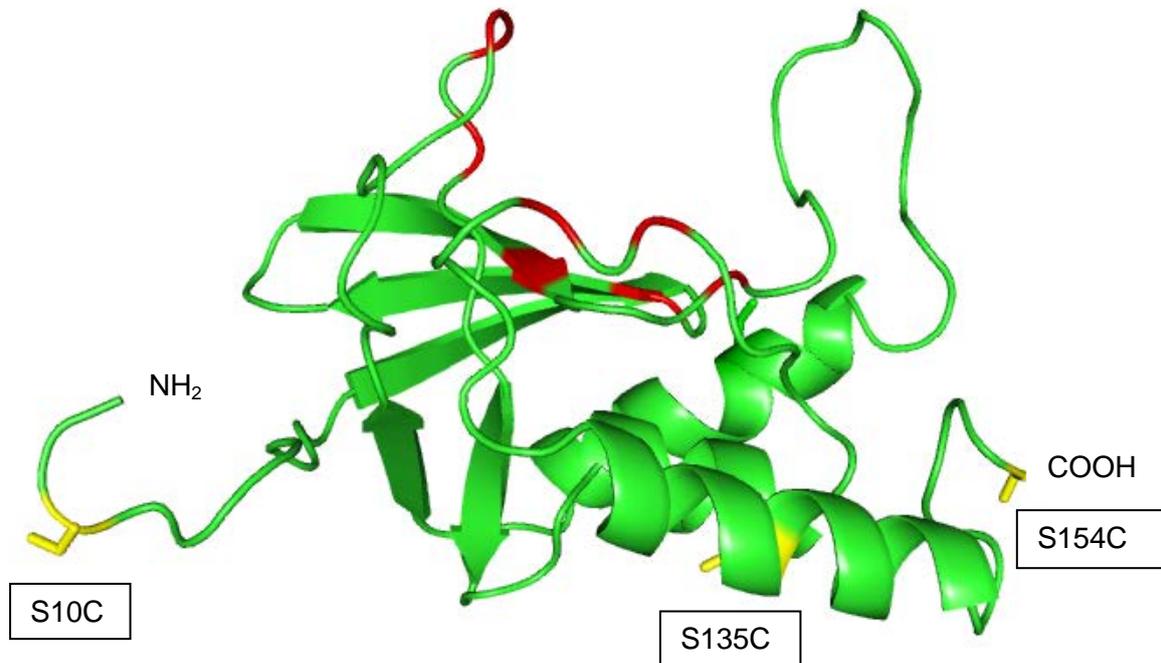
AS	Abk.	Code	Seitenkette	Charakter	Polarität	pH	Strukturformel
Cystein	Cys	C	-CH <sub>2</sub> SH	aliphatisch	polar	neutral	
Serin	Ser	S	-CH <sub>2</sub> OH	aliphatisch	polar	neutral	

Tabelle 3-2: Übersicht der generierten rMicNuc- Varianten.

Variante	Mutanten-ID	Basenaus- tausch	AS-Position	AS- Substitution
rMicNuc	rMicNuc R-6xHis	/	/	/
Cys-Einfach- Variante	rMicNuc S10C	TCT->TGT	10	
Cys-Zweifach- Variante	rMicNuc S10 154C	TCT->TGT TCT->TGT	10 154	S→C
Cys-Dreifach- Variante	rMicNuc S10 135 154C	TCT->TGT TCC->TGC TCT->TGT	10 135 154	



```

MDPTVYSATCTKKLHKPATLIKAIDGDTVKLMYKGQPMFRLLLVDTPETKHPKKGVEKYGPEASAF
TKKMVENAKKIEVEFDKGQRTDKYGRGLAYIYADGKMVNEALVRQGLAKVAIVYKPNNTHEQHRLRCKE
AQAKKEKLNIEWSEDNADCGQHSHHHHH

```

Abbildung 3-3: 3D-Struktur der MicNuc aus *Staphylococcus aureus*: PDB:2SNS [Cotton *et al.*, 1979], erstellt mit PyMOL 1.3; Grün: Cartoon-Darstellung der Tertiärstruktur Rot: Aktives Zentrum; Gelb: Eingeführte Cysteine als *sticks*; Im Rahmen: Die neue AS-Sequenz der rMicNuc Cys-Dreifach-Variante (S→C) mit Peptid-tag GQ(H)<sub>6</sub>.

Für die Cys-Einfach-Variante (rMicNuc S10C) wurde in der ortsgerichteten Mutagenese-PCR (Kapitel 2.15.2) als Template das Plasmid pET20b-MicNuc (R)-6xHis und das Primerpaar Pcys10 (Tabelle 2-5) eingesetzt. Zum Generieren der Cys-Zweifach-Variante (rMicNuc S10 154C) wurde als Template Plasmid-DNA aus der Plasmidpräparation der Cys-Einfach-Variante mit dem Primerpaar Pcys154 (Tabelle 2-5) verwendet. Für die Cys-Dreifach-Variante (rMicNuc S10 135 154C) wurde Plasmid-DNA aus der Cys-Zweifach-Variante mit den Pcys135-Primern in einer Mutagenese-PCR eingesetzt. Am Ende jeder Mutagenese-PCR wurde ein DpnI-Verdau (Kapitel 2.16) durchgeführt, um die methylierte Template-DNA abzubauen [Pingoud und Jeltsch, 2001]. In Abbildung 3-4 (A); Bahn 2-4 sind die PCR-Ansätze in einem Agarosegel dargestellt. Die korrekte Amplifikatgröße mit 4085 Bp ist bei allen drei Mutagenesen zu erkennen. Als Kontrolle der PCR wurde pET20b-MicNuc (R)-6xHis mit T7-Primern amplifiziert, was einem Produkt von 670 Bp entspricht (Abbildung 3-4 (A); Bahn 5). Es folgte eine Aufreinigung der PCR-Ansätze (Kapitel 2.11) und eine Transformation in DH5α (Kapitel 2.12.3). In Abbildung 3-4 (B); Bahn 2-7 sind die Plasmidpräparationen der Cystein-Varianten auf ein Agarosegel aufgetragen. Sie zeigten

analog zu pET20b-MicNuc (R)-6xHis (Abbildung 3-2), dass gleiche Bandenmuster. Nach der Plasmidisolierung (Kapitel 2.14) und Sequenzierung (Kapitel 2.17) wurden Kryokulturen angelegt (Kapitel 2.19.5). Anschließend erfolgte die Transformation von Plasmid pET20b-MicNuc (R)-6xHis und der drei Cystein-Varianten in BL21Gold (DE3) (Kapitel 2.12.3). Diese vier Stämme dienten als Produktions- bzw. Expressionsstämme. Plasmidpräparationen aus diesen BL21Gold (DE3)-Stämmen wiesen einen starken Nukleinsäureabbau auf, was für bereits aktive Nuklease sprach. In Abbildung 3-4 (B); Bahn 8 ist dieser Plasmidverdau beispielhaft an BL21Gold (DE3)/pET20b-MicNuc (R)-6xHis dargestellt. Aufgrund der vorhandenen Gene für eine T7-RNA-Polymerase kommt es ohne Induktion bereits zu einer Basalexpression der rMicNuc. BL21Gold (DE3)-Kryokulturen wurden analog der DH5 $\alpha$ -Kryokulturen angelegt.

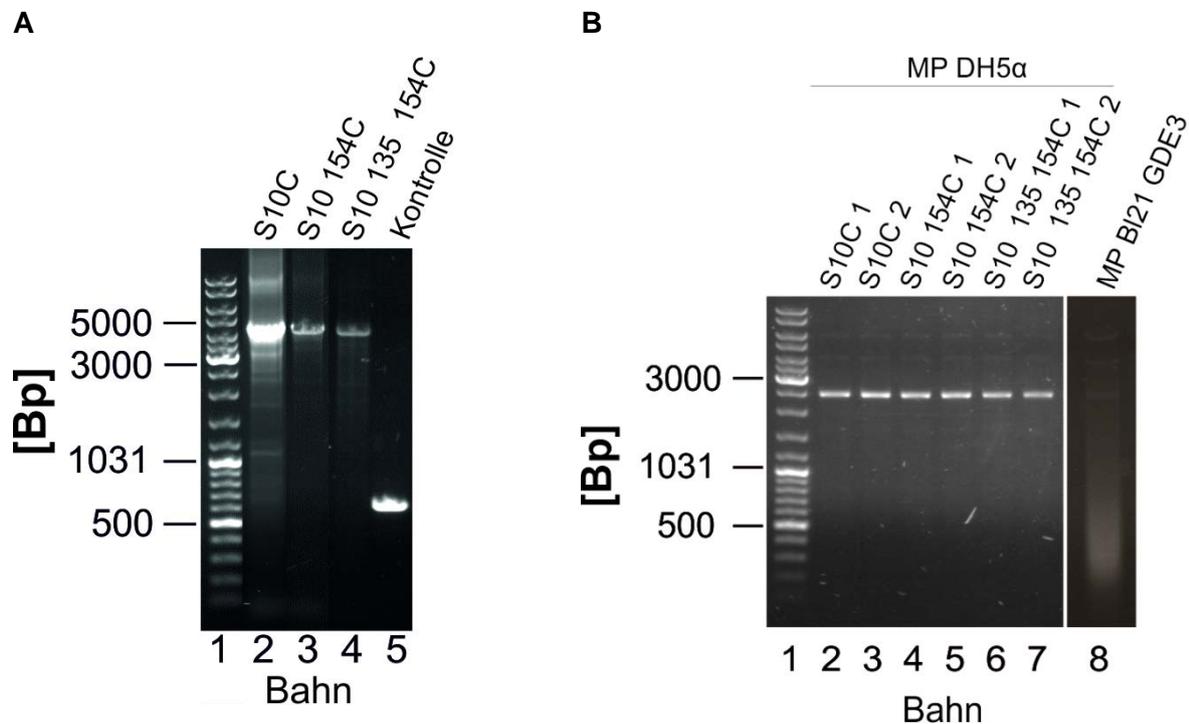


Abbildung 3-4 (A): Agarosegel ortsgerechter Mutagenese-PCR der rMicNuc-Cystein-Varianten. Bahn 1: GeneRuler DNA Ladder Mix [5  $\mu$ L]; Bahn 2: Amplifikat pET20b-MicNuc Einfach S10C (4085 Bp) [2  $\mu$ L], Bahn 3: Amplifikat pET20b-MicNuc Zweifach S10 154C (4085 Bp) [2  $\mu$ L], Bahn 4: Amplifikat pET20b-MicNuc Dreifach S10 135 154C (4085 Bp) [2  $\mu$ L], Bahn 5: Kontroll-Amplifikat pET20b-MicNuc (R)-6xHis durch T7-Primer (670 Bp) [2  $\mu$ L]. (B): Agarosegel isolierter Plasmide (MP) von pET20b-MicNuc Cystein-Varianten aus DH5 $\alpha$ -Klonen. Bahn 1: GeneRuler DNA Ladder Mix [5  $\mu$ L]; Bahn 2/3: rMicNuc Cys-Einfach-Variante, Klon 1+2 [je 10  $\mu$ L]; Bahn 4/5: rMicNuc Cys-Zweifach-Variante, Klon 1+2 [je 10  $\mu$ L]; Bahn 6/7: rMicNuc Cys-Dreifach-Variante, Klon 1+2 [je 10  $\mu$ L]; Bahn 8: isoliertes Plasmid pET20b-MicNuc (R)-6xHis aus BL21Gold (DE3).

### 3.1.1.3 Proteinproduktion und Reinigung

Anders als in den MicNuc-Expression in *E. coli* von Jing *et al.* und Yuanhe *et al.* [Jing *et al.*, 1992; Yuanhe *et al.*, 1997], wurde in der vorliegenden Arbeit nicht über eine Temperaturänderung mittels dem Bakteriophagen Lambda P<sub>R</sub>P<sub>L</sub>-Promoter, sondern über die Zugabe von IPTG induziert [Ye *et al.*, 2000]. Es wurde eine Kultivierungstemperatur von 41 °C gewählt, um die Produktion von *inclusion bodies* zu begünstigen und die mit rMicNuc verbundene Toxizität für *E. coli* zu minimieren [Shortle, 1986].

Die Kryokultur BL21Gold (DE3) mit dem Plasmid pET20b-MicNuc (R)-6xHis wurde erneut auf LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten ausgestrichen (analog Kapitel 2.12.3) und eine Einzelkolonie im Schüttelkolben kultiviert, mit IPTG induziert und bei 41 °C nach 4 h Inkubation geerntet sowie der BFM-Anteil bestimmt (Kapitel 2.19.2.2). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 1/OD-Proben angelegt (Kapitel 2.19.4). Als Kultivierungsmedium wurde modifiziertes Komplexmedium, GB<sub>Amp</sub>-Medium (Tabelle 2-4) verwendet [Gerber *et al.*, 2008]. Es konnte bereits anhand von Vorversuchen gezeigt werden, dass die Wachstumsrate, die maximale optische Dichte und die produzierte Proteinmenge beim Wechsel von LB- auf GB-Medium gesteigert werden kann [Beyerodt, 2013; Wolfram, 2011]. In Abbildung 3-6; Bahn 2 und 3 sind 1/OD-Pellets vor und nach Induktion mit IPTG gezeigt. Deutlich zu erkennen, die Proteinbande der rMicNuc nach 4 h Induktion bei etwa 20 kDa. Auch eine Basalexpression der rMicNuc vor Induktion (Bahn 2) konnte detektiert werden und deckte sich mit den Beobachtungen aus den Plasmidpräparationen aus BL21Gold (DE3). Aus einer 500 mL Kultur ließen sich im Schüttelkolben-Maßstab 3-4 g BFM gewinnen.

Für die Aufreinigung der produzierten rMicNuc wurde eine dreistufige IMAC-Reinigung (Kapitel 2.24.1.2), in Anlehnung an Lemercier *et al.*, durchgeführt [Lemercier *et al.*, 2003]. Das mit Harnstoff denaturierte Zielprotein wurde über den His-tag an die Ni-Sepharose-Matrix immobilisiert, durch Absenken der Harnstoffkonzentration rückgefaltet und mit steigender Imidazolkonzentration (bis 500 mM) eluiert. Dies vereinfacht die Präparation, da ein separater Rückfaltungsschritt entfällt.

Dazu wurde die *E. coli*-BFM von BL21Gold (DE3)/pET20b-MicNuc (R)-6xHis zunächst mittels HDH aufgeschlossen und der gewonnene Rohenzymextrakt zentrifugiert (Kapitel 2.21). Aufgrund des enthaltenen Harnstoffs (6 M) im IMAC-MN-Bindingpuffer wird das exprimierte Zielprotein entfalten und die Löslichkeit vergrößert. Im Anschluss wurde der Überstand über einen 50 mL Superloop™ auf eine Ni-Sepharose-Säule (CV= 9 mL) aufgetragen. In Abbildung 3-5 ist der Verlauf der IMAC dargestellt. Das Chromatogramm zeigt den Probenauftrag, die Waschfraktion, die Rückfaltung und die Elution. Die Proteinkonzentration der Probe lag im maximalen UV-Detektionsbereich von 5000 mAU. In den Elutionsfraktionen A6-A10 konnte ein Elutionspeak und eine Nukleaseaktivität

nachgewiesen werden. rMicNuc-Aktivitäten von bis zu 2500 U/mL wurden bestimmt (Kapitel 2.20.3). Im dazugehörigen SDS-PAGE Gel sind in ausgewählten Elutionsfraktionen rMicNuc-Proteinbanden nachweisbar (Abbildung 3-6; Bahn 7-9). Des Weiteren sind noch einige proteinogene Verunreinigungen sichtbar, welche durch eine Gelüberladung sehr gut zu erkennen sind. Nach Auswertung mittels dem *Gene Genius Bio Imaging System* und der Software *Gene Tool* betrug die Reinheit der Elutionsfraktionen am Beispiel A6 95 %. Da der Durchlauf ebenfalls Zielprotein zeigte, war die Bindekapazität der Säule erreicht (Abbildung 3-6; Bahn 5). Die Elutionsfraktionen A6-A11 wurden gepoolt und 1:2 mit 99 % Glycerin versetzt. Die Lagerung war bei -20 °C für mindestens sechs Monate ohne Aktivitätsverlust möglich. Aus einer 1 L Bakterienkultur wurden ca. 250 mg rMicNuc aufgereinigt. Die spezifische Aktivität konnte auf  $456 \pm 38$  U/mg bestimmt werden (Kapitel 2.20.3.1).

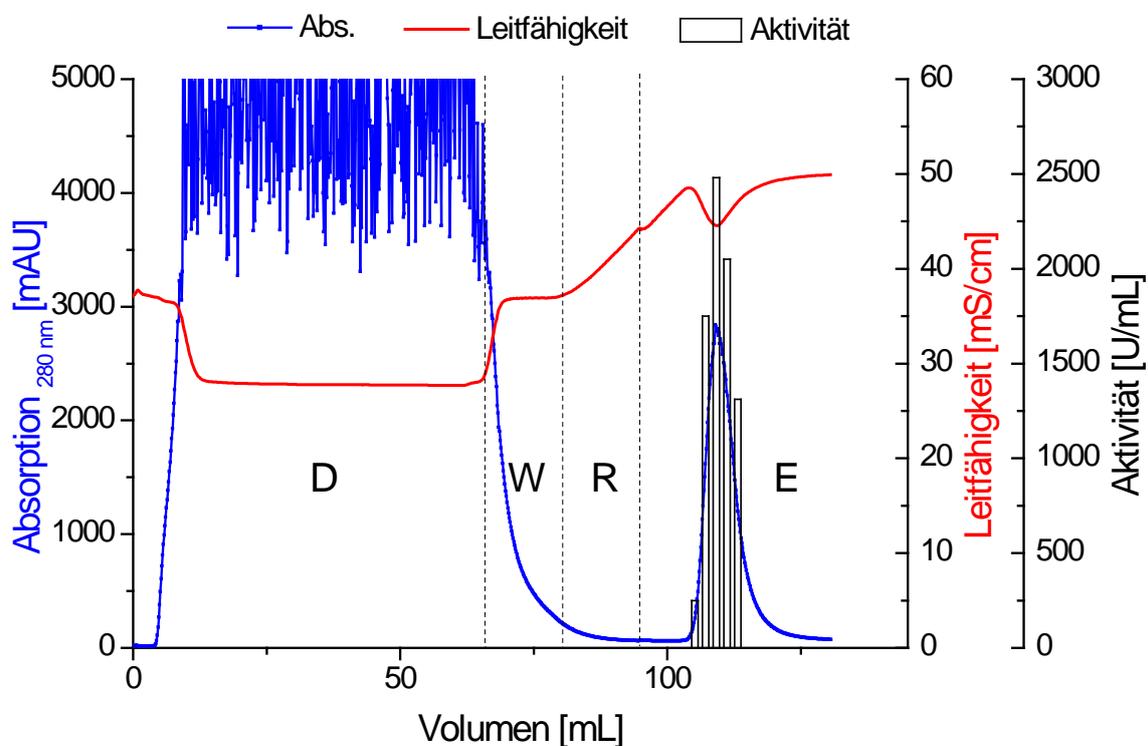


Abbildung 3-5: Chromatogramm zur Reinigung der rMicNuc mittels IMAC. 50 mL Überstand aus Aufschluss *E. coli* BL21Gold (DE3)/pET20b-MicNuc (R)-6xHis wurden über *Superloop*<sup>TM</sup> auf eine Ni-Sepharose-Säule (CV= 9 mL) geladen. Waschschrift mit 3 CV IMAC-MN-Bindingpuffer; Rückfaltung über 3 CV IMAC-MN-Rückfaltungspuffer mit 100 %; Elution mit 100 % IMAC-MN-Elutionspuffer, Delay 5 CV; 2 mL Fraktionen; Säulen zeigen die Nukleaseaktivität der Fraktionen A6-A10 (v.l.n.r.). Probenauftrag/Durchlauf: D; Waschfraktion: W; Rückfaltung: R; Elution: E.

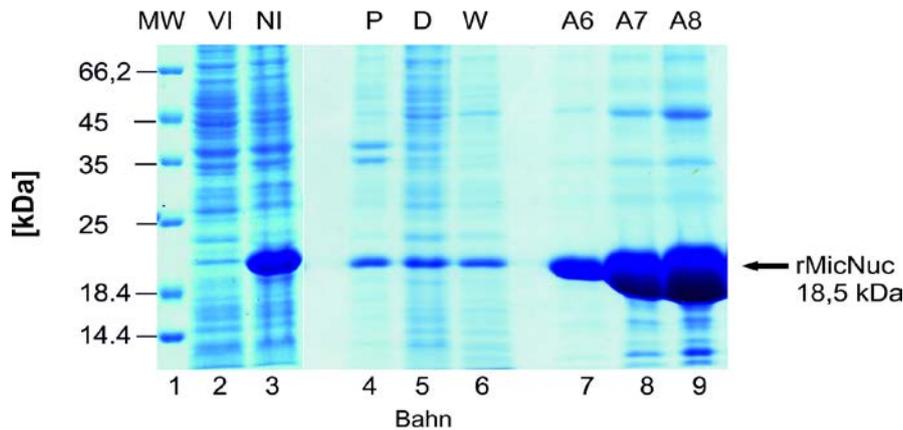


Abbildung 3-6: SDS-PAGE Gel (Coomassie-Färbung) aus ausgewählten Proben der Schüttelkolbenexpression und IMAC-Reinigung von *E. coli* BL21Gold (DE3)/ pET20b-MicNuc (R)-6xHis. Bahn 1: MW-Marker [5  $\mu$ L]; Bahn 2: 1/OD-Probe vor Induktion (VI) [10  $\mu$ L]; Bahn 3: 1/OD-Probe nach 4 h Induktion (NI) [10  $\mu$ L]; Bahn 4: Pellet-Probe nach HDH und Zentrifugation [10  $\mu$ L]; Bahn 5: Durchlauf aus IMAC [10  $\mu$ L]; Bahn 6: Waschfraktion [10  $\mu$ L]; Bahn 7-9: Elutionsfraktionen A6-A8 [je 10  $\mu$ L]; das theoretische Molekulargewicht der rMicNuc beträgt 18,5 kDa (MicNuc (R)-6xHis).

Analog der Schüttelkolbenexpression von BL21Gold (DE3)/pET20b-MicNuc (R)-6xHis (Kapitel 2.19.2.2) wurden auch die Cystein-Varianten der rMicNuc kultiviert, aufgeschlossen und mittels IMAC aufgereingt. Allgemein wurde weniger Zielprotein bei den Cystein-Varianten im Vergleich zur rMicNuc (ohne Cysteine) produziert. Nach IMAC-Reinigung konnten etwa 200 mg/L Bakterienkultur für die Cys-Einfach-Variante, 50 mg/L für die Cys-Zweifach-Variante und 100 mg/L für die Cys-Dreifach-Variante gewonnen werden. Hauptgrund für die geringe Ausbeute ist ein langsames Zellwachstum während der Kultivierung und Verluste durch Präzipitation bei der Dialyse nach der IMAC-Reinigung. Diese traten bei der rMicNuc ohne Cysteine nicht auf (Proteinausbeute= 250 mg/L).

Die Einführung von Cysteinen in Proteine kann einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität und Proteinstruktur haben [Mansfeld *et al.*, 1999]. Aufgrund der Eigenschaft von Cysteingruppen miteinander Disulfidbrücken zu bilden und der AS-Positionen der eingeführten Cystein-Reste im Fall rMicNuc (Abbildung 3-3), war es notwendig die Aktivität und Proteinstruktur der Cystein-Varianten näher zu untersuchen. Es wurde ein vergleichender Ansatz unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen gewählt (Kapitel 2.20.3.2). Die spezifischen Aktivitäten aller rMicNuc-Cystein-Varianten, einschließlich rMicNuc wurden bestimmt und das Verhalten in der SDS-PAGE untersucht. In Abbildung 3-7 (A)) sind die spezifischen Aktivitäten der rMicNuc-Varianten unter reduzierten und nicht reduzierten Bedingungen dargestellt.

Im Fall der spezifischen Aktivität von rMicNuc konnte nach Reduktion mit DTT eine leichte Steigerung detektiert werden, welche jedoch innerhalb der Standardabweichung lag. Bei den nicht reduzierten Cystein-Varianten wurden maximal 50 % der spezifischen Aktivität der

rMicNuc erreicht. Dies ist durch Di- und Multimerbildung durch Disulfidbrücken zu erklären, welche in Abbildung 3-7 (B) linkes Gel (nicht reduziert) gut zu erkennen sind. Bei Reduktion der Cys-Dreifach-Variante ist die spezifische Aktivität der nicht reduzierten rMicNuc wieder erreicht, während bei der Cys-Einfach- und Cys-Zweifach-Variante nur knapp 80 % der rMicNuc-Aktivität zurückgewonnen werden konnte. Die maximalen spezifischen Aktivitäten nach DTT-Reduktion betragen: rMicNuc= 502 U/mg, Cys-Einfach-Variante= 360 U/mg, Cys-Zweifach-Variante= 350 U/mg und die Cys-Dreifach-Variante= 469 U/mg.

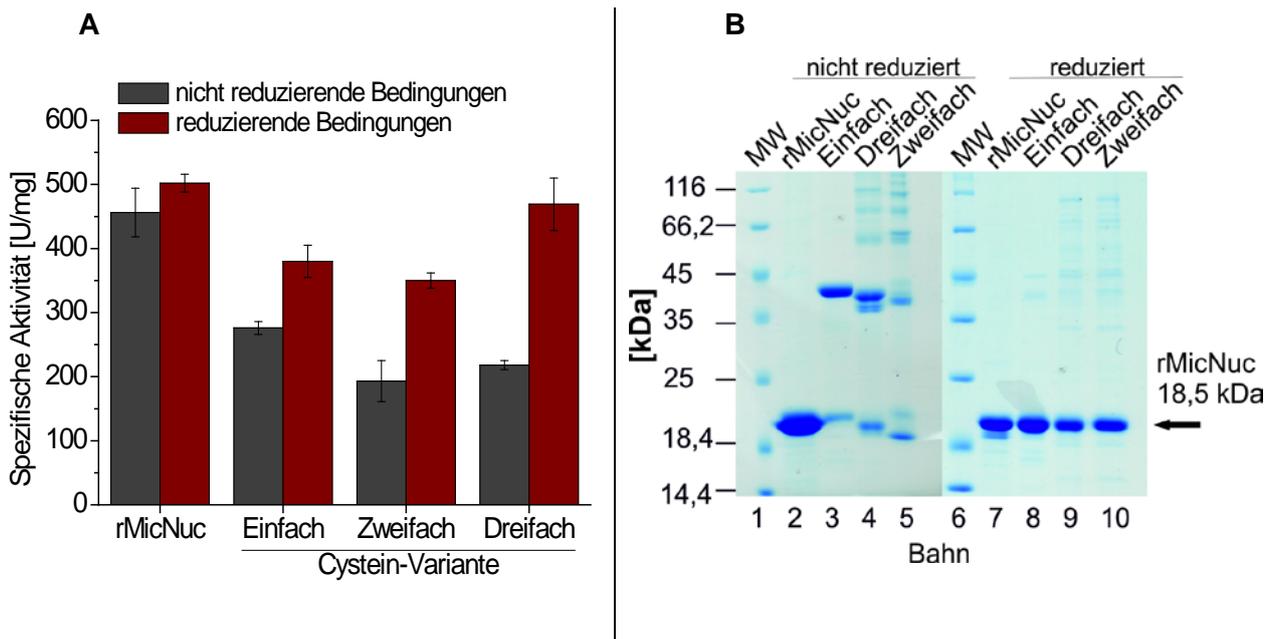


Abbildung 3-7 **(A)**: Spezifische Aktivitäten von rMicNuc und drei Cystein-Varianten unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen (n=3). Als Gegenüberstellung sind alle Enzympräparate vor Aktivitätsmessung ohne Reduktion oder mit 10 mM DTT für 30 min bei RT reduziert gezeigt. **(B)**: SDS-PAGE Gele (Coomassie-Färbung); Bahn 1+6: MW-Marker [5  $\mu$ L]; Linkes Gel (ohne 2-Mercaptoethanol), Bahn 1-5: Enzymproben [10  $\mu$ L]; Rechtes Gel (mit 2-Mercaptoethanol), Bahn 6-10: Enzymproben reduziert [10  $\mu$ L], alle Enzymlösungen wurden auf 0,33 mg/mL eingestellt.

### 3.1.2 Proteinase K aus *Tritirachium album*

#### 3.1.2.1 Gendesign und Synthese

Auf Basis der bekannten Nukleotidsequenz der Pro-Proteinase K aus *Tritirachium album* (EC 3.4.21.64) [Gunkel und Gassen, 1989] wurde eine Optimierung der *codon usage* durchgeführt, um eine optimale Expression des codierten Gens in *Pichia pastoris* X33 zu gewährleisten. Dabei wurde auch das Intron von 63 Bp innerhalb der Prosequenz entfernt, um die autokatalytisch Spaltung zu gewährleisten. Die Optimierungen wurden mit dem Programm Gene Designer Version 1.1.4.1 durchgeführt (Copyright © 2005 - 2007 DNA 2.0 Inc.). Die *Codon usage*-Tabelle von *Pichia pastoris* wurde über die Kazusa *database* [KDRI, 2007] bezogen und der Schwellenwert auf 10 % festgesetzt. Im Folgenden wird die rekombinant produzierte Proteinase K mit rPK abgekürzt. Die Prosequenz der Wildtyp-PK

wurde beibehalten, da sie für die korrekte Faltung und die aktive Form essentiell ist [Ikemura *et al.*, 1987]. Die nach Anpassung resultierende Nukleotidsequenz wurde mit flankierenden Restriktionsschnittstellen versehen und zur Gensynthese an die Firma Eurofins MWG Operon übergeben. Die Ligation des Genkonstrukts in den *Pichia pastoris*-Expressionsvektor pGAPZαA erfolgte bei Eurofins MWG Operon über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XbaI. pGAPZαA besitzt einen GAP-Promoter, der in Anwesenheit von Glucose im Medium, für die konstitutive Expression von normalerweise Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase sorgt. Unter Kontrolle dieses Promoters wurden bereits rekombinante Proteine in X33 exprimiert [Macauley-Patrick *et al.*, 2005]. Die rekombinante Exo-levanase (LsdB) war ein gutes Beispiel dafür, dass in einigen Fällen via GAP-Promoter eine höhere Proteinausbeute gegenüber AOX-Promoter generiert werden kann. So konnte mit dem kontinuierlichen GAP-Promoter LsdB mit 26,6 U/mL (BFM 1,5 g/L/h) gegenüber dem induzierbaren AOX1-Promoter mit 21,1 U/mL (BFM 1,2 g/L/h) produziert werden [Menendez *et al.*, 2004]. In eigenen Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass innerhalb von Schüttelkolbenexpressionen nur eine relativ geringe rPK-Produktausbeute erzielt werden konnte [Daten nicht gezeigt].

Aufgrund dessen erfolgte eine Umklonierung des Zielgens in den Vektor pPICZαA, welcher über zwei induzierbare AOX-Promotoren verfügt (AOX1 und AOX2), sowie eine homologe Rekombination in *Pichia pastoris* X33. Neben dem AOX-Promotersystem enthält der Vektor genetische Informationen für ein α-Faktor-Sekretionssignal, wodurch das Translationsprodukt ins Medium sekretiert werden kann [Damasceno *et al.*, 2012; Macauley-Patrick *et al.*, 2005]. *Pichia pastoris* ist eine methylophile Hefeart, die in der Lage ist Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten [Cereghino und Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005]. Dabei wird in Anwesenheit von Methanol die Transkription des AOX1-Gens induziert, welches für das erste Enzym im Methanol-Metabolismus kodiert, die Alkoholoxidase 1. AOX1 steht unter der Kontrolle des starken AOX1-Promoters [Cereghino und Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005]. Zusätzlich besitzt pPICZαA einen bakteriellen Replikationsursprung zur Vermehrung in *Escherichia coli* und verfügt über eine genetische Information, die für einen 6xHis-tag codiert, welcher zur Reinigung und gerichteten Immobilisierung genutzt werden kann. Im Anhang 8.1.2 ist die Translationskarte der zu exprimierenden Prä-Pro-PK Sequenz dargestellt.

### 3.1.2.2 Klonierung der Pro-PK-Sequenz und deren Qualitätskontrolle

Der von Eurofins MWG Operon erhaltene Vektor pGAPZαA-Pro-PK und von der Firma Probiobdrug AG erhaltene Vektor pPICZαA wurden zunächst mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI verdaut (Kapitel 2.7) und die einzelnen DNA-Fragmente mithilfe einer horizontalen Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach getrennt (Kapitel 2.8). Der

linearisierte pPICZαA Vektor bei 3536 Bp und das Pro-PK-Gensegment bei 1106 Bp wurden aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt (Kapitel 2.9). Mithilfe einer T4 DNA-Ligase [Lehman, 1974; Rossi *et al.*, 1997] wurden die zu verknüpfenden DNA-Fragmente zwischen den 5'-Phosphat- und den 3'-Hydroxylgruppen mittels Ligation verbunden (Kapitel 2.10) und über Entsalzungssäulen gereinigt (Kapitel 2.11). In Abbildung 3-8 ist die Vektorkarte des fertigen Plasmids pPICZαA-Pro-PK gezeigt.

Durch Elektroporation wurde pPICZαA-Pro-PK in elektrokompente *E. coli* DH5α-Zellen transformiert und ausplattiert (Kapitel 2.12). Um nach der Ligation und der folgenden Transformation zu prüfen, ob die auf den Agarplatten gewachsenen Klone ein Insert mit der korrekten Länge tragen, wurden mit 14 Klonen je eine Kolonie-PCR durchgeführt (Kapitel 2.15.1). Hierzu wurden die Primer PPICZα-Ins-for und PGAPZα-Ins-rev verwendet (Amplifikatgröße 1638 Bp). Im Anschluss erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung und Auswertung des Kolonie-PCR-Erfolgs (Kapitel 2.8). In Abbildung 3-9 (A) ist das Agarosegel der 14 Kolonie-PCRs für DH5α/pPICZαA-Pro-PK dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nicht in allen 14 PCRs ein Zielamplifikat bei 1638 Bp zu detektieren war. Nur sieben der 14 Klone besaßen eine positive Bande. Die Negativkontrolle pGAZα zeigte unerwarteterweise trotz unspezifischem Primer PPICZα-Ins-for zwei schwache Banden (Abbildung 3-9 (A oben) Bahn 8). DH5α-Zellen des Klons 9 (Abbildung 3-9 (A unten) Bahn 5) wurden zur Amplifikation des Plasmids pPICZαA-Pro-PK kultiviert und isoliert (Kapitel 2.14). Anschließend erfolgte eine Sequenzierung bei Eurofins MWG Operon (Kapitel 2.17). Die Sequenzanalyse ergab 100 % Übereinstimmung für den Einbau des Pro-PK-Gens in den Vektor pPICZαA.

Im nächsten Schritt wurde das Pro-PK-Gen-tragende Plasmid in *Pichia pastoris* Wildtypzellen (X33) über homologe Rekombination inseriert [Cereghino und Cregg, 2000; Daly und Hearn, 2005; Higgins, 2001]. Dazu wurden kompetente X33-Zellen erzeugt (Kapitel 2.13.1), eine ausreichende Menge Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5α/pPICZαA-Pro-PK Klon 9 linearisiert (Kapitel 2.13.2) und über Elektroporation in *Pichia pastoris* transformiert (Kapitel 2.13.3). Für den Nachweis des PK-Geneinbaus wurden X33/pPICZαA-Pro-PK-Klone mittels Kolonie-PCR und Agarose-Gelelektrophorese hinsichtlich des Vorhandenseins des PK-Gens im X33-Genom untersucht. 57 Klone der insgesamt 220 einzeln auf LSLB-Zeocin™-Agarplatten gewachsenen Transformanten wurden in einer Kolonie-PCR untersucht (Kapitel 2.15.1). In Abbildung 3-9 (B) sind beispielhaft 13 Transformanten-PCRs, sowie zwei Negativkontrollen und eine Positivkontrolle gezeigt. Nur ein Teil der Klone zeigten im Gel das korrekte Amplifikat der Prä-Pro-PK-Sequenz bei 1638 Bp. Eine weiter auftretende DNA-Bande oberhalb der 1638 Bp scheint ein Artefakt aus X-33 zu sein, da diese Bande auch in der Negativkontrolle erkennbar war (Abbildung 3-9; (B unten) Bahn 6). Da simultan alle 220 gewachsenen Transformanten in DW-MTPs kultiviert (Kapitel 2.19.1) und deren rPK-Aktivität

bestimmt wurde (Kapitel 2.20.2.2), konnte bei X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK Klon 7 (Abbildung 3-9; (B oben) Bahn 8) die höchste Proteaseaktivität nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde eine Sequenzierung des X33-Klon 7 (Überstand vom Template für Kolonie-PCR) durchgeführt (Kapitel 2.17). Die notwendigen Primer pPICZ $\alpha$ -Ins-for und pGAPZ $\alpha$ -Ins-rev (Tabelle 2-5) lagen der Firma Eurofins MWG Operon bereits vor. Die Sequenzanalyse zeigte zu 100 % den korrekten Prä-Pro-PK-Einbau ins Genom von *Pichia pastoris* X33, inklusive der AS-Sequenz für c-Myc-tag und 6xHis-tag.

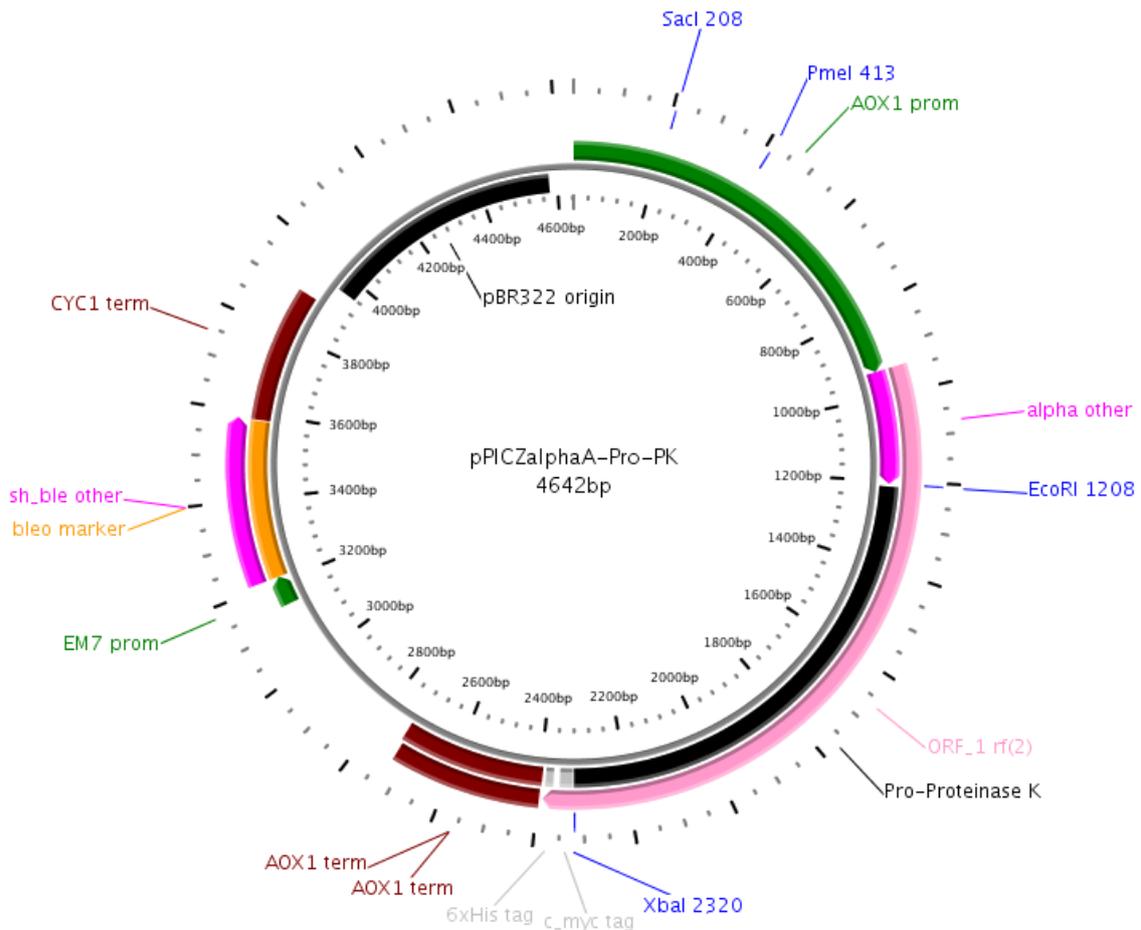


Abbildung 3-8: Vektorkarte von pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK (4642 Bp). Einmal-Schnittstellen (SacI 208, PmeI 413, EcoRI 1208 und XbaI 2320), AOX1-Promoter (AOX1 prom),  $\alpha$ -Faktor-Sekretionssignal (alpha other), Prä-Pro-Proteinase K-Gen (1449 Bp; ORF\_1 rf(2)), AOX1-Transkriptionstende (AOX1 term), EM 7-Promoter (EM 7 prom), Zeocin<sup>TM</sup>-Resistenzgen (sh\_ble other), CYC1-Transkriptionstende (CYC1 term) und pUC-Replikationsursprung (pBR322 origin). Diese Plasmidkarte wurde mittels PlasMapper 2.0 generiert [Dong *et al.*, 2004].

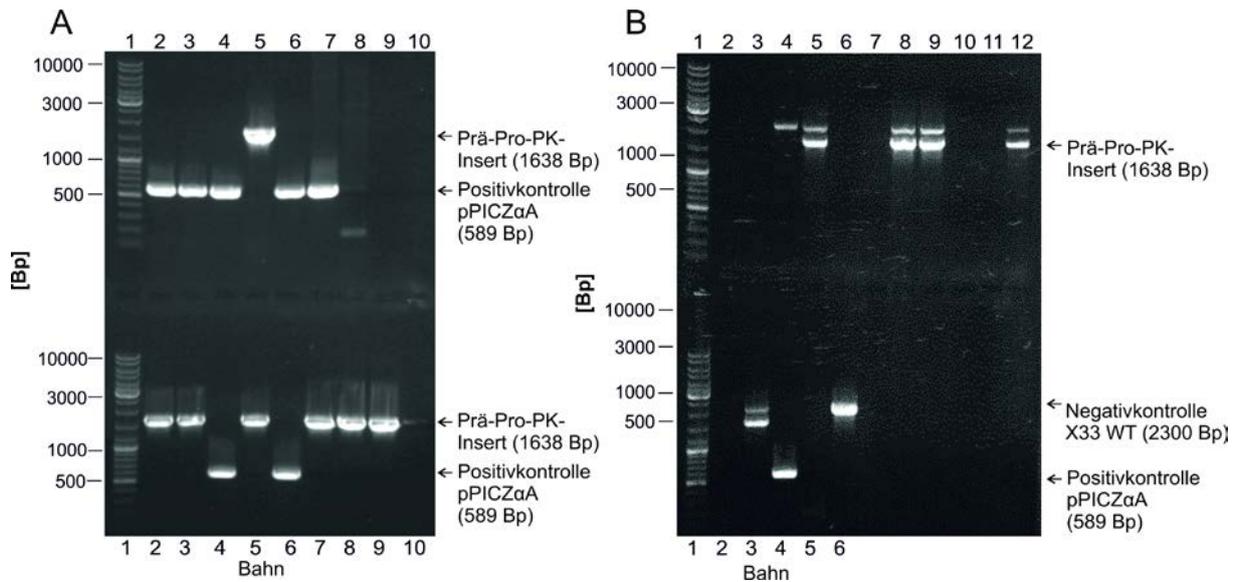


Abbildung 3-9: Übersicht ausgewählter Agarose-Gelelektrophoreseauswertungen (Doppelkamm-Gel). Bahn 1 jeweils in (A) und (B): GeneRuler DNA Ladder Mix [5  $\mu$ L]; **(A)**: Kolonie-PCR aus DH5 $\alpha$ /pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK-Transformanten; (A oben): Bahn 2-6: Klon 1 bis 5 [10  $\mu$ L], Bahn 7: Positivkontrolle pPICZ $\alpha$ A, Bahn 8: Negativkontrolle pGAPZ $\alpha$ A, (A unten): Bahn 2-10: Klon 6-14 [10  $\mu$ L], **(B)**: Kolonie-PCR aus X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK-Transformanten, (B oben): Bahn 2-12: Klon 1-11 [10  $\mu$ L], (B unten): Bahn 2-3: Klon 12 und 13 [10  $\mu$ L], Bahn 4: Positivkontrolle Vektor pPICZ $\alpha$ A [10  $\mu$ L], Bahn 5: Negativkontrolle Vektor pGAPZ $\alpha$ A [10  $\mu$ L], Bahn 6: Negativkontrolle X33 WT [10  $\mu$ L]. Korrekte Amplifikatgröße Prä-Pro-PK-Insert bei 1638 Bp. Positivkontrolle pPICZ $\alpha$ A bei 589 Bp. Negativkontrolle X33 WT bei ca. 2300 Bp.

### 3.1.2.3 Proteinproduktion und Scale-up

Wie bereits erwähnt, wurden 220 X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK-Klone in 96-DW-MTP-Maßstab exprimiert (Kapitel 2.19.1) und auf das Vorhandensein sekretierter, aktiver rPK im Medium untersucht (Kapitel 2.20.2.2). Zur Induktion der rPK-Expression wurde 5 % Methanol verwendet. Als Substrat für die Aktivitätsmessung wurde Suc-AAPF-pNA eingesetzt [Müller *et al.*, 2002]. Bei der Spaltung der Peptidbindung durch aktive rPK entsteht freies para-Nitroanilin (pNA), welches bei 405 nm photometrisch detektiert werden kann. Zur Bestimmung der Aktivität (Kapitel 2.20.2.2) wurde der Extinktionskoeffizient von pNA unter Reaktionsbedingungen bestimmt (Kapitel 2.20.2.1). Für den Reaktionspuffer konnte ein  $\epsilon_{405}$  von  $10,4 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  ermittelt werden.

Die höchste sekretierte proteolytische Aktivität innerhalb der DW-MTP-Versuche wurde für den X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK-Klon 7 der MTP1 mit 4,8 U/mL gemessen (Abbildung 3-10).

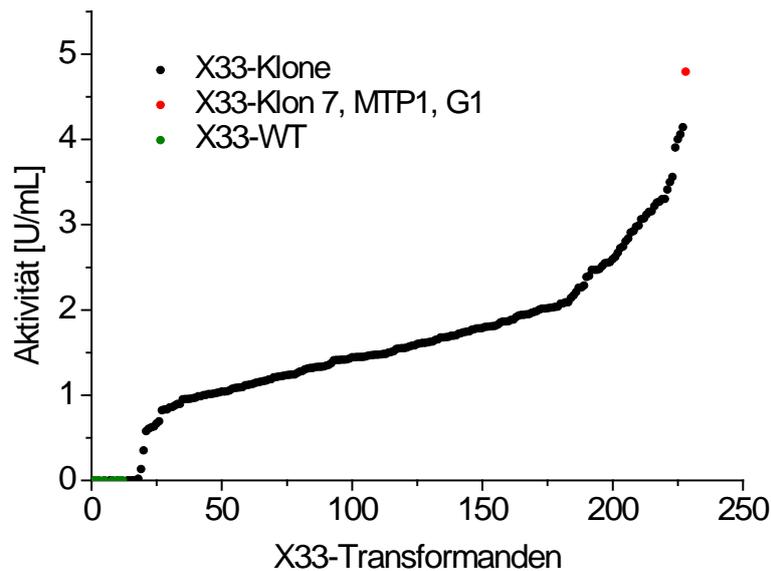


Abbildung 3-10: Volumenaktivitäten der rPK in Kultivierungsmedium der 220 X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK-Klone (drei DW-MTPs) aus dem Proteinexpressionsversuch im DW-MTP-Maßstab (Kapitel 2.19.1) in aufsteigender Reihenfolge. Als Referenzen wurden acht X33-WT-Klone in Betracht gezogen. Kultivierungsbedingungen: BMGY/BMMY; 30°C über fünf Tage. Aktivitätsbestimmung an Tag fünf (Kapitel 2.20.2.2.).

Für eine Maßstabsvergrößerung wurde X33-Klon 7 im fünffachen Schüttelkolben-Maßstab kultiviert und rPK produziert (Kapitel 2.19.2). Dadurch konnte die volumetrische Aktivität auf maximal 7 U/mL gesteigert werden (Abbildung 3-11). Die Methanolinduktion wurde durch den Medienwechsel von BMGY auf BMMY realisiert (Tabelle 2-4). Der Überstand und das Pellet aus der Kultivierung von X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK-Klon 7 sowie aus X33-WT-Kultivierung wurden im SDS-PAGE Gel untersucht. Die Abbildung 3-12 zeigt den Vergleich zwischen X33-Klon 7 und X33-WT, außerdem wird der pure Überstand mit aufkonzentriertem Überstand verglichen. Ein proteolytischer Proteinabbau bei Vergleich der Pelletfraktion X33-Klon 7 und X33-WT deutete bereits auf aktive rPK hin (Abbildung 3-12, Bahn 2 und Bahn 5). Aufgrund der geringen Proteinkonzentration zeigte der Überstand der Kultivierung von X33-Klon 7 (Bahn 3) keine Proteinbande von aktiver rPK (31,5 kDa). Auch der X33-WT zeigte wie erwartet keine rPK-Proteinbande im Überstand. Erst bei einer 80 %igen (w/v) Ammoniumsulfatfällung (Kapitel 2.20.1) konnte die rPK-Proteinbande bei X33-Klon 7 mit 31,5 kDa im Überstand detektiert werden (Abbildung 3-12, Bahn 4). Zudem waren nach der Fällung nur geringe proteinogene Verunreinigungen zu erkennen.

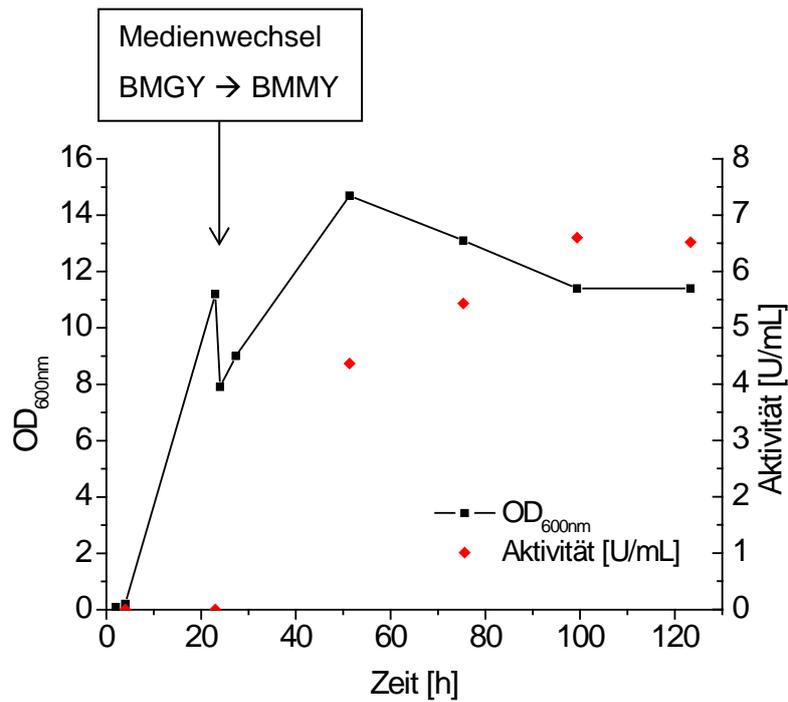


Abbildung 3-11: Wachstumskurve von X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK Klon 7 in BMGY- und BMMY im Schüttelkolben-Maßstab bei 30°C (Kapitel 2.19.1) und der Verlauf der volumetrischen rPK-Aktivität über fünf Tage.

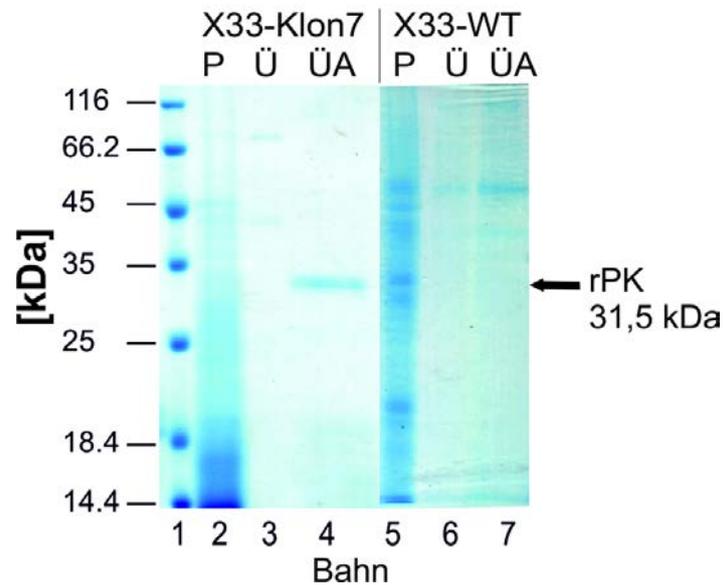


Abbildung 3-12: SDS-PAGE Gel (Coomassiefärbung) von Überständen und Pellet der Schüttelkolbenexpression von X33-Varianten. X33-Klon 7: X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK Klon 7; P: Pellet (Tag 4) aus 500  $\mu$ L in 50 mM Tris/HCl, pH 8, 0,75 mM PMSF gelöst und 1:1,5 (v/v) in Probenpuffer verdünnt [10  $\mu$ L]; Ü: Überstand mit 1 mM PMSF 1:1,5 (v/v) mit Probenpuffer verdünnt [10  $\mu$ L]; ÜA: Überstand 80 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt, in 1/10 (v/v) Ausgangsvolumen in 50 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM PMSF, resuspendiert und 1:1,5 (v/v) mit Probenpuffer versetzt [10  $\mu$ L]. Bahn 4 zeigt die rPK-Proteinbande (rekombinante PK) bei 31,5 kDa.

Um die Bereitstellung ausreichender Mengen an rPK zu gewährleisten und die Möglichkeit für eine großtechnische Produktion aufzuzeigen, wurde eine 20 L-Hochzelllichtfermentation durchgeführt (Kapitel 2.19.3). Dazu wurde eine Vorkultur in BMGY mit einer Einzelkolonie X33/pPICZαA-Pro-PK Klon 7 beimpft, kultiviert, in BSM (Tabelle 2-4) überführt und nach Erreichen einer  $OD_{600}$  von 7 als Inokulum von 18 L BSM verwendet [Invitrogen, 2002]. Die dreistufige Fermentation wurde in einem Bioreaktor Biostat C durchgeführt. Gestartet wurde mit einem Glycerin-*batch*, welcher in den Glycerin-*fed-batch* überging und dem die Methanol-*fed-batch*-Phase folgte [Cereghino und Cregg, 2000; Higgins *et al.*, 1998b]. In Abbildung 3-13 ist das Verlaufdiagramm der Fermentation für die einzelnen Parameter dargestellt.

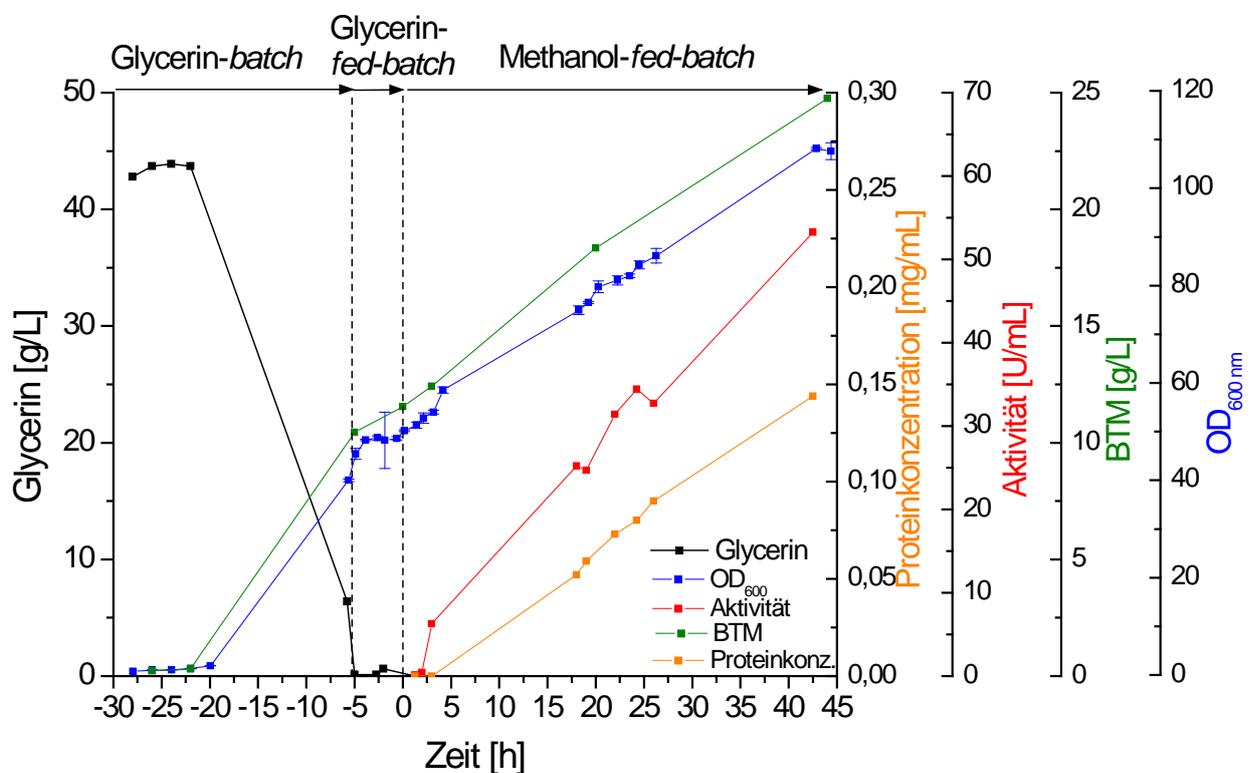


Abbildung 3-13: Verlaufdiagramm der Fermentation von X33/pPICZαA-Pro-PK-Klon 7 für die Proteinkonzentration, Zeldichte ( $OD_{600}$ ,  $n=3$ ), Glycerinkonzentration, BTM und Proteaseaktivität in Abhängigkeit von der Fermentationszeit (-28 bis -4,85 h Glycerin-*batch*, -4,85 bis 0 h Glycerin-*fed-batch*, 0 bis 44 h Methanol-*fed-batch*). Die Gesamtfermentationszeit betrug 72 h.

Am Ende der Fermentation von *Pichia pastoris* X33/pPICZαA-Pro-PK-Klon 7 wurde eine Zeldichte von  $OD_{600}=108$  erreicht, was einer Biotrockenmasse von 25 g/L entspricht. Das Biotrockenmasse/  $OD_{600}$ -Verhältnis betrug 0,23. Die rPK-Aktivität lag nach einer Fermentationszeit von 70,5 h bei ca. 53 U/mL und die Proteinkonzentration im Medium bei

140 mg/L. Die Methanolzufuhr wurde manuell gesteuert und verlief dreistufig (Kapitel 2.19.3). Während der Fermentation zeigte sich, dass der Aktivitätsanstieg mit der Proteinkonzentration im Medium korrelierte und am Ende der Fermentation hauptsächlich das Zielprotein vorlag (Abbildung 3-15, A).

### 3.1.2.4 Reinigung der rPK

Um aus 20 Litern der Fermentationskultur sekretierte rPK zu gewinnen, wurden zunächst alle Zellen vom Medium getrennt. Dazu wurde in zwei Durchläufen mit der Schnellzentrifuge Z41G bei 17000 x g laut Benutzerhandbuch zentrifugiert. In Tabelle 3-3 ist die gemessene Aktivität, Proteinkonzentration und spezifische Aktivität in der Zeile Überstand vor Ultrafiltration (UF) dargestellt. Nach der Zentrifugation konnte eine gesteigerte volumetrische Aktivität von 88 U/mL bestimmt werden. Die volumetrische rPK-Aktivität nach Fermentation und Zentrifugation im Vergleich zum Schüttelkolbenversuch war 13-mal größer (Abbildung 3-11). Die spezifische Aktivität der produzierten rPK konnte auf 587 U/mg bestimmt werden. Im Anschluss an die Zentrifugation wurde das Pellet von ca. 2,8 kg BFM verworfen und der Überstand von 18 L mithilfe einer Millipore Ultrafiltrationsanlage auf 500 mL aufkonzentriert (Kapitel 2.22). Dazu wurde eine *Kvick lab cassette* PES-Membran mit 10 kDa *cutoff* und 0,11 m<sup>2</sup> Membranfläche verwendet. Retentat 1 besaß eine volumetrische Aktivität von 1600 U/mL (Kapitel 2.20.2.3). Vor und nach der Ultrafiltration wurde zudem die spezifischen Aktivitäten bestimmt (Kapitel 2.18.2), welche nach UF bei 687 U/mg lag. Zusätzlich wurde Permeat 1 nochmals konzentriert (Retentat 2). Beide Retentate wurden in 50 mL Röhrchen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3-3: Übersicht der einzelnen Konzentrationsschritte der Ultrafiltration (UF) für den Fermentationsüberstand X33/pPICZaA-Pro-PK Klon 7. Retentat 1 und Permeat 1 stammen aus dem Fermentationsüberstand, Retentat 2 und Permeat 2 stammen aus dem Permeat 1. n/a=nicht angegeben.

Probe	Volumen [L]	Aktivität [U/mL]	Aktivität gesamt [kU]	Aktivität gesamt [%]	Proteinkonz. [mg/mL]	Proteinmenge [mg]	Spez. Aktivität [U/mg]
Überstand vor UF	18	88	1584	100	0,15	2700	587
➤ Retentat 1	0,5	1600	800	50,5	2,33	1165	687
➤ Permeat 1	17,5	24	420	26,5	0,04	700	600
➤ Retentat 2	0,5	290	145	9,2	n/a	n/a	n/a
➤ Permeat 2	17	13	221	14	n/a	n/a	n/a

Für die Aufreinigung der ultrafiltrierten Proteinlösung wurde eine IMAC gewählt [Hanefeld *et al.*, 2009; Porath *et al.*, 1975]. Die rekombinant produzierte PK (rPK) sollte via Komplexbildung zwischen dem C-terminalen His-*tag* und Ni-NTA an der Säulenmatrix gebunden werden. 100 mL Retentat 1 wurden über eine Ni-Sepharose-Säule (CV=15 mL) gepumpt. Allerdings konnte keine rPK an der Säulenmatrix gebunden werden. Die gesamte Ausgangsaktivität wurde im Durchlauf detektiert [Daten nicht gezeigt]. Aus diesem Grund wurde eine Kationenaustauschchromatographie (KIA) zur Reinigung eingesetzt (Kapitel 2.24.2). Je 100 mL von Retentat 1 wurden gegen VE-H<sub>2</sub>O dialysiert (Kapitel 2.23) und mit VE-H<sub>2</sub>O bis zu einer Leitfähigkeit von unter 5 mS/cm verdünnt. Dies diente dazu, die ionischen Wechselwirkungen des Zielproteins mit der Chromatographiematrix (SP-XL) zu verbessern. Der finale pH-Wert der Proteinlösung lag bei pH 5,6. Da sich der theoretisch kalkulierte isoelektrische Punkt der rPK zwischen pH 6,6 und pH 7,8 befand (mit bzw. ohne Peptid-*tag*) und der verdünnte Überstand einen pH-Wert von pH 5,6 aufwies, war eine KIA anwendbar. In Abbildung 3-14 ist beispielhaft das Chromatogramm einer KIA gezeigt. Dem Auftragen der Proteinlösung (D) und dem Waschschrift (W) mit KIA-Bindingpuffer folgte eine Elution (E) mittels KIA-Elutionspuffer. Im Chromatogramm zeigte sich ein Elutionspeak im Bereich zwischen 325-360 mL. Die Elutionsfraktionen wiesen teils große volumetrische rPK-Aktivität auf (Fraktion A12: 7743 U/mL) und entsprachen summiert rund 50 % der Gesamtaktivität vor KIA-Reinigung (Anhang 8.3, Tabelle 8-1). Der in der Waschfraktion aufgetretene Peak besitzt ebenfalls Proteaseaktivität, aber enthält nur 3 % der ursprünglichen Gesamtaktivität. Die Ursache ist auf die Direktbeladung der Säule zurückzuführen, bei der ein Problem mit der Ventilstellung vorlag. In den Elutionsfraktionen kam es nach ca. 10 min zur Präzipitation der rPK, was durch Aktivitätsbestimmung von Überstand und Pellet bestätigt wurde.

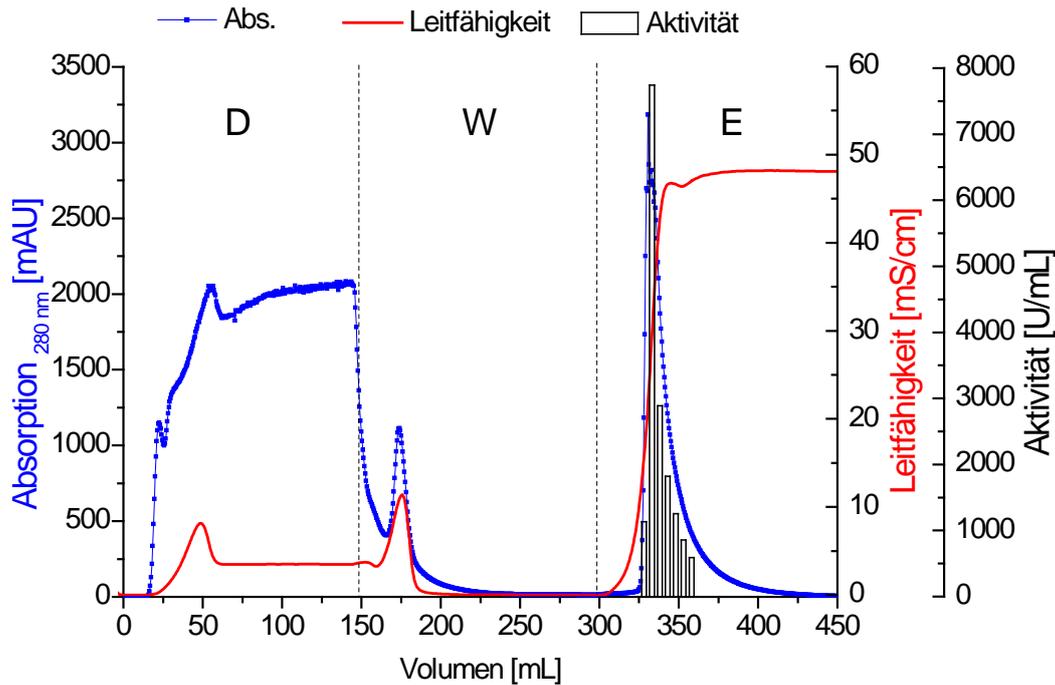


Abbildung 3-14: Chromatogramm der KIA von Fermentationüberstand X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK-Klon 7. 130 mL Retentatüberstand (dialysiert) wurden auf eine Streamline SP-XL Säule (CV=75 mL) geladen. Waschschritt mit 2 CV KIA-Bindungspuffer; 100 % KIA-Elutionspuffer für 200 mL; 5 mL Fraktionen; Säulen zeigen die Aktivität der Fraktionen A11, A12, B12, B11; B10; B9; B8 (v.l.n.r.). Probenaufrag/Durchlauf: D; Waschfraktion: W; Elution: E.

Der Überstand der Elutionsfraktionen wurde nach einer Zentrifugation über 30 min bei 4000 x g vollständig verworfen und das Pellet wahlweise in Tris- oder Phosphatpuffer mit 20 % Glycerin resolubilisiert und für Immobilisierungsreaktionen auf eine gewünschte Proteinkonzentration eingestellt. Dabei war die Proteinlösung nahezu frei von weiteren proteinogenen Verunreinigungen (Abbildung 3-15 (A)). Die spezifische Aktivität der rPK lag nach Resolubilisierung zwischen 370-500 U/mg, d.h. im Durchschnitt bei 430 U/mg (Anhang 8.3, Tabelle 8-1). Das Enzym ist in Lösung bei 4 °C für mindestens zwölf Monate ohne Aktivitätsverlust lagerbar [Ebeling *et al.*, 1974; Kraus und Femfert, 1976].

### 3.1.2.5 Generieren einer rPK-Variante mit C-terminalem His-tag

Da es auch nach mehrfacher Wiederholung nicht möglich war die vorhandene rPK aus dem Fermentationsüberstand mittels IMAC aufzureinigen, wurde untersucht ob der 6xHis-tag vorhanden ist. Der His-tag ist allerdings die Voraussetzung für eine zielgerichtete Immobilisierung an NTA- bzw. IDA-beschichteten Oberflächen. Darum sollte ein Anti-6xHis-Western Blot das Vorhandensein bzw. Fehlen des 6xHis-tag am rPK-Protein zeigen. Hierzu wurde das mit 20 mM KPP pH 7,5; 20 % Glycerin resolubilisierte Präzipitat der KIA-Elutionsfraktion A11 auf eine Proteinkonzentration von 0,5-0,1 mg/mL verdünnt, mit 1 mM

PMSF für 10 min bei Raumtemperatur inaktiviert [Kolvenbach *et al.*, 1990; Salamin *et al.*, 2010], auf ein SDS-PAGE Gel geladen (Kapitel 2.25) und Silber gefärbt (Kapitel 2.25.2). In Abbildung 3-15 (A) Bahn 2-4 zeigt sich auch nach PMSF-Inaktivierung ein typisches SDS-PK-Verdaumuster, das mit sinkender Proteinkonzentration abnimmt. Es ist bekannt, dass PK unter Einfluss von Dodecylsulfat stark stimuliert wird und es ohne Substrat zum Selbstabbau kommt [Hilz und Fanick, 1978; Hilz *et al.*, 1975; Kolvenbach *et al.*, 1990].

Verunreinigungen oberhalb der rPK-Proteinbande waren nicht zu erkennen. Ein zweites SDS-PAGE Gel wurde analog beladen, als Positivkontrolle die mikrobielle Transglutaminase aufgetragen (S2P-6xHis) [Marx *et al.*, 2008b] und anschließend der *Western Blot* (Kapitel 2.26) nach Sigma Aldrich-Anleitung [Sigma-Aldrich, 2008] durchgeführt. Im *Western Blot* in Abbildung 3-15 (B) sind keine Proteine mit 6xHis-tag sowohl im Fall der kommerziellen PK als auch bei der rekombinant produzierten PK (rPK) aus der KIA zu detektieren, während die Positivkontrolle S2P reagierte.

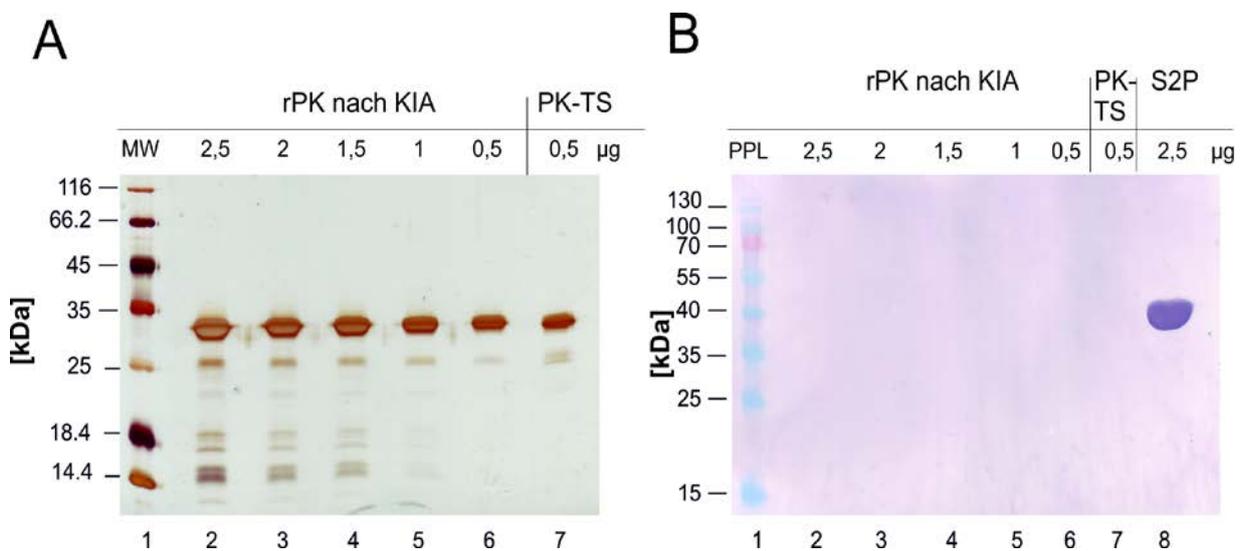


Abbildung 3-15 **(A)**: SDS-PAGE Gel (Silberfärbung) einer Verdünnungsreihe von rPK (aus Fermentation X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK-Klon 7 nach Zentrifugation, UF, KIA-Aufreinigung, Zentrifugation und Resolubilisierung mit 20 mM KPP pH 7,5; 7,6 % Glycerin). Bahn 1: MW Marker [5  $\mu$ L]; Bahn 2-7: rPK (31,5 kDa) aus der Fermentation mit typischem Verdaumuster, aufgetragen von 2,5-0,5  $\mu$ g pro Bahn [10  $\mu$ L]; Bahn 7: PK-Präparat von Thermo Scientific (30 kDa) 0,5  $\mu$ g [10 $\mu$ L]; **(B)**: *Western Blot* der rPK aus der Fermentation. Bahn 1: PPL [2  $\mu$ L]; Bahn 2-6: rPK von 2,5-0,5  $\mu$ g [10  $\mu$ L]; Bahn 7: PK-Präparat Thermo Scientific 0,5  $\mu$ g [10  $\mu$ L]; Bahn 8: Positivkontrolle S2P-6xHis (39 kDa) 2,5  $\mu$ g [10 $\mu$ L]. Alle Proben wurden mit 1 mM PMSF 10 min bei RT inaktiviert (mit Ausnahme S2P-6xHis), 1:2 mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert.

Um das C-terminale Ende der rPK und somit eine eventuelle Spaltstelle bzw. den korrekten isoelektrischen Punkt zu bestimmen, wurde eine Massenspektrometrieanalyse mit Elektrosprayionisation (ESI-MS) durchgeführt (Kapitel 2.27). In der Proteinlösung der in dieser Arbeit produzierten rPK konnten zwei Proteinspezies identifiziert werden.

Beide Spezies traten mit einer nahezu gleichen relativen Häufigkeit auf, die Erste bei 29146,1 g/mol und die Zweite bei 29273,1 g/mol (Abbildung 3-16). Die theoretische Molmasse von 31514 Da, die sich nach der translatierten Gensequenz ergeben würde, wurde nicht gefunden (Abbildung 3-12). Die gemessenen Molmassen wurden über das *Online-ExPASy-Tool Compute pI/Mw* [ExPASy; Walker *et al.*, 2005] mit denen der PK-AS-Sequenz (ohne Prä-Pro-Sequenz) bei einer durchschnittlichen AS-Masse verglichen. Unter Beachtung der zwei vorhandenen Disulfidbrücken (Abzug von vier H<sup>+</sup>-Massen; 4 g/mol) wurde für die erste Spezies eine AS-Sequenz mit dem C-Terminus YQALE (pI 7,8) und für die Zweite mit dem C-Terminus YQALEQ (pI 7,8) bestimmt. Diese Daten legen das Fehlen des kompletten Plasmid-internen *tags* aus c-Myc, fünf weiterer AS und 6xHis nahe.

Möglicherweise dient die AS-Sequenz LE, auf genetischer Ebene XbaI-Restriktionsschnittstelle (Kapitel 8.1.2), als PK-Erkennungsstelle, an der sich die PK autokatalytisch selbst spalten könnte. Um dies zu überprüfen wurde eine rPK-Variante generiert, welche direkt nach dem Wildtyp-C-Terminus (YQA) einen 6xHis-*tag* trägt.

Die kommerzielle PK wird laut Hersteller (Thermo Scientific) in *Pichia pastoris*-Zellen hergestellt. Durch üblicherweise verwendete Vektoren wie pGAPZα oder pPICZα wäre eventuell ein Plasmid-interner 6xHis-*tag* anzunehmen. Für die via ESI-MS identifizierte Proteinspezies von 28912,87 g/mol aus dem kommerziellen PK-Präparat konnte ein nativer C-Terminus aus der AS-Sequenz YQA (pI 8,25) bestimmt werden (Abbildung 3-17). Die kommerzielle PK enthält somit keinen His-*tag*. Interessant ist auch, dass der Sequenzvergleich der monoisotopischen Auswertung über ExPASy ein Molekulgewicht von 28888,86 g/mol zeigt (-4 g/mol, bezüglich Disulfidbrücken), somit fehlen 28 g/mol zur MS-identifizierten Molekülgröße von 28912,87 g/mol. Dieses Gewicht unterschreitet jedoch selbst die kleinste AS Glycin mit ca. 75 g/mol und scheint somit eher auf eine weitere post-translationale Modifikation, wie Dimethylierung von Arginin bzw. Lysin (ca. 28 g/mol), Formylierung des N-Terminus (ca. 28 g/mol) oder Ethylierung (ca. 28 g/mol) bei der technischen Produktion hinzudeuten [ABRF, 2014].

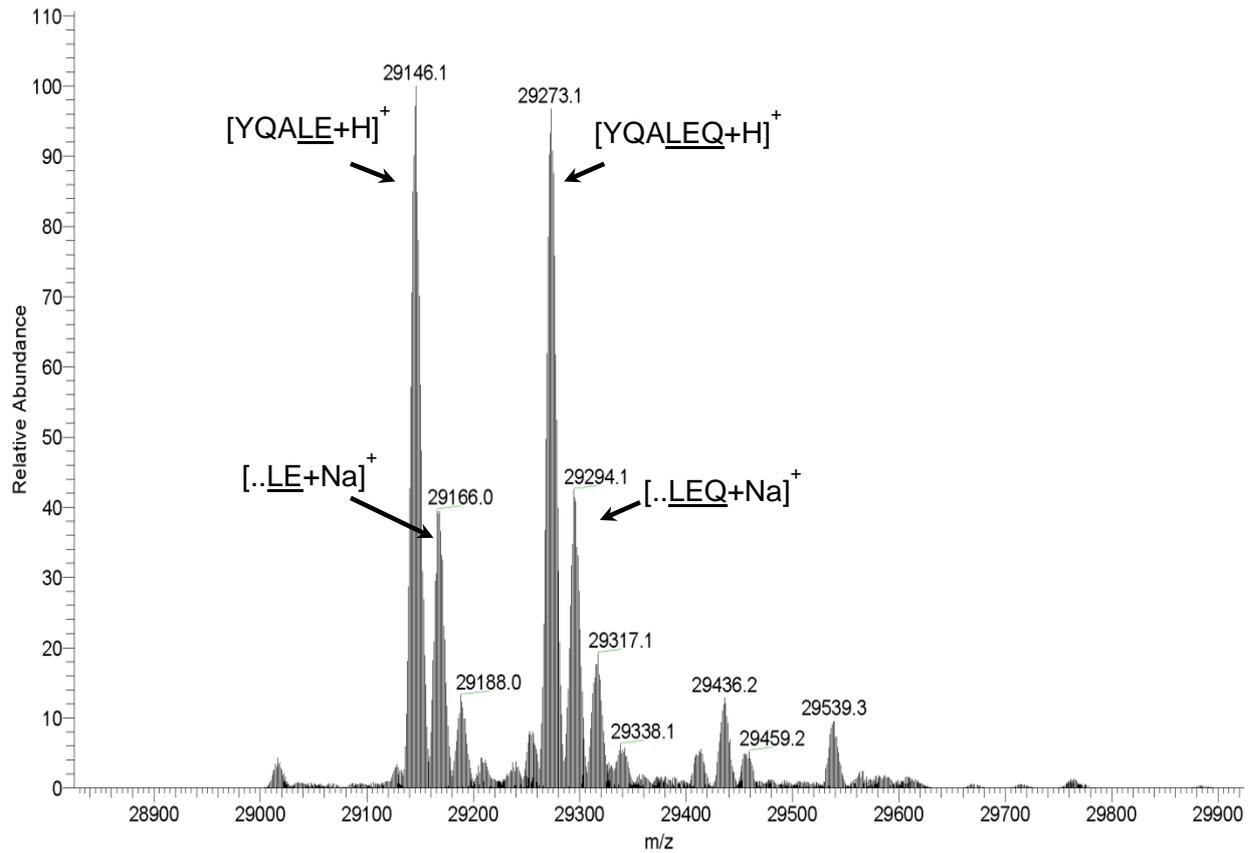


Abbildung 3-16: ESI-MS-Spektrum (durchschnittliche AS-Masse) der rPK aus der Fermentation X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK Klon 7 nach Zentrifugation, UF, KIA-Aufreinigung, Zentrifugation und Resolubilisierung mit 20 mM KPP pH 7,5; 7,6 % Glycerin). m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Relative Abundanz: relative Häufigkeit im Raum. Zwei Hauptpeaks mit etwa gleicher Häufigkeit bei 29146 g/mol (YQALE) und 29273 g/mol (YQALEQ) und die jeweils um knapp 21 g/mol verschobenen Peaks der Natriumaddukte.

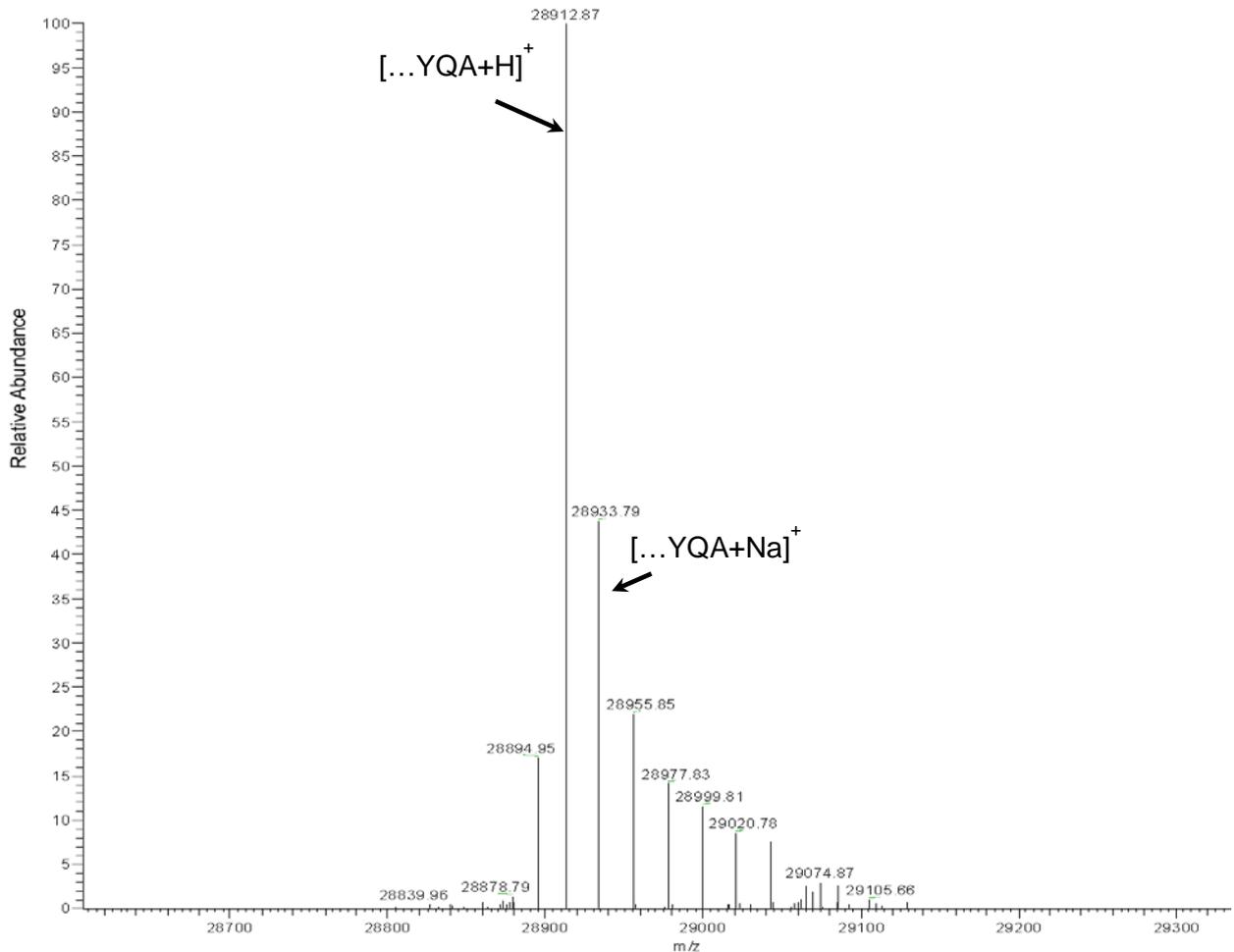


Abbildung 3-17: ESI-MS-Spektrum (monoisotopische AS-Masse) der kommerziellen PK (Thermo Scientific). m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Relative Abundanz: relative Häufigkeit im Raum. Ein Hauptpeak von höchster Intensität liegt bei 28912,87 g/mol (YQA) und daneben die jeweils um knapp 21 g/mol verschobenen Peaks der Natriumaddukte.

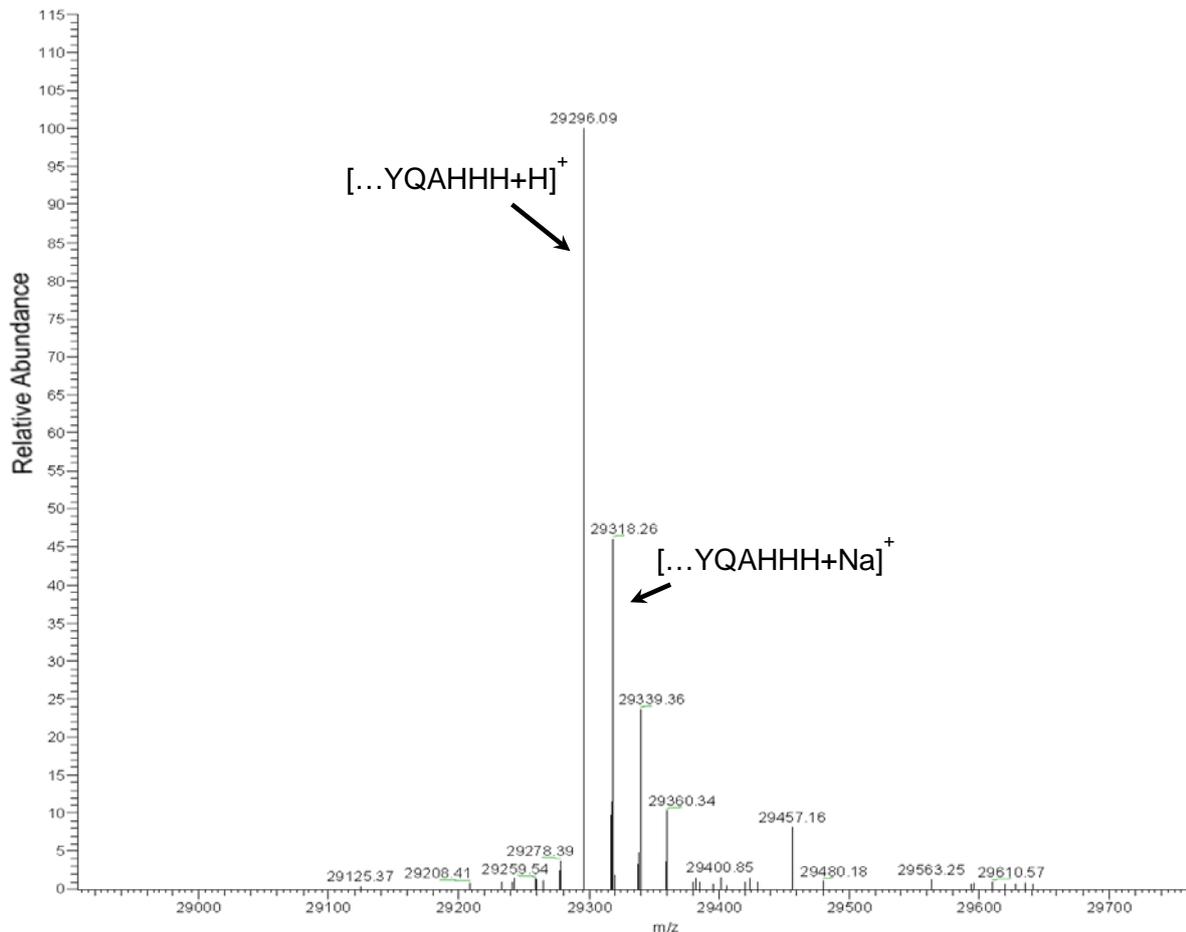


Abbildung 3-18: ESI-MS-Spektrum (monoisotopische AS-Masse) der rPK-CT-His120 nach Reinigung mittels IMAC. m/z: Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Relative Abundanz: relative Häufigkeit im Raum. Ein Hauptpeak von höchster Intensität liegt bei 29296,09 g/mol (YQAHHH) und daneben die jeweils um knapp 21 g/mol verschobenen Peaks der Natriumaddukte.

Zur Generierung einer rPK-Variante mit sechsfachem His-*tag* am C-Terminus wurde vor die Restriktionsschnittstelle *Xba*I im PK-Gen (Anhang 8.1) von pPICZαA-Pro-PK eine Sequenz kodierend für einen 6xHis-*tag* mit Stopcodon direkt nach dem Codon für die letzte Wildtyp-AS A279 (beginnend ab nativer PK-Sequenz) inseriert (Abbildung 3-19). Dazu wurde eine ortsgerechte Mutagenese durchgeführt (Kapitel 2.15.2). Als Template wurde das Plasmid pPICZαA-Pro-PK und die flankierenden PK-CT-6xHis-Mutagenese-Primer (Tabelle 2-5) verwendet. Das resultierende PCR-Produkt, welches in einem 1 %-igen Agarosegel (Kapitel 2.8) bei ungefähr 1200 Bp lief, entsprach dem 1157 Bp langen Pro-PK-CT-6xHis-Gen. Das PCR-Produkt und der Vektor pPICZαA wurden analog zu Abschnitt 3.1.2.2 mit *Xba*I und *Eco*RI verdaut (Kapitel 2.7), miteinander ligiert (Kapitel 2.10), aufgereinigt (Kapitel 2.11) und in DH5α transformiert (Kapitel 2.12.2). Wie bereits zuvor beschrieben wurde das resultierende Plasmid pPICZαA-Pro-PK-CT-6xHis mit positivem Sequenzierungsergebnis linearisiert und über homologe Rekombination in elektrokompente X33-Zellen transformiert.

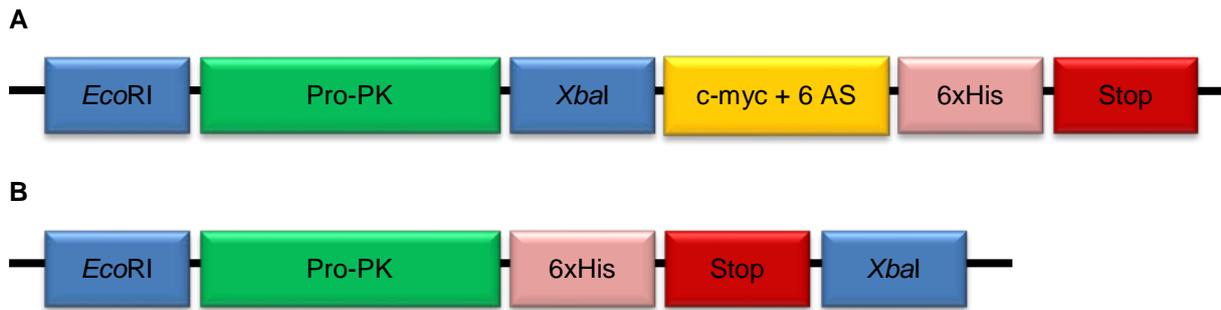


Abbildung 3-19: Schematische Darstellung des Ziel-ORFs in pPICZ $\alpha$ A. **(A)**: Das Genkonstrukt der rPK von pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK. **(B)**: Das neue Genkonstrukt von PK-CT-6xHis.

176 X33-PK-CT-6xHis-Klone wurden in 96x DW-MTPs kultiviert (Kapitel 2.19.1) und auf Proteaseaktivität untersucht (Kapitel 2.20.2.2). Jeder Überstand der 176 DW-MTP-Kulturen wurde zusätzlich auf das Vorhandensein von rPK mit 6xHis-tag mittels *Western Blot* untersucht (Kapitel 2.26). Bei keinem X33-Klon konnte ein Protein mit 6xHis-tag nachgewiesen werden. Darum wurden die zwei Klone deren Überstände die höchste volumetrische Proteaseaktivität aufwiesen, Klon 105 und Klon 120, zur weiteren Charakterisierung im Schüttelkolben-Maßstab kultiviert (Kapitel 2.19.2). Am Ende der 96-stündigen Kultivierung konnte eine  $OD_{600} = 18$  (Proteaseaktivität= 10 U/mL) für die Kultur von Klon 105 X33-PK-CT-6xHis und eine  $OD_{600} = 24$  (Proteaseaktivität= 20 U/mL) für die Kultur von Klon 120 X33-PK-CT-6xHis gemessen werden. Für alle weiteren Arbeiten wurde Klon 120 mit der höchsten gemessenen Volumenaktivität gewählt und als Kryokultur 1:5 (v/v) gelagert (Kapitel 2.19.5). Für die daraus resultierende rPK (rPK-CT-His120) konnte bei der ESI-MS-Analyse (Kapitel 2.27) eine Proteinspezies mit 29296,09 g/mol identifiziert werden, was einer rPK mit C-terminaler AS-Sequenz von YQAHHH (pI 8,26) entspricht (Abbildung 3-18). Das reife Enzym rPK-CT-His120 besitzt am C-Terminus nur drei Histidine, obwohl auf genetischer Ebene sechs CAT-Triplets vorhanden waren. Dennoch ist auch ein 3xHis-tag zur Reinigung über IMAC [Terpe, 2003] und zur zielgerichteten Immobilisierung verwendbar. Für die Aufreinigung wurde rPK-CT-His120 in einem fünffachen Schüttelkolben-Maßstab produziert (Kapitel 2.19.2). Der Überstand wurde gegen 50 mM Tris/HCl pH 8,0 dialysiert (Kapitel 2.23) und in einer IMAC (Kapitel 2.24.1.1) eingesetzt. In Abbildung 3-20 sind die *Online*-Messdaten der Aufreinigung (Direktbeladung), sowie der Wasch- und Elutionsschritt dargestellt. Der Elutionspeak wies zu Beginn eine kleine Schulter auf, allerdings enthielt die zugehörigen Elutionsfraktionen keine Proteaseaktivität. Mithilfe eines Elutionsgradienten über 4 CV konnten die Elutionsfraktionen ohne Enzymaktivität von denen mit Enzymaktivität erfolgreich getrennt werden. Ausgewählte Elutionsfraktionsproben wurden, wie in Kapitel 2.20.1 beschrieben, mit PMSF inaktiviert und auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen (Kapitel 2.25). In Abbildung 3-21 ist das mit Coomassie gefärbte Gel und in Tabelle 8-2 die dazugehörigen Aktivitätswerte gezeigt. Elutionsfraktionen mit Gesamtaktivitäten von über

164 U (Vergleich mit Fraktion B13) zeigten das typische SDS-PK-Verdaumuster (siehe Abbildung 3-15 (A)). Weitere Proteinverunreinigungen waren in den Elutionsfraktionen B3-C4 nicht zu detektieren. Im Durchlauf wurde nur eine Aktivität von 0,4 U/mL gemessen.

Als Fazit lässt sich festhalten, dass es mithilfe der IMAC gelang das Zielprotein rPK-CT-His120 über einen 3xHis-tag aufzukonzrieren und aufzugereinigen (Tabelle 8-2). Die rPK-Ausbeute lag bei rund 40 mg/L X33-Kultur. Die Elutionsfraktionen der IMAC wurden analog der KIA bei 4 °C gelagert. Die gereinigte rPK-CT-His120 besaß eine spezifische Aktivität von  $409 \pm 7$  U/mg (Tabelle 8-2).

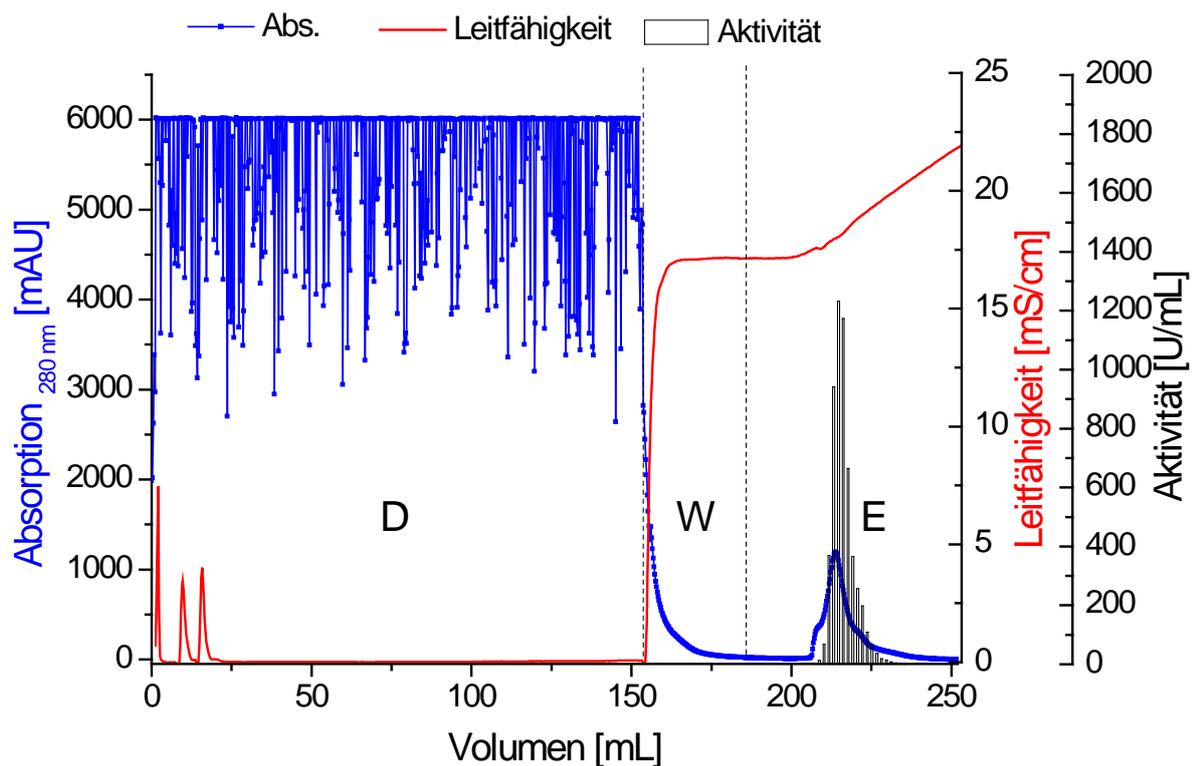


Abbildung 3-20: Chromatogramm der IMAC einer 500 mL Kultur X33/pPICZαA-Pro-PK-CT-6xHis Klon 120. 350 mL Überstand (dialysiert) wurden direkt (nicht dargestellt) und 150 mL über *Superloop*<sup>TM</sup> auf eine Ni-Sepharose-Säule (14 mL) geladen. Waschschrift 3 CV IMAC-PK-Bindingpuffer; Elution mit 4 CV IMAC-PK-Elutionspuffer auf 100 %; 1,5 mL Fraktionen; Säulen zeigen die Aktivität der Fraktionen B2-B15 und C1-C6 (v.l.n.r.). Probenauftrag/Durchlauf: D; Waschfraktion: W; Elution: E.

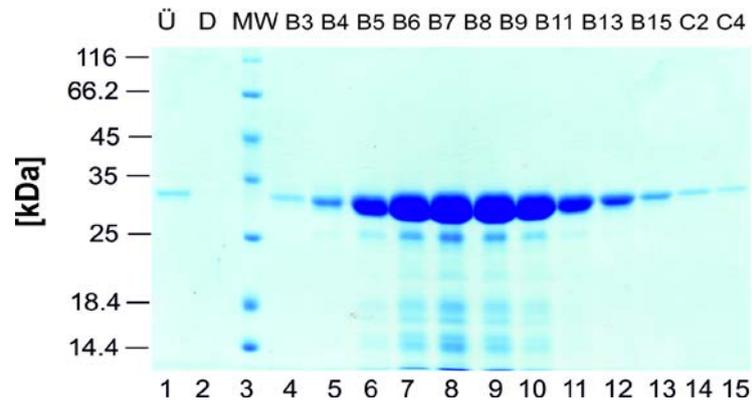


Abbildung 3-21: SDS-PAGE Gel (Coomassie-Färbung) ausgewählter IMAC-Fractionen der Schüttelkolbenexpression von X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK-CT-6xHis Klon 120. Bahn 3: MW-Marker [5  $\mu$ L]; Bahn 1: Überstand X33-Klon 7 nach Dialyse vor IMAC; Bahn 2: Durchlauf der IMAC; Bahn 4-15: Elutionsfraktionen B3-C4. Alle Fraktionen wurden mit 1 mM PMSF für 10 min bei RT inaktiviert und 1:2 (v/v) mit Probenpuffer für 5 min bei 99 °C inkubiert [10  $\mu$ L]. Protein rPK-CT-His120 (29,3 kDa). Bahn 5-11 SDS typisches PK-Verdaumuster.

### 3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Produktion der Enzyme (Kapitel 3.1)

Die rMicNuc konnte mit C-terminalem 6xHis-tag in Anlehnung an die Literatur in *E. coli* in Form von *inclusion bodies* produziert werden. Eine Rückfaltung des Proteins wurde während der IMAC-Reinigung realisiert. Die Proteinkonzentration nach chromatographischer Reinigung (IMAC) lag bei etwa 250 mg/L Bakterienkultur und die spezifische Aktivität der rMicNuc bei 456 U/mg. Weiter konnten drei Cystein-Varianten der rMicNuc generiert werden, die ebenfalls in eine aktive Form gebracht werden konnten und bei denen es ohne Reduktion der Disulfidbrücken zur Multimerisierung kam. Dies führte zum Absinken der spezifischen Aktivität, welche durch Reduktion mit DTT wieder auf 80-100 % der rMicNuc-Aktivität gesteigert werden konnte.

Im Fall der rPK-Produktion ist es gelungen mittels Expression in *Pichia pastoris* X33 sekretierte aktive rPK zu erzeugen. Im Rahmen einer 20-L-Fermentation konnte eine Proteinkonzentration von 150 mg/L erzielt werden und die spezifische rPK-Aktivität lag bei 587 U/mg (Tabelle 3-3). Nach Ultrafiltration und Aufreinigung mittels KIA wurde eine geminderte spezifische Aktivität von 430 U/mg bestimmt. Derzeit existiert keine Publikation zur Produktion von PK in *Pichia pastoris*, obwohl lt. Produktbeschreibung der Firma Thermo Fisher Scientific eine kommerzielle PK in *Pichia pastoris* hergestellt wird. Durch Einsatz einer Ultrafiltrationsanlage und anschließender Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie konnte die rPK aufgereinigt werden. Zudem ist es gelungen, eine Histidin-getaggte rPK-Variante zu erzeugen (rPK-CT-His120; spezifische Aktivität 409 U/mg), welche am C-Terminus drei Histidine trug. Die Reinigung dieser Variante war über eine Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metallionen möglich. Aus

Schüttelkolbenkultivierungen im 100 mL-Maßstab konnte eine Zielproteinkonzentration an rekombinanter PK nach Aufreinigung von ca. 40 mg/L ermittelt werden.

## 3.2 Untersuchungen zur zielgerichteten Immobilisierung

Die ungerichtete Immobilisierung von PK und MicNuc ist bereits bekannt. Bislang wurde die PK über freie Aminogruppen an Carboxy-funktionalisierte magnetische Partikel immobilisiert [Slováková *et al.*, 2008]. Auch die Kopplung von PK an mikroporöse epoxid-aktivierte Acrylkugeln (Eupergit® C/ Sigma Aldrich, Bestellnr. 82452-1G) wurde bereits durchgeführt [Boller *et al.*, 2002; Katchalski-Katzir und Kraemer, 2000]. Eine weitere Immobilisierung erfolgte via freier Aminogruppen an oxidierten Saccharosepolymeren [Deepthi *et al.*, 1998].

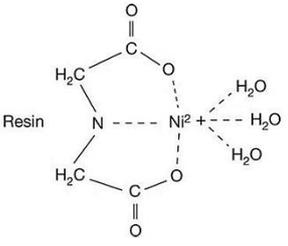
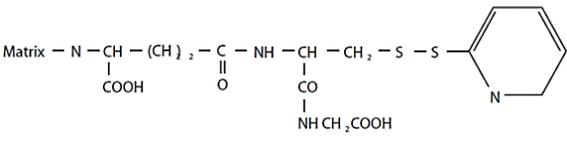
MicNuc konnte bereits erfolgreich über freie Amino-, Carboxy- oder Tyrosylgruppen an CNBr-aktivierte Sepharose 4B [Guisan und Ballesteros, 1979], Nylon 66- und Polystyrolkugeln [Michalon *et al.*, 1993] ungerichtet immobilisiert werden. Eine wiederholte Nutzung der beiden Enzyme ist bislang nicht möglich. Die zielgerichtete Immobilisierung über positionsspezifisch eingeführte *tags* oder -Aminosäuren ist nicht bekannt. Im Folgenden werden spezifische Begriffe zur Beschreibung der Immobilisierung (Immobilisierungsparameter) nach Sheldon *et al.* verwendet [Sheldon und van Pelt, 2013]:

- Immobilisierungsausbeute [%] =  $100 \times (\text{Aktivitätsdifferenz} / \text{Initialaktivität})$
- Immobilisierungseffizienz [%] =  $100 \times (\text{trägergebundene Aktivität} / \text{Aktivitätsdifferenz})$
- Aktivitätsausbeute [%] =  $100 \times (\text{trägergebundene Aktivität} / \text{Initialaktivität})$
- Elutionseffizienz [%] =  $100 \times \left( \frac{\text{volumetrische Aktivität nach Elution}}{\text{Aktivitätsdifferenz}} \right)$

### 3.2.1 Zielgerichtete Immobilisierung an porösen Trägern

Für die Untersuchung zur zielgerichteten Immobilisierung wurden zunächst kommerzielle poröse Träger verwendet, die eine relativ große Oberfläche aufweisen. Dabei wurde die generelle Immobilisierbarkeit, die Aktivität auf dem Träger, die reversible Nutzung, Mehrfachbeladung mit Substrat und die Stabilität auf dem Träger untersucht. Für die Enzymkopplung über den His-*tag* wurden mit Nickel beladene Agarose-*beads* verwendet, die zu 6 % quervernetzt waren (Ni-Sepharose™ high performance). Die Kopplung über die Thiolreste der Cysteine erfolgte an Bromcyan aktivierten Agarose-*beads*, zu 4 % quervernetzt, die mit einem Thiol-Linker versehen waren (ATS). Die Aktivität am Träger wurde für rPK wie unter Kapitel 2.20.2.4 und für rMicNuc wie unter Kapitel 2.20.3.3 beschrieben, bestimmt.

Tabelle 3-4: Übersicht/Vergleich der verwendeten kommerziellen porösen Träger.

Material	Ni-Sepharose™ High Performance	Aktivierte Thiolsepharose (ATS)
Größe	~34 µm	45-165 µm
Struktur	6 % Agarose	4 % Agarose
Quervernetzung	hoch	keine
Porengröße	29-80 nm [Bothe, 2014; Williams und Hagel 1999]	~30 nm Sepharose 4B [Sigma-Aldrich, 2006]
Oberfläche	-	~5 m <sup>2</sup> /mL Sepharose 4B [Sigma-Aldrich, 2006]
Ladekapazität	> 40 mg 6x(His)-Protein/ mL Medium	2–3 mg Mercaptalbumin (67 kDa)/ mL abgetropftes Medium
Reaktive Gruppe/ Linker auf Trägerseite	IDA-Ni <sup>2+</sup>	(Glutathion)- 2-Pyridyl Disulfid
	 <p>[GE-Healthcare, 2005; PALL_Corporation, 2013]</p>	 <p>[GE-Healthcare, 2008]</p>
Reaktive Gruppe Enzymseite	Histidin (Imidazol)	Cystein (Thiol)

### 3.2.1.1 Immobilisierung über Komplexbildung

Der genetisch inserierte 6xCAT-*tag* am C-Terminus der rPK-CT-His120, welcher auf Proteinebene mit drei Histidinen und bei der rMicNuc mit sechs Histidinen präsent ist, wurde für eine zielgerichtete Immobilisierung eingesetzt. Das aktive Zentrum der beiden Enzyme liegt räumlich entfernt vom C-Terminus und zudem ermöglicht die Komplexbildung eine wiederholte Nutzung. Zum Vergleich wurden die PK mit 3xHis-*tag* (rPK-CT-His120) und die ebenfalls selbstproduzierte PK ohne His-*tag* (rPK), sowie der rMicNuc und eine Cystein-Variante (Cys-Dreifach-Variante), die beide einen 6xHis-*tag* tragen, verwendet. Alle vier Enzymlösungen wurden über Gel-Permeations-Chromatographie auf den entsprechenden Immobilisierungspuffer umgepuffert (Kapitel 2.24.3), auf 0,1 mg/mL eingestellt und an Ni-Sepharose immobilisiert (Kapitel 2.28.1). In Abbildung 3-22 (A/B) ist die Bilanzierung der Immobilisierung von rPK und rMicNuc gezeigt. Zum Vergleich der Effektivität wurde rPK (ohne His-*tag*) und rMicNuc (6x His-*tag*) verwendet. Die trägergebundene Aktivität der rPK (Kapitel 2.20.2.4) und die Aktivität im Überstand (Kapitel 2.20.2.3) nach Enzymelution sind

auf die Gesamtinitialaktivität im Überstand vor Immobilisierung bezogen. In Abbildung 3-22 (A) ist der Vergleich zwischen der rPK ohne His-tag (rPK= 360 U/mg) und mit 3xHis-tag (rPK-CT-His120= 42 U/mg) für die Immobilisierbarkeit an Ni-Sepharose dargestellt. Im Fall der rPK-CT-His120 wurde eine stark minimierte spezifische Aktivität gemessen (42 U/mg statt ~409 U/mg). Grund war das dreimalige Einfrieren und Auftauen des Kulturüberstands vor der Aufreinigung. Unabhängig davon betrug die Immobilisierungsausbeute ca. 83 % für rPK-CT-His120, während bei der rPK nur 0,5 % erzielt werden konnten. Bei einer spezifischen Aktivität von 42 U/mg entspricht das einer Enzymmenge von 0,83 mg pro g Ni-Sepharose. Bei der Untersuchung der Immobilisierungseffizienz konnten 26 % im Fall der rPK-CT-His120 (9 U/g *beads*) und 0 % bei der rPK gemessen werden. Die Aktivitätsausbeute betrug bei rPK-CT-His120 21 % und bei rPK 0 %. Zudem konnte mit rPK-CT-His120 eine Elutionseffizienz von 97 % erreicht werden, d.h. 34 U (0,81 mg) wurden wieder von der Ni-Sepharose eluiert. Die Eluierbarkeit zeigte damit die Möglichkeit zur reversiblen Nutzung der rPK-CT-His120. Die rPK konnte nicht zielgerichtet an Ni-Sepharose immobilisiert werden und wies nur eine geringe Adsorption am Träger auf (0,5 %).

In Abbildung 3-22 (B) ist beispielhaft der Vergleich zwischen der rMicNuc und der Cys-Dreifach-Variante bei einer Ni-Sepharose-Kopplung gezeigt. Die trägergebundene Aktivität der rMicNuc (Kapitel 2.20.3.3) und die Aktivität im Überstand (Kapitel 2.20.3.1) nach Enzymelution sind auf die Gesamtinitialaktivität im Überstand vor Immobilisierung bezogen. Beide Varianten besitzen einen 6xHis-tag und eine Immobilisierungsausbeute von 100 %. Die maximale immobilisierbare Proteinmenge für die Sepharose war somit nicht erreicht. Sowohl die Immobilisierungseffizienz als auch die Aktivitätsausbeute lagen bei 0,5 % (rMicNuc) und 0,7 % (Cys-Dreifach-Variante). Dem gegenüber steht eine Elutionseffizienz von durchschnittlich 82 %. Die drei künstlich eingeführten Cysteine beeinträchtigen die Kopplung via Histidin-Ni-NTA-Komplexbildung nicht. Eine Gesamtübersicht aller Immobilisierungsparameter ist in Kapitel 4.2.1 in Tabelle 3-5 gezeigt.

PK (rPK-CT-His120) und MicNuc (rMicnuc und Cys-Dreifach-Variante) konnten erfolgreich zielgerichtet über einen His-tag immobilisiert und eluiert werden. Die geringe Aktivitätsausbeute war auf die Größe des jeweils eingesetzten Substrats in Bezug auf die Porengröße der Ni-Sepharose zurückzuführen und wird auch als Diffusionslimitation bezeichnet [Guisan und Ballesteros, 1979; Michalon *et al.*, 1993].

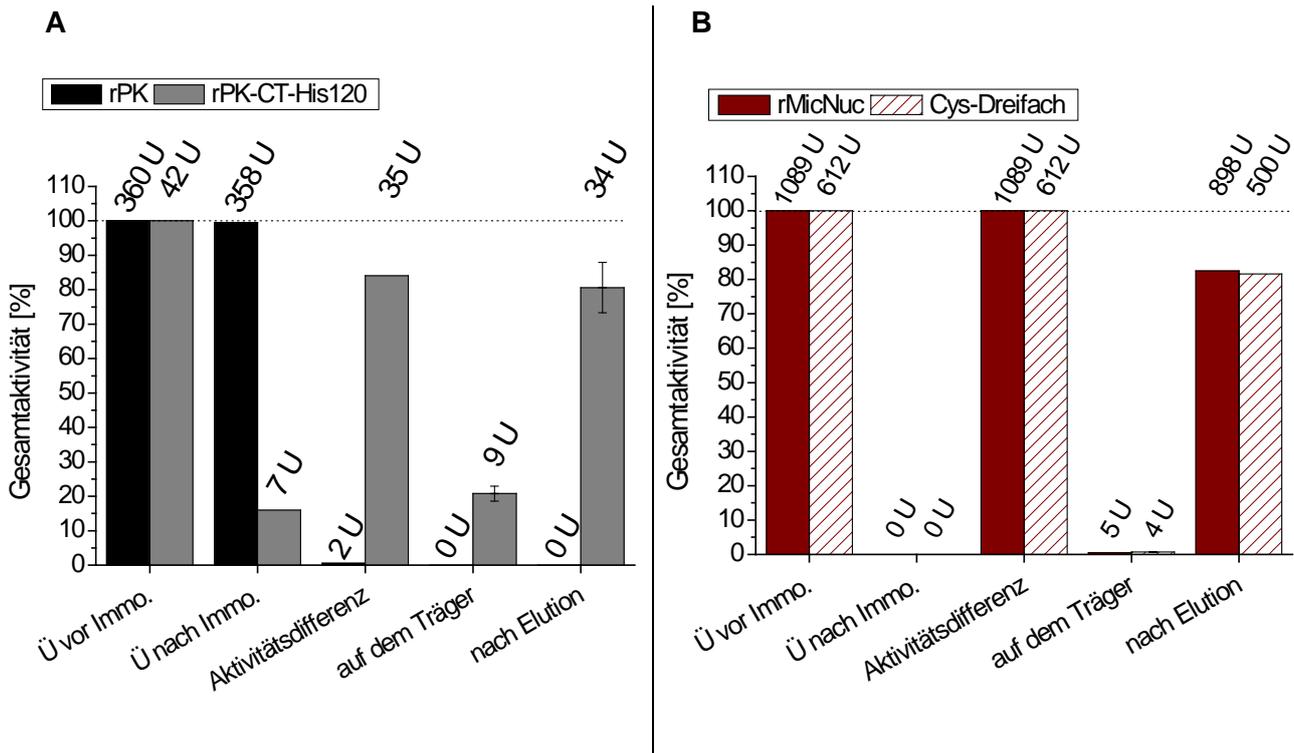


Abbildung 3-22: Aktivitätsübersicht zur zielgerichteten Immobilisierung über His-tag von vier Enzym-Varianten an Ni-Sepharose. Die Aktivität nach Immobilisierung im Überstand (Ü nach Immo.) und die Aktivitätsdifferenz sind bezogen auf die Gesamtinitialaktivität vor Immobilisierung (Ü vor Immo.). Die direkt gemessene Aktivität auf dem Träger (n=3) und die Aktivität im Überstand nach Elution (nach Elution; für rPK n=3; rMicNuc n=1) sind bezogen auf die Gesamtinitialaktivität vor Immobilisierung (Ü vor Immo.). **(A)**: Bilanz der Immobilisierung von rPK und rPK-CT-His120; in Prozent mit gemessenen Gesamtaktivitätswerten. **(B)**: Bilanz der Immobilisierung von rMicNuc und rMicNuc Cys-Dreifach-Variante; in Prozent mit gemessenen Gesamtaktivitätswerten. Ü nach Immo= Aktivität im Überstand nach Inkubation plus der Aktivität aus 3x Waschphase.

### 3.2.1.2 Immobilisierung über Disulfidbrücken

Eine Alternative zur zielgerichteten Immobilisierung via C-terminalen tag sollte über freie Thiolgruppen realisiert werden. Dazu wurden einerseits Cysteine in die Aminosäurestruktur der rMicNuc eingebracht (Kapitel 3.1.1.2). Andererseits sollte untersucht werden, ob sich die in der rPK bereits vorhandenen Cysteine für eine Kopplung eignen. Die rPK besitzt fünf native Cysteine (C34, C73, C123, C176 und C249). Zwischen den Cysteinen 34 und 123 sowie zwischen den Cysteinen 176 und 249 sind Disulfidbrücken ausgebildet, welche nah an der Proteinoberfläche lokalisiert sind [Betzel *et al.*, 1990], während C73 eine freie Thiolgruppe trägt [Pähler *et al.*, 1984]. C73 liegt jedoch in räumlicher Nähe von H69 aus der katalytischen Triade und könnte bei Immobilisierung zur Inaktivierung des Enzyms führen [Jany und Mayer, 1985]. Im Fall der rPK wurde die Kopplung über C73 ohne bzw. mit DTT-Reduktion, zur Nutzung aller Cysteine, untersucht. Dazu wurde die rekombinant produzierte rPK-Variante verwendet. Für die rMicNuc wurden alle drei erzeugten Cystein-Varianten, sowie der rMicNuc verwendet. Die zielgerichtete Immobilisierung über freie Thiolgruppen

erfolgte in Anlehnung an Mansfeld *et al.* 1999 wie unter 2.28.2 beschrieben [Mansfeld *et al.*, 1999]. In Abbildung 3-23 (A) ist die Immobilisierung der rPK an aktivierte Thiolsepharose (ATS) über ihre nativen Cysteine gezeigt. Dazu wurde eine rPK Enzymlösung mit DTT reduziert und einmal nicht mit DTT versetzt (Kapitel 2.28.2). Beide Lösungen wurden mit ATS inkubiert und die Aktivitäten bestimmt (Kapitel 2.28.2). Es konnte beobachtet werden, dass nur eine geringfügige Absenkung der spezifischen Aktivität um 9 % (416 U/mg auf 380 U/mg) nach 15 mM DTT Inkubation zu verzeichnen war. Auch in der ATS-Kopplung sind die Unterschiede zwischen reduzierter und unreduzierter rPK marginal. Die Immobilisierungsausbeute bei der rPK ohne Reduktion betrug 12 % und mit Reduktion 14 %, die Immobilisierungseffizienz war mit 2,2 % und 1,9 % gering. Eine Elution war kaum möglich, da die Elutionseffizienz bei nur 1 % bis 2 % lag. Die Immobilisierung konnte vermutlich nicht über freie Thiole entstanden sein, sondern über eine adsorptive Reaktion. Die Immobilisierungseffizienz sank von 26 % (rPK-CT-His120 an Ni-Sepharose) auf 2 % (rPK an ATS). Eine zielgerichtete Kopplung über die nativen Cysteine der rPK verlief damit wesentlich schlechter als durch Kopplung via His-tag, unabhängig davon ob über das freie C73 oder über alle fünf vorhandenen Cysteine gekoppelt wurde.

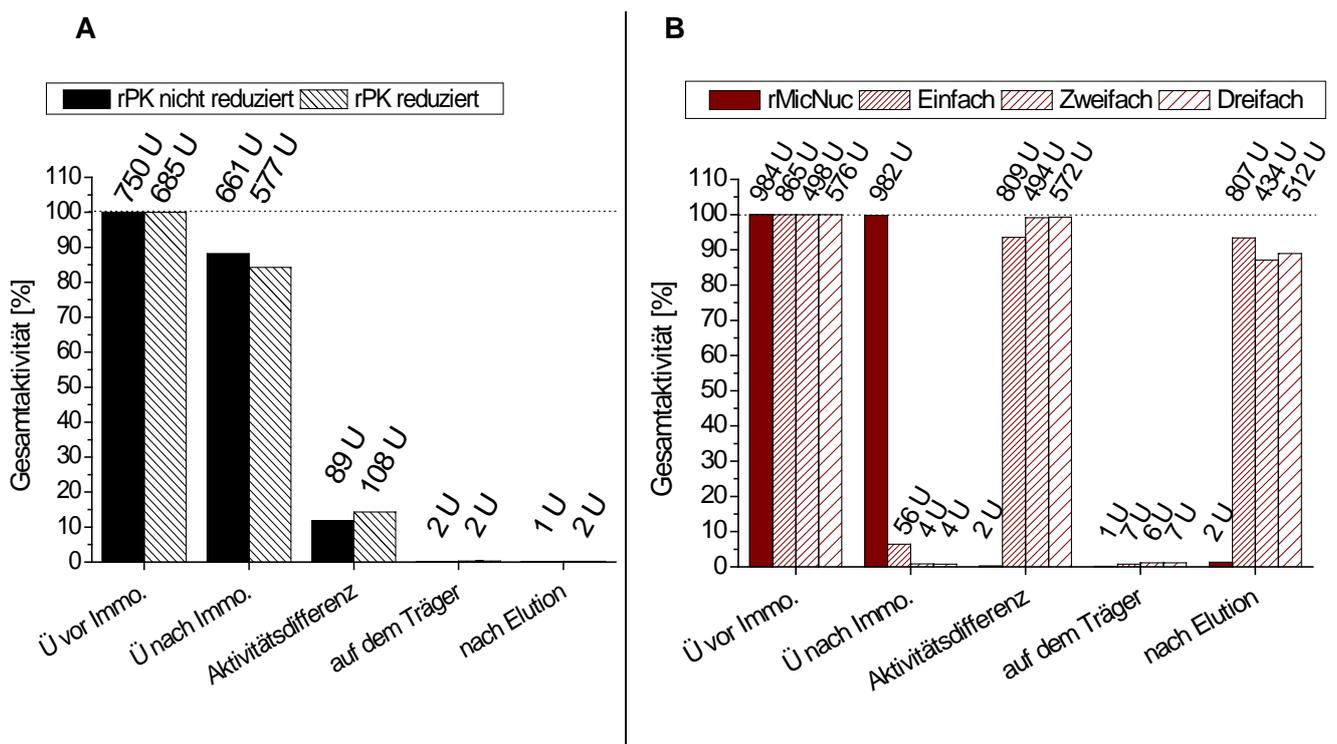


Abbildung 3-23: Übersicht zur gerichteten Immobilisierung über Cystein von fünf Enzym-Varianten an ATS. Die Aktivität nach Immobilisierung im Überstand (Ü nach Immo.) und die Aktivitätsdifferenz sowie die Aktivität auf dem Träger (n=3) und im Überstand nach Elution sind bezogen auf die Gesamtinitialaktivität vor Immobilisierung (Ü vor Immo.) **(A)**: Bilanz der Immobilisierung von rPK 10 mM DTT reduziert und nicht reduziert; in Prozent mit gemessenen Gesamtaktivitätswerten. **(B)**: Bilanz der Immobilisierung von rMicNuc, Cys- Einfach, Cys-Zweifach und Cys-Dreifach-Variante mit gemessenen Gesamtaktivitätswerten in Prozent.

Im Fall der rMicNuc-Cystein-Varianten (Abbildung 3-23 (B)) konnte eine hohe Immobilisierungsausbeute verzeichnet werden. Sie betrug zwischen 94 % (rMicNuc-Einfach) und 99 % (rMicNuc Cys-Zweifach- und Cys-Dreifach-Variante). Im Vergleich mit dem rMicNuc konnten hier nur 0,2 % Immobilisierungsausbeute beobachtet werden. Die Elutionseffizienz der Cystein-Varianten lag bei durchschnittlich 90 %. Die Immobilisierungseffizienz bzw. Aktivitätsausbeute belief sich auf 0,9 % (rMicNuc) sowie 1,2 % (Cys-Zweifach- und Cys-Dreifach-Variante) und war damit etwas größer als bei der Ni-Sepharose Immobilisierung. Somit zeigte sich ein ähnliches Bild wie unter Abbildung 3-22 (B), der Ni-Sepharose mit 0,5 % bis 0,7 %. Die Aktivität im Überstand der rMicNuc nach der Elution in Anwesenheit von DTT war mit 2 U sehr gering. Höchstwahrscheinlich wurden lediglich adsorptiv gebundene Proteine heruntergespült.

Die Trägeraktivität der rMicNuc war sieben Mal kleiner als im Fall der Cystein-Varianten. Durchschnittlich 7 U/g feuchte *beads* waren bei allen drei Cystein-Varianten messbar, unabhängig davon ob mehr Aktivität (807 U/g; Cys-Einfach-Variante) oder weniger Aktivität (434 U/g; Cys-Zweifach-Variante) gebunden wurde. Die Aktivitätsmessung an porösen Trägern mittels DNA als Substrat blieb somit ein generelles Problem und machte eine Vergleichbarkeit der drei Cystein-Varianten untereinander schwierig. Eine Gesamtübersicht aller Immobilisierungsparameter ist in Kapitel 4.2.1 in Tabelle 3-5 gezeigt.

Die gerichtete Immobilisierung über genetisch inserierte Cysteine innerhalb der rMicNuc war bezogen auf die Immobilisierungsausbeute dennoch erfolgreich und gewährleistet eine wiederholte Nutzung.

### 3.2.1.3 Enzymstabilität an porösen Trägern

Des Weiteren wurde die Aktivität der rPK (Kapitel 2.20.2.4) und rMicNuc (Kapitel 2.20.3.3) nach der Immobilisierung an den zwei verschiedenen Trägern, in einem Zeitraum bis zu 250 Tagen untersucht. Die Lagerung der trägergebundenen Enzyme erfolgte bei 4 °C in Immobilisierungspuffer-MN bzw. -PK (Tabelle 2-4). Es sollte die Lagerstabilität nach Immobilisierung untersucht werden. Abbildung 3-24 (A) zeigt die Aktivität der rPK (10 mM DTT reduziert und nicht reduziert) als auch die rMicNuc-Aktivität der drei Cystein-Varianten und der rMicNuc, immobilisiert an ATS. Die unspezifisch an ATS adsorbierte rPK zeigte nach über 8 Monaten noch 61 % (rPK nicht reduziert) bis 71 % (rPK reduziert) der ursprünglichen Aktivität. Die adsorptive Kopplung der rMicNuc an ATS blieb stabil, die Aktivität stieg leicht an (20 % nach 250 Tagen). Die drei Cystein-Varianten der Nuklease zeigten sehr unterschiedliche Reaktionen. Die Cys-Dreifach-Variante zeigte einen Aktivitätsverlust von 44 %. Die Cys-Zweifach-Variante war hingegen über acht Monate stabil, die Cys-Einfach-Variante verzeichnete nach zwei Wochen eine Aktivitätssteigerung, 67 % Zuwachs nach 250 Tagen.

In Abbildung 3-24 (B) ist die Aktivität der an Ni-Sepharose gekoppelten Enzyme über die Zeit dargestellt. Die Kopplung über den 6xHis-tag führte bei der Cys-Dreifach-Variante zu einem höheren Aktivitätsverlust (32 %) als beim rMicNuc (14 %). Die rPK-Aktivität an Ni-Sepharose immobilisierter rPK-CT-His120 bleibt über 180 Tage stabil, während die unspezifisch gebundene rPK einen Aktivitätsverlust von 35 % verzeichnet. Selbst nach über acht Monaten zeigten alle enzymgekoppelten Träger über 50 % der ursprünglich gemessenen Aktivität. Dabei zeigte die rPK-CT-His120, immobilisiert an Ni-Sepharose und die rMicNuc Cys-Einfach-Variante, immobilisiert an ATS, die besten Lagerstabilitäten bis zur leichten Aktivitätssteigerung.

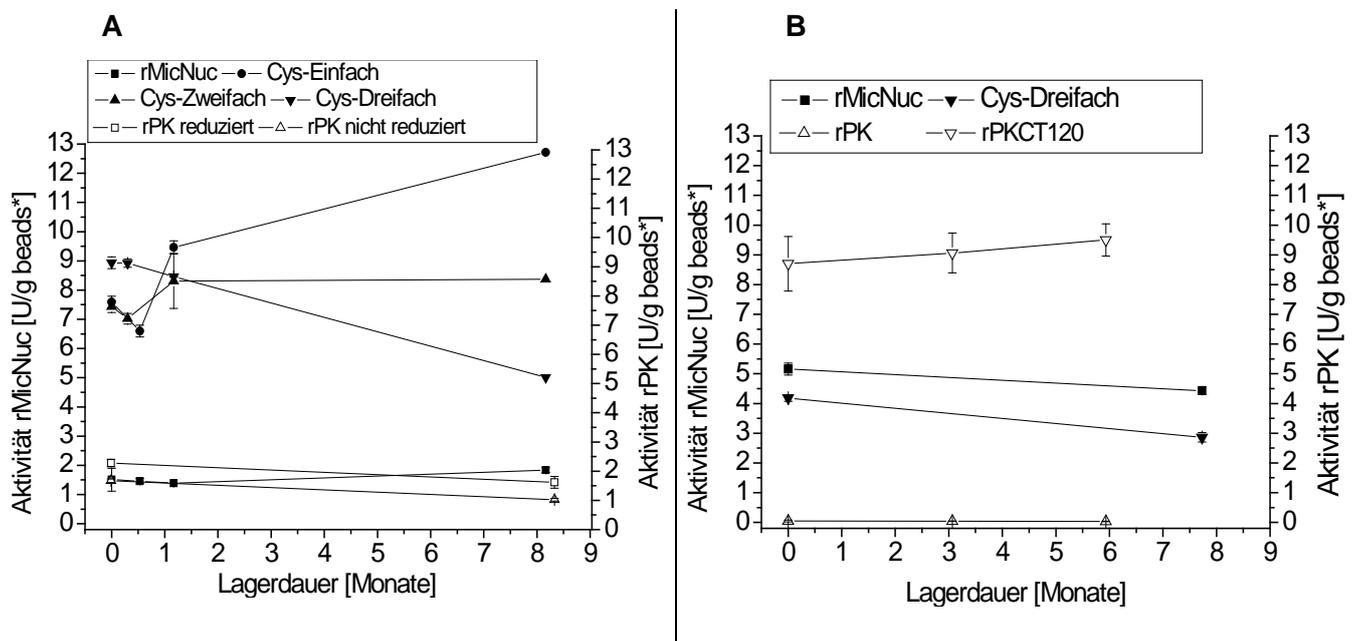


Abbildung 3-24: Aktivität aus der gerichteten Immobilisierung ausgewählter Enzyme am Träger. **(A)**: An ATS immobilisiert: rMicNuc, Cys-Einfach, Cys-Zweifach, -Cys-Dreifach-Variante, rPK reduziert (10 mM DTT) und nicht reduziert (3.2.1.2). **(B)**: An Ni-Sepharose immobilisiert: rMicNuc, Cys-Dreifach-Variante und rPK, rPK-CT-His120 (0). Aktivität in U/g beads\* (\*feucht) (n=3). Lagerung aller trägergebundenen Enzyme bei 4 °C in entsprechendem Immobilisierungspuffer-MN bzw.-PK.

### 3.2.2 Untersuchung zur mehrfachen Reaktion enzymgekoppelter Oberflächen

Es sollte untersucht werden, ob eine wiederholte Reaktion bzw. Substratbeladung die trägergebundene Aktivität beeinflusst. Dies bildet die Grundlage für den Einsatz als *Antifouling*-Beschichtung, da die jeweiligen Enzymsubstrate sukzessiv von Mikroorganismen gebildet werden und eine Anwendung enzymbeschichteter Materialien in mehreren Zyklen möglich sein soll. Auch eine Konkurrenzreaktion zwischen Substrat und der Trägeroberfläche wäre möglich, wobei es zum Ablösen von Enzymmolekülen kommen könnte. Es wurde am Beispiel der ATS die mehrfache Verwendung der rMicNuc Cys-Einfach-Variante und am Beispiel Ni-Sepharose die der rPK-CT-His120 untersucht.

Für die Durchführung wurde trägergebundenes Enzym gewaschen und abgewogen. Anschließend erfolgten die Enzymreaktionen in sechs Zyklen, welche jeweils aus Substratneubeladung, Waschschrift und Neueinwaage bestanden. Die jeweilige Aktivität pro Gramm feuchte *beads* wurde für die rPK, wie unter Kapitel 2.20.2.4 und für die rMicNuc wie unter Kapitel 2.20.3.3 beschrieben, bestimmt. Beide Assays wurden auf ein Gesamtvolumen von 2 mL und die Menge an *beads* auf 100 mg Einwaage adaptiert.

In Abbildung 3-25 (A) ist die mehrfache Verwendung der rMicNuc-ATS-*beads* gezeigt. Selbst nach sechsmaliger Substratbeladung kommt es zu keinem signifikanten Aktivitätsverlust. Durchschnittlich waren mehr als 80 % der Initialaktivität messbar, wobei ab der fünften Beladung sogar ein Anstieg der Gesamtaktivität zu verzeichnen ist. Auch in Abbildung 3-25 (B), am Beispiel der mehrmaligen Verwendung der rPK-Ni-Sepharose im Protease-Assay, zeigte sich die Aktivität pro Gramm feuchte *beads* als sehr stabil. Auch nach der sechsten Substratbeladung lag die Aktivität bei ca. 90 % der Initialaktivität.

Eine Mehrfachbeladung mit Substrat führte nach sechs Reaktionszyklen in beiden Fällen zu einer Aktivitätsverringerng um 16-17 %. Eine generelle Anwendung über längere Zeit in einem Bioassay zum *Antifouling*-Verhalten wäre möglich.

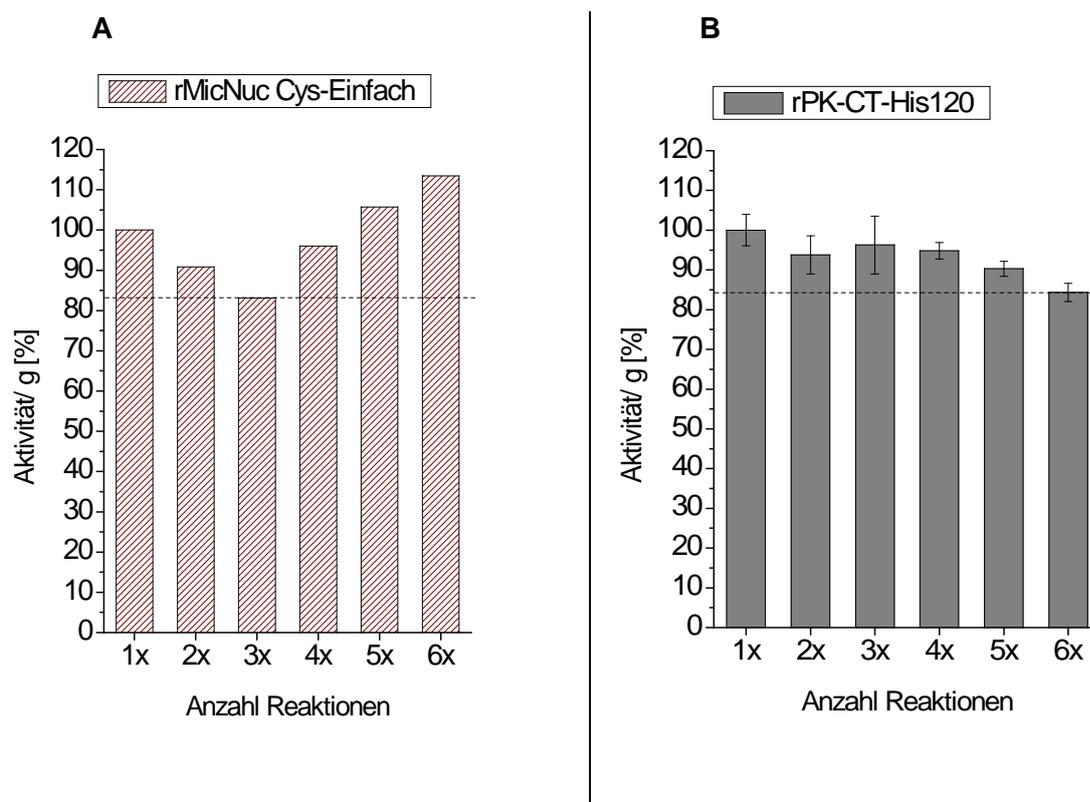


Abbildung 3-25: Verhalten der Aktivität/ g feuchte *beads* nach bis zu sechs Zyklen an Enzymreaktionen/ Substratbeladung in Prozent. Ein Reaktionszyklus besteht aus Waschschrift, Neueinwaage trägergebundenem Enzym, Aktivitätsmessung. **(A)**: Aktivität der rMicNuc Cys-Einfach-Variante immobilisiert an ATS (n=1). Nach 3x Reaktion betrug die Enzymaktivität noch 83 % der Ausgangsaktivität. **(B)**: Aktivität von rPK-CT-His120 immobilisiert an Ni-Sepharose (n=3). Nach 6x Reaktion betrug die Enzymaktivität noch 84 % der Ausgangsaktivität.

### 3.2.3 Immobilisierung an PP- bzw. epoxidierten PP-Oberflächen

Um im Rahmen eines Bioassays mit *Pseudomonas fluorescens* eine Visualisierung mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) zu gewährleisten, wurden rPK- und rMicNuc-Varianten an Polypropylen-Folien (PP) immobilisiert. Dieser weitverbreitete thermoplastische Kunststoff wird durch die Polymerisation von Propen erzeugt [Lide, 2005]. Das Anwendungsspektrum von PP reicht von der Herstellung von Folien, Verpackungen, Deckel und Verschlüsse sowie Einzelteile für die Elektro- und Automobilindustrie [Ceresana-Research, 2012], bis über Spacer in RO-Modulen [Vrouwenvelder *et al.*, 2009] und medizinischen Kathetern oder Materialien (Schläuche, Zahnersatz etc.). Eine Vermeidung von Biofilmbildung durch enzymbeschichtete PP-Materialien, sowohl in der Lebensmittelindustrie als auch in der Trinkwasseraufarbeitung und in der invasiven Medizin wäre von großer Bedeutung.

Für die Immobilisierung der produzierten Enzyme wurden PP-Folien verwendet, die mit Plasma und nasschemisch behandelt worden waren (Kapitel 2.29). Die daraus resultierenden unmodifizierten PP-Folien (PP), epoxidierten PP-Folien (PP<sub>epoxid</sub>) und die Ni-NTA-beschichteten PP-Folien (PP<sub>Ni-NTA</sub>) wurden mit rPK- und rMicNuc-Varianten immobilisiert. Dabei sollte die ungerichtete Immobilisierung über adsorptive Wechselwirkungen (rPK und rMicNuc immobilisiert auf PP) und über die Kopplung primärer Aminogruppen der Lysinreste mit Epoxidgruppen (rPK und rMicNuc immobilisiert auf PP<sub>epoxid</sub>) untersucht werden. Weiter wurde die gerichtete Immobilisierung über einen Histidin-tag untersucht (rPK-CT-His120 und rMicNuc immobilisiert auf PP<sub>Ni-NTA</sub>). Im Anschluss an die erfolgreiche Immobilisierung der Enzyme an unmodifizierte bzw. modifizierte PP-Oberflächen wurde der Einfluss dieser Folien auf die Biofilmbildung von Pseudomonaden untersucht.

Die Durchführung zur Immobilisierung von rPK an PP-Folien ist unter Kapitel 2.29.1 sowie, im Fall rMicNuc, unter Kapitel 2.29.2 aufgeführt. Die Aktivitätsmessung auf PP-Folien ist für rPK in Kapitel 2.20.2.5 und für rMicNuc unter Kapitel 2.20.3.4 beschrieben.

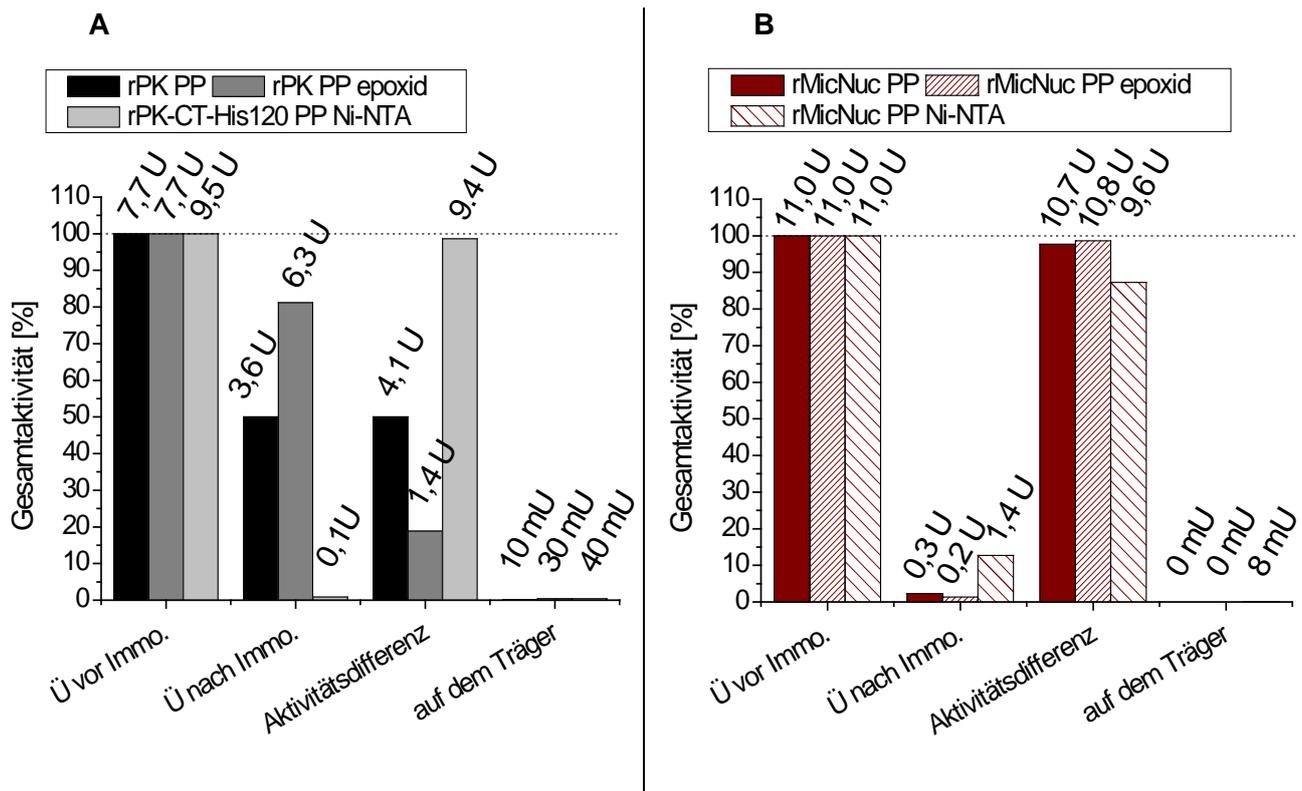


Abbildung 3-26: Übersicht zur ungerichteten und zielgerichteten Immobilisierung via His-tag von drei Enzym-Varianten an unmodifizierten/modifizierten PP-Folien (Enzym-Varianten: rPK; rPK-CT-His120; rMicNuc). Die Aktivität nach Immobilisierung im Überstand (Ü nach Immo.) und die Aktivitätsdifferenz sowie die gemessene Aktivität auf dem Träger ( $n=3$ ) sind bezogen auf die Gesamtinitialaktivität vor Immobilisierung (Ü vor Immo.). PP: Polypropylenfolie unmodifiziert; PP<sub>epoxid</sub>: PP-Folie mittels Plasmabehandlung mit EPMA beschichtet; PP<sub>Ni-NTA</sub>: epoxidierte PP-Folie mit  $N\alpha,N\alpha$ -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin und Nickelsulfat behandelt. **(A)**: Bilanz der Immobilisierung von rPK und rPK-CT-His120 in Prozent mit empirisch ermittelter Proteaseaktivität pro Gesamtfläche  $100\text{ cm}^2$  ( $n=3$ ). **(B)**: Bilanz der Immobilisierung von rMicNuc in Prozent mit empirisch ermittelter Nukleaseaktivität pro Gesamtfläche  $100\text{ cm}^2$  ( $n=3$ ).  $1\text{ mU} \pm 0,01\text{ mU/cm}^2$ .

In Abbildung 3-26 (A) ist der Vergleich zwischen ungerichteter und zielgerichteter Immobilisierung von rPK an PP-Folien dargestellt. Nach der Modifikation der Folien mit Ni-NTA konnte rPK-CT-His120 mit einer Immobilisierungsausbeute von 99 % gekoppelt werden. Demgegenüber standen 18 % (PP<sub>epoxid</sub>) und 53 % (PP). Wie in den Ergebnissen zur Immobilisierung an porösen Trägern besteht deutliche Diskrepanz zwischen Aktivitätsdifferenz und der tatsächlich messbaren Aktivität auf der Oberfläche. Die Immobilisierungseffizienz von rPK an Ni-NTA-PP lag bei 0,4 %, bei PP 0,2 % und für PP<sub>epoxid</sub> bei 2,1 %. Zusammenfassend konnte im Fall PP-Folie mit Ni-NTA die höchste rPK-Aktivität am Träger mit  $0,4\text{ mU/cm}^2$  gemessen werden. Für die ungerichtete Immobilisierung konnten  $0,3\text{ mU/cm}^2$  an epoxidierten Folien und nur  $0,1\text{ mU/cm}^2$  bei unbehandelten Folien gemessen werden. Die Aktivitätsausbeute von Ni-NTA und epoxidierte PP-Folie waren mit 0,4 % gleich, an PP betrug sie 0,1 %.

In Abbildung 3-26 (B) ist die ungerichtete und zielgerichtete Immobilisierung der rMicNuc-Variante gezeigt. Im Gegensatz zur rPK wurde an der Ni-NTA-Folie die geringste

Immobilisierungsausbeute von 87 % bestimmt. Während an der unmodifizierten Folie 97 % und an der epoxidierten Folie 99 % gemessen wurden. Bei der Messung der Nukleaseaktivität auf den Folien zeigte sich, dass ausschließlich auf der Ni-NTA-Folie eine Aktivität messbar war. Die Immobilisierungseffizienz bzw. Aktivitätsausbeute betrug bei unmodifizierter und epoxidierte PP-Folie 0 %. Im Fall Ni-NTA-PP betrug beide Größen etwa 0,1 % und die Trägeraktivität lag bei  $0,08 \text{ mU/cm}^2$ . Eine Gesamtübersicht aller Immobilisierungsparameter ist in Kapitel 4.2.1 in Tabelle 3-5 gezeigt.

Im Fall der rPK immobilisierten Folien wurde zusätzlich eine Untersuchung der Aktivität am Träger über die Zeit durchgeführt. Dazu wurden die enzymbeschichteten PP-Folien bis zu 64 Tage nach Immobilisierung auf proteolytische Aktivität getestet. In Abbildung 3-27 sind die Aktivitäten in  $\text{mU/cm}^2$  dargestellt.

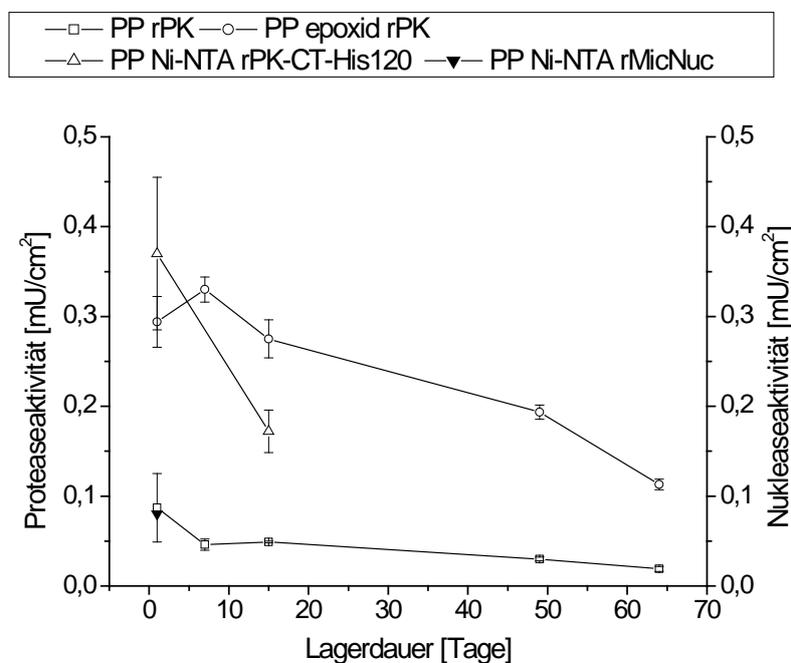


Abbildung 3-27: Aktivität aus der gerichteten und ungerichteten Immobilisierung ausgewählter Enzyme an PP-Folien bis zu 64 Tagen nach Lagerung bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $20 \text{ mM KPP pH } 7$  bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . PP: Polypropylenfolie unmodifiziert;  $\text{PP}_{\text{epoxid}}$ : PP-Folie mittels Plasmabehandlung mit EPMA beschichtet;  $\text{PP}_{\text{Ni-NTA}}$ : epoxidierte PP-Folie mit  $\text{N}\alpha,\text{N}\alpha$ -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin und Nickelsulfat behandelt. Aktivität in  $\text{mU/cm}^2$  ( $n=3$ ). PP rMicNuc und  $\text{PP}_{\text{epoxid}}$  rMicNuc sind nicht gezeigt, da keine Aktivität messbar. Die jeweils zuletzt gemessene Aktivität, stellt die Ausgangsaktivität im Bioassay dar.

Bei rPK-Kopplung an  $\text{PP}_{\text{Ni-NTA}}$ -Folie sank die Aktivität im Durchschnitt um 50 % nach 15 Tagen, während an der  $\text{PP}_{\text{epoxid}}$ -Folie die Aktivität über 15 Tage stabil war und nach 64 Tagen 60 % an Aktivität verlor. Im Fall der unmodifizierten PP-Folie sank die Aktivität innerhalb von 64 Tagen nur um 20 %, war allerdings im direkten Vergleich die geringste

Aktivität. Die Aktivität der rMicNuc an der PP-Folie Ni-NTA wurde nicht über die Zeit untersucht, da diese Folie direkt im Bioassay eingesetzt und als Vergleichsenzym verwendet wurde. Für die enzymbeschichteten Folien wurde die jeweils zuletzt gemessene Trägeraktivität zur Ausgangsaktivität im Bioassay.

Auch die Möglichkeit der Wiederbeladung einer Ni-NTA beschichteten PP-Folie mit Enzym (rPK-CT-His120) wurde untersucht. Dazu wurde eine mittels IMAC gereinigte Enzymlösung der rPK-CT-His120 mittels PD10-Säule (Kapitel 2.24.3) in Immobilisierungspuffer-PK (Tabelle 2-4) überführt und auf eine Startaktivität von 4 U/mL (Kapitel 2.20.2.3) eingestellt. Die Immobilisierung einer PP-Folie mit Ni-NTA erfolgte analog zu Kapitel 2.29.1, mit dem Unterschied, dass der Puffer KPP durch Immobilisierungspuffer-PK ersetzt wurde. Die Inkubation mit 10 mL einer 4 U/mL Enzymlösung erfolgte in vier Zyklen (18 h). Auf den 24-stündigen Blockschritt mit 2-Mercaptoethanol, welcher für die epoxidierte PP-Folie nötig ist, wurde verzichtet. Nach der Waschphase wurde die Proteaseaktivität auf der PP-Folie bestimmt (Kapitel 2.20.2.5). Im Anschluss erfolgte die Elution der rPK-CT-His120 durch *strippen* der Nickelionen von der PP-Folie. Dazu wurde die beschichtete PP-Folie für 30 min bei 23 °C, 19 RPM (Rollermixer) mit 10 mL *Stripping*-Puffer inkubiert (Tabelle 2-4) und anschließend dreimal mit 10 mL VE-H<sub>2</sub>O gespült. Die Aktivität auf der Folie wurde erneut bestimmt. Vor erneuter Beladung mit Enzymlösung rPK-CT-His120 wurde die zuvor gestrippte PP-NTA-Folie wieder mit jeweils 10 mL 0,1 M Nickelsulfat bei 23 °C für 30 min 19 RPM (Rollermixer) in Hybridisierungsflaschen inkubiert und zweimal mit je 10 mL VE-H<sub>2</sub>O gewaschen. Der Zyklus beginnt erneut mit der Enzymbeladung und wurde viermal durchgeführt. In Abbildung 3-28 sind die Aktivitäten von rPK-CT-His120 auf der behandelten PP<sub>Ni-NTA</sub>-Folie gezeigt. Im Zuge der ersten Immobilisierung konnte die höchste Aktivität mit ca. 0,4 mU/cm<sup>2</sup> gemessen werden. Das entspricht der Aktivität aus der Immobilisierung der rPK-CT-His120 an Ni-NTA modifizierter PP-Folie in Abbildung 3-26 (A). Nach dem *stripping* der Nickelionen bleibt eine Aktivität von 0,1 mU/cm<sup>2</sup> oder weniger erhalten. Durch die Enzymneubeladung konnte die Aktivität am Träger wieder verdoppelt bis verdreifacht werden. Die Höhe der Ausgangsaktivität konnte dabei nicht wieder hergestellt werden und sinkt mit jedem Zyklus aus Enzymneubeladung und *stripping* der Ionen um etwa 25 %. Durch den Einsatz von mehr Enzym in der Immobilisierungsreaktion an modifizierter PP-Folie, also 4 U/mL statt der ursprünglichen 1 U/mL Startaktivität vor Immobilisierung, konnte keine Erhöhung der trägergebundenen Aktivität gemessen werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine wiederholte Beladung mit rPK-CT-His120 an PP-Folie mit NTA-Beschichtung möglich ist, jedoch mit jedem Zyklus die trägergebundene Aktivität sinkt.

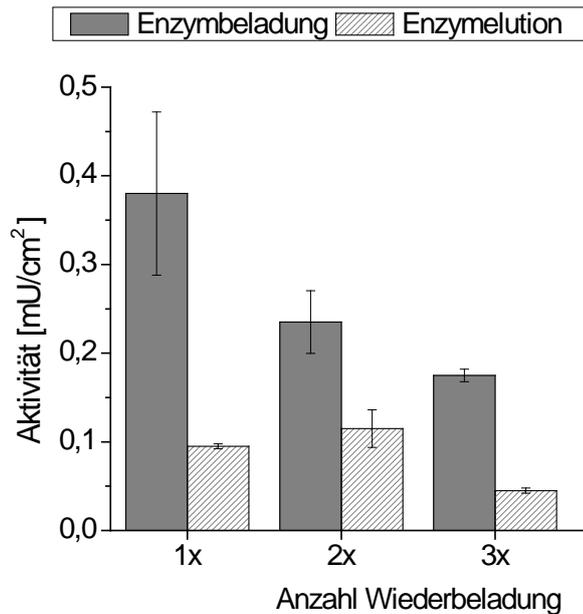


Abbildung 3-28: Wiederholter Einsatz von rPK-CT-His120 für die Kopplung an eine PP<sub>Ni-NTA</sub>-Folie. Die trägergebundene Aktivität (n=3) nach vier Zyklen von Enzymwiederbeladung und Elution wurde untersucht. Enzymelution: Ablösen der Nickel-Ionen durch Inkubation in Stripping-Puffer für 30 min bei 23 °C, 19 RPM (Rollermixer). Enzymwiederbeladung: 10 mL 0,1 M Nickelsulfat bei 23 °C für 30 min, 19 RPM (Rollermixer) und Beladen der PP<sub>Ni-NTA</sub> mit ca. 40 U rPK-CT-His120 für 18 h bei 23 °C.

### 3.2.4 Zusammenfassung Kapitel 3.2

Die rPK-CT-His120 konnte erfolgreich über einen 3xHis-tag an den porösen Träger Ni-Sepharose gekoppelt werden. 83 % (35 U) der Initialaktivität wurden immobilisiert. Die Aktivität auf dem Träger wies nur 9 U pro g Ni-Sepharose auf, d.h. nur etwa 26 % der immobilisierten Aktivität konnten tatsächlich gemessen werden. Im Fall der rPK, die keinen His-tag trägt, war eine Immobilisierung an Ni-Sepharose nicht möglich. Nur 2 U (0,6 %) der ursprünglich eingesetzten 360 U bei der rPK fehlten im Überstand nach Immobilisierung und Waschschrift. Bei einer vorab gemessenen spezifischen rPK-Aktivität von 360 U/mg, entspricht dies 5,6 µg rPK/ g Ni-Sepharose. Diese Enzymmenge konnte weder vom Träger eluiert, noch als Aktivität am Träger gemessen werden (Abbildung 3-22(A)).

Eine wiederholte Immobilisierung der rPK an ATS war weder mit DTT Reduktion (fünf native Cysteine) noch ohne Reduktion (C73) möglich. Es konnten zwar 12-14 % gekoppelt, aber nur 1-2 % wieder eluiert werden. Da die nicht reduzierte rPK eine spezifische Aktivität von 416 U/mg und die reduzierte rPK 380 U/mg besaß, konnten zwar 0,2 mg (89 U) der nicht reduzierten rPK und 0,28 mg (108 U) der reduzierte rPK immobilisiert werden, jedoch die Aktivität am Träger wies in beiden Fällen nur 2 U pro g ATS auf. Eine zielgerichtete Immobilisierung über die nativen Cysteine der rPK für wiederholte Anwendungen war daher nicht erfolgreich (Abbildung 3-23 (A)).

Besonders die über Komplexbildung immobilisierte rPK-CT-His120 an Ni-Sepharose zeigte eine sehr hohe Lagerstabilität. Nach sechs Monaten bei 4 °C konnte kein Aktivitätsverlust verzeichnet werden. Bei der adsorptiv gekoppelten rPK an Ni-Sepharose war ein Aktivitätsverlust von 35 % nach sechs Monaten bei 4 °C Lagertemperatur zu verzeichnen. Auch die Aktivität der an ATS unspezifisch immobilisierten rPK sank innerhalb von acht Monaten um 30-40 % bei einer Lagerung bei 4 °C (Abbildung 3-24). Die rPK-CT-His120 trägergebundene Aktivität erwies sich nach einer sechsfachen Substratbeladung als sehr stabil, nur um rund 10 % sank die Trägeraktivität (Abbildung 3-25 (B)).

Ebenso wie die rPK-CT-His120 konnte auch die rMicNuc erfolgreich an Ni-Sepharose immobilisiert werden. Beispielfhaft wurde sowohl rMicNuc als auch die Cys-Dreifach-Variante verwendet (Abbildung 3-22 (B)). In beiden Fällen wurde 100 % Immobilisierungsausbeute bestimmt (2,17 mg (1089 U) rMicNuc - und 1,3 mg (612 U) Cys-Dreifach-Variante pro Gramm Ni-Sepharose). Davon konnten rund 82 % wieder eluiert werden. Die spezifische Aktivität nach der DTT Reduktion lag für rMicNuc bei 502 U/mg und für Cys-Dreifach-Variante bei 469 U/mg (Abbildung 3-7 (A)). Einzig die trägergebundene Nukleaseaktivität war sehr gering. Ähnlich verhält es sich mit der Immobilisierung der rMicNuc-Cystein-Varianten an ATS (Abbildung 3-23 (B)). Während die Immobilisierungsausbeute zwischen 94 % (Cys-Einfach-Variante) und 99 % (Cys-Zweifach- und Cys-Dreifach-Variante) lag, von der rund 90 % wieder eluierbar waren, ließen sich nur knapp 1 % der gekoppelten Aktivität am Träger messen. Im Fall des rMicNuc war eine zielgerichtete Immobilisierung an ATS nicht möglich. Nur <1 % (2 U) Immobilisierungsausbeute konnten am Träger gebunden werden. Hierbei scheint es sich um eine unspezifische Adsorption zu handeln. Insgesamt konnten folgende rMicNuc-Mengen pro Gramm ATS immobilisiert werden: rMicNuc: 0,4 µg; Cys-Einfach-Variante: 2,2 mg; Cys-Zweifach-Variante: 1,4 mg; Cys-Dreifach-Variante: 1,2 mg.

Die Lagerstabilität der rMicNuc zeigte 86 % Restaktivität nach acht Monaten bei einer zielgerichteten Immobilisierung an Ni-Sepharose. Die Aktivität der rMicNuc Cys-Einfach-Variante und Cys-Zweifach-Variante hatte sogar über die Zeit zugenommen. Bei der Cys-Dreifach-Variante kam es während der Lagerung bei 4 °C zu einem Aktivitätsverlust, welcher nach acht Monaten rund 44 % betrug. Auch am Beispiel der an ATS immobilisierten Cys-Einfach-Variante zeigte sich, dass eine sechsmalige Substratbeladung nicht zum Aktivitätsverlust führte (Abbildung 3-24). Tabelle 3-5 zeigt eine Übersicht aller in der vorliegenden Arbeit immobilisierten Enzyme mit den entsprechenden Ergebnissen.

Tabelle 3-5: Übersicht aller Immobilisierungsparameter von rPK-Varianten und rMicNuc-Varianten an porösen Trägern (Tabelle oben) und an PP-Folien (Tabelle unten). Einfach= Cys-Einfach-Variante, Zweifach= Cys-Zweifach-Variante, Dreifach= Cys-Dreifach-Variante. n/a= not available

<b>Ni-Sepharose</b>					<b>ATS</b>				
	Immobilisierungs- ausbeute [%]	Immobilisierungs- effizienz [%]	Aktivitäts- ausbeute [%]	Elutions- effizienz [%]		Immobilisierungs- ausbeute [%]	Immobilisierungs- effizienz [%]	Aktivitäts- ausbeute [%]	Elutions- effizienz [%]
rPK	0,5	0	0	0	rPK (ohne Reduktion)	12	2,2	0,3	1
rPK-CT- His120	83	26	21	97	rPK (mit Reduktion)	14	1,9	0,3	2
rMicNuc	100	0,5	0,5	82	rMicNuc	0,2	0,9	0,9	100
rMicNuc- Einfach	n/a	n/a	n/a	n/a	rMicNuc- Einfach	94	0,9	0,8	100
rMicNuc- Zweifach	n/a	n/a	n/a	n/a	rMicNuc- Zweifach	99	1,2	1,2	88
rMicNuc- Dreifach	100	0,7	0,7	82	rMicNuc- Dreifach	99	1,2	1,2	90
<b>PP</b>				<b>PP<sub>epoxid</sub></b>			<b>PP<sub>Ni-NTA</sub></b>		
	Immobilisierungs- ausbeute [%]	Immobilisierungs- effizienz [%]	Aktivitäts- ausbeute [%]	Immobilisierungs- ausbeute [%]	Immobilisierungs- effizienz [%]	Aktivitäts- ausbeute [%]	Immobilisierungs- ausbeute [%]	Immobilisierungs- effizienz [%]	Aktivitäts- ausbeute [%]
rPK	53	0,2	0,1	18	2,1	0,4	n/a	n/a	n/a
rPK-CT- His120	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	99	0,4	0,4
rMicNuc	97	0	0	99	0	0	87	0,1	0,1

Weiter wurde PP zur Enzymimmobilisierung unmodifiziert, mit Epoxidgruppen beschichtet und mit Ni-NTA-Linker versehen, eingesetzt (Abbildung 3-26 (A)). Die beste Immobilisierungsausbeute konnte im Fall der zielgerichtet immobilisierten rPK-CT-His120 erzielt werden. 99 % (9,4 U) der Initialaktivität konnte an PP<sub>Ni-NTA</sub> immobilisiert werden. Bei einer spezifischen Aktivität von rund 409 U/mg (rPK-CT-His120) entspricht das einer Proteinmenge von 0,23 µg/cm<sup>2</sup>. Dem gegenüber steht die adsorptive Kopplung der rPK an unmodifiziertes PP mit 0,1 µg/cm<sup>2</sup> und rPK immobilisiert an PP<sub>epoxid</sub> mit 0,03 µg/cm<sup>2</sup>. Die höchste trägergebundene Aktivität konnte bei der rPK-CT-His120 mit 0,4 mU/cm<sup>2</sup> an PP<sub>Ni-NTA</sub> gemessen werden, gefolgt von 0,3 mU/cm<sup>2</sup> rPK an PP<sub>epoxid</sub> und 0,1 mU/cm<sup>2</sup> an PP, bei einer spezifischen Aktivität von rund 430 U/mg für rPK. Prozentual entspricht das einer Aktivitätsausbeute von 0,1-0,4 %. Tabelle 3-5 zeigt eine Übersicht aller Ergebnisse enzymgekoppelten PP-Folien aus der vorliegenden Arbeit.

Im Hinblick auf die Lagerstabilität von rPK immobilisiert an PP scheint die Kopplung via Komplexbildung schlechter als die Kopplung über Epoxidgruppen oder Adsorption gewesen zu sein. Während rPK-CT-His120 an PP<sub>Ni-NTA</sub> bereits nach 15 Tagen 50 % der Trägeraktivität verlor, dauerte es an PP<sub>epoxid</sub> 60 Tage für 50 % Verlust (Abbildung 3-27). Der wiederholte Einsatz der His-tag versehenen rPK-CT-His120 an PP<sub>Ni-NTA</sub> ist prinzipiell möglich. Jedoch sank mit jeder Wiederbeladung letztlich die trägergebundene rPK-Aktivität um durchschnittlich 25 % (Abbildung 3-28).

Für die ungerichtete und zielgerichtete Immobilisierung von rMicNuc an PP-Folien, konnte bei allen Kopplungsmethoden 0,2 µg/cm<sup>2</sup> (10 U) immobilisiert werden (spezifische Aktivität rMicNuc ~456 U/mg). Ausschließlich in der zielgerichteten Immobilisierung via Komplexbildung konnte eine trägergebundene Aktivität von 0,08 mU/cm<sup>2</sup> gemessen werden.

Nachdem mit rPK und rMicNuc beschichtete PP-Folien Enzymaktivitäten aufwiesen, sollte der Einfluss auf die Anheftung bzw. die EPS-Bildung, anhand von *Pseudomonas fluorescens* Kulturen an den PP-Folien untersucht werden.

### 3.3 Untersuchungen zur Biofilmprävention

#### 3.3.1 Auswirkung der Kultivierungsbedingungen auf die enzymatische Aktivität von rPK-CT-His120 und rMicNuc

Um zu gewährleisten, dass immobilisierte PK und MicNuc während der Biofilmbildung von *Pseudomonas fluorescens* an PP-Folien auch enzymatisch aktiv sind, wurde die volumetrische Aktivität beispielhaft von rPK-CT-His120 und rMicNuc unter den Bedingungen der Kultivierung von *Pseudomonas fluorescens*-Zellen untersucht (Kapitel 2.30.1). Für die

Anzucht von *Pseudomonas fluorescens* wurde das Minimalmedium nach Brunner verwendet (MMB) [Brunner *et al.*, 1980], wie es auch von der DSMZ empfohlen wird (DSMZ Nr.457). MMB enthält eine Vielzahl von Spurenelementen, welche die enzymatische Aktivität der Enzyme beeinflussen könnten (Tabelle 2-4). Außerdem wird die Kultivierung der Pseudomonaden und somit der Bioassay bei 21 °C und nicht wie im Aktivitätsassay an PP-Folien bei 23 °C (RT) oder in Lösung bei 25 °C durchgeführt. Als Kohlenstoffquelle wurde dem Medium 1 mg/mL Glucose zugegeben.

Abbildung 3-29 zeigt den Einfluss des MMB sowie der Temperatursenkung von 25 °C auf 21 °C auf die Enzymaktivität von rPK-CT-His120 und rMicNuc. Am Beispiel rPK-CT-His120, kam es zu einem geringen Absinken der Proteaseaktivität um etwa 10 %, was eher vom Temperatur-*shift* als vom Medium verursacht wurde. Bei der rMicNuc sank die Aktivität um 20 % nach dem Absenken der Temperatur im Assay auf 21 °C. In Gegenwart des MMB verlor die rMicNuc sogar 80 % an Aktivität. Diese Erkenntnisse sind maßgebend für die Interpretation der Bioassay-Ergebnisse im Folgenden.

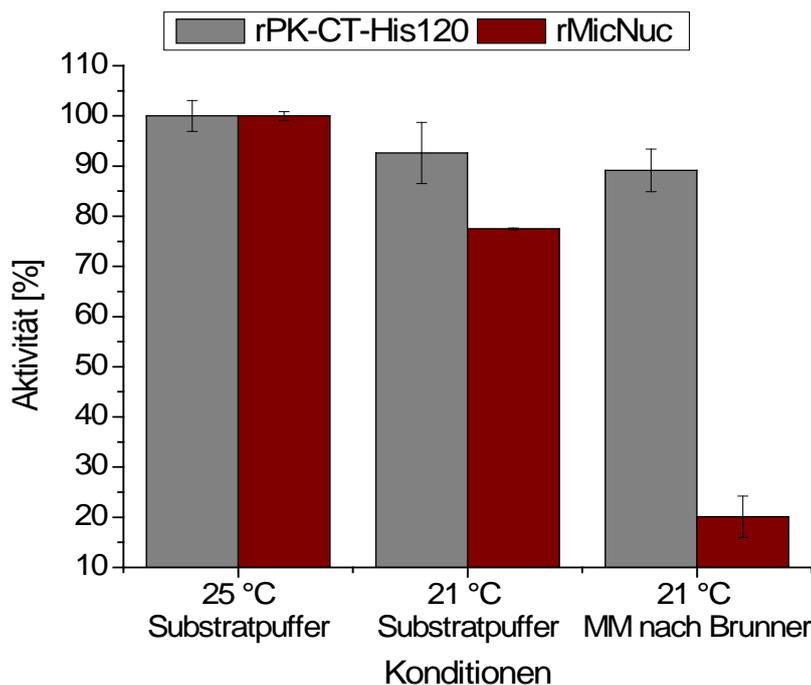


Abbildung 3-29: Untersuchung zum Einfluss von Temperatur und des für die Kultivierung von *Pseudomonas fluorescens* verwendeten Medium/Puffer auf die Enzymaktivität von rPK-CT-His120 und rMicNuc. Substratpuffer für rPK-CT-His120: 50 mM Tris/HCl pH 8,0; Substratpuffer für rMicNuc: 25 mM Tris/HCL, 10 mM CaCl pH 7,5; Volumetrische Aktivität beider Enzyme in Prozent dargestellt (n=3).

### 3.3.2 Einfluss auf die Biofilmbildung von *Pseudomonas fluorescens*

Im Folgenden wurde der Einfluss der immobilisierten Enzyme auf die Biofilmbildung von Mikroorganismen untersucht. Die positive Wirkung von hydrolytischen Enzymen auf den Biofilmbau oder auf ein Vermindern vom Biofilmaufbau ist für viele Organismen bekannt [Cao *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2014; Kristensen *et al.*, 2008]. Dabei ist entscheidend aus welchen Hauptbestandteilen die EPS der jeweiligen Organismen aufgebaut ist, um Enzyme auswählen zu können, die eine Wirkung auf die EPS-Integrität und somit den Biofilmbau besitzen [Liu *et al.*, 2004; Xavier *et al.*, 2005]. Wie zuvor beschrieben, besteht die EPS hauptsächlich aus Biopolymeren wie z.B. Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden [Flemming und Wingender, 2010]. Die EPS besitzt eine Schlüsselfunktion bei der primären bakteriellen Adhäsion und ist für die Biofilmmaturation essentiell [Kristensen *et al.*, 2008]. Nach Karunakaran *et al.* stellen Proteine die Hauptkomponente von bakterieller EPS dar [Karunakaran und Biggs, 2011]. Die Wahl der Enzyme steht somit im direkten Verhältnis zur Wahl der Mikroorganismen. Im Fall von *Pseudomonas putida* beträgt der Proteingehalt der EPS 75 % [Jahn *et al.*, 1999], während beim Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa* der Hauptanteil der EPS aus 40 % Polysacchariden (BTM) besteht [Chang und Gray, 2003]. Auch bei *Pseudomonas fluorescens* besteht die EPS hauptsächlich aus Proteinen [Molobela, 2010; Simoes *et al.*, 2003].

Aus diesem Grund wurde *Pseudomonas fluorescens* als Versuchsorganismus ausgewählt, um den Einfluss auf die Biofilmbildung anhand von PP-Folien mit immobilisierter rekombinanter PK zu untersuchen. Zudem ist bekannt das *Pseudomonas fluorescens*, ähnlich wie *Pseudomonas aeruginosa*, ein guter Biofilmbildner ist, aber zur biologischen Sicherheitsstufe S1 zählt und somit zu den nicht-pathogenen Bakterien gehört.

Die Nukleaseaktivität auf der PP<sub>NI-NTA</sub>-Folie war zwar sehr gering und durch das MMB vermutlich weiter gemindert (Abbildung 3-29), dennoch wurde rMicNuc als Vergleichskontrolle zur PK-Beschichtung mitgeführt. Derzeit sind keine Untersuchungen zur Nukleasewirkung auf Biofilme von *Pseudomonas fluorescens* bekannt. Auch die Wirkung von PK auf die Biofilmbildung von *Pseudomonas fluorescens* ist bislang nicht gezeigt.

Die verschieden modifizierten PP-Folien (Kapitel 3.2.3) wurden sowohl mit Enzymbeschichtung als auch ohne Enzymbeschichtung (Negativkontrolle) in einem Bioassay untersucht. Dazu wurden die PP-Folien in einer *Pseudomonas fluorescens*-Kultur inkubiert (Kapitel 2.30.2).

In Tabelle 3-6 ist die OD<sub>600</sub> der Pseudomonadenkultur, sowie die KBE nach der Inkubation mit PP-Folien gezeigt. Die optische Dichte zeigte beim Vergleich von unmodifizierter PP-Folie zu den Anderen, ein sehr homogenes Bild, unabhängig von der Behandlung der PP-

Folien, ebenso wie die einhergehende koloniebildende Einheit (KBE). Eine Ausnahme stellte die mit rMicNuc beschichtete PP<sub>Ni-NTA</sub>-Folie dar, welche das Wachstum der Mikroorganismen begünstigte. Mit 82 KBE/mLx10<sup>3</sup> wich die Anzahl an Pseudomonaden von den durchschnittlich 50 KBE/mLx10<sup>3</sup> stark ab (Tabelle 3-6). Die PP-Folien, welche mit rPK behandelt wurden, zeigten keinen Einfluss auf das Wachstum der Mikroorganismen in Kultur. Beim Vergleich der unterschiedlich modifizierten PP-Folien, konnte ein positiver Effekt in Sachen Biofilmprevention an der plasmabehandelten Folie beobachtet werden, welche den geringsten Bedeckungsgrad aufweist. Eine weitere Behandlung der Folie mit Lysin-NTA und Nickelsulfat schien diesen Effekt wieder zu vermindern. Obwohl die Pseudomonadenkultur auf der Folie PP<sub>Ni-NTA</sub> ohne Enzym die geringste KBE aufwies, war der Bedeckungsgrad und somit die Adhäsion der Pseudomonaden am größten. Weiter dienten die Folien ohne Enzymbeschichtung nun als Negativkontrolle im Gegensatz zur Wirkung aktiv immobilisierter rPK-CT-His120. In Abbildung 3-30 (A) ist der Einfluss der immobilisierten rekombinanten PK-Varianten auf die Bedeckung der PP-Folie mit *Pseudomonas fluorescens* dargestellt. Das Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen zeigte ähnliche Relationen. Im Fall der stark hydrophoben unmodifizierten PP-Folie und der PP<sub>Ni-NTA</sub>, konnte eine leichte Verbesserung (~16 %) durch Immobilisierung mit rPK erzielt werden. Im Fall der PP<sub>Ni-NTA</sub>-Folien scheint der Effekt größer als bei den unmodifizierten PP-Folien gewesen zu sein (~25 %). Dies könnte durch die höhere Trägeraktivität und gerichtete Enzymimmobilisierung erklärt werden. Dabei war das Ergebnis eher tendenziell als signifikant. In einer einfaktoriellen Varianzanalyse wurde ein F-Wert von 3,4 und ein P-Wert von 0,13 ermittelt, beide Werte ließen nicht auf eine Signifikanz schließen. Dennoch schien die rPK-Immobilisierung einen inhibierenden Effekt auf die Anheftung der Pseudomonaden zu besitzen.

Im Fall der plasmabehandelten Folie konnte der bereits positive inhibitorische Effekt durch eine rPK-Immobilisierung nicht verbessert werden, sondern erhöhte die bakterielle Anheftung. Beim Vergleich der Ni-NTA behandelten Folie mit einer rPK-Immobilisierung zur rMicNuc-Immobilisierung, ist der negative Effekt durch rMicNuc-Kopplung zu erkennen (Abbildung 3-30, (B)). Der Standardfehler bezogen auf den Bedeckungsgrad der rMicNuc beschichteten Folien war sehr groß, doch die Tendenz war eindeutig. Während bei der rPK-CT-His120 die Besiedlung durch Pseudomonaden leicht rückläufig war, stieg der Bedeckungsgrad bei Immobilisierung mit rMicNuc von maximal 1 % (PP<sub>Ni-NTA</sub>) auf bis zu 6 % (PP<sub>Ni-NTA</sub> und rMicNuc). Als visueller Vergleich sind im Anhang 8.2 alle CLSM-Aufnahmen, sowohl der nicht enzymbeschichteten als auch der PP-Folien, die mit rPK und rMicNuc beschichtet wurden, gezeigt.

Tabelle 3-6: Übersicht der verwendeten PP-Folien für den Bioassay zur Biofilmbildung von *Pseudomonas fluorescens* und deren Messwerte (n=3). Enzymaktivität beschreibt die Trägeraktivität vor der Bakterieninkubation (Protease- und Nukleaseaktivität). OD<sub>600</sub> gemessen nach 24 h Inkubation bei 21 °C, 180 RPM (Orbitalshaker PSU-10i). KBE/mL= 6,278 x 10<sup>8</sup> x OD<sub>600</sub> -859380 [Richter, 2012]. Bedeckungsgrad zeigt Gesamtzahl aus Viabilitätsfärbung, lebend und tot (L/T).

PP-Folie mit Modifikation	Immobilisiertes Enzym	Enzym-aktivität [mU/cm <sup>2</sup> ]	OD <sub>600</sub>	KBE/mLx10 <sup>3</sup>	Bedeckungsgrad L/T [%]
unmodifiziert	ohne Enzym	0	0,08	50	0,74
epoxid	ohne Enzym	0	0,08	50	0,62
Ni-NTA	ohne Enzym	0	0,07	43	0,93
unmodifiziert	rPK	0,03	0,08	50	0,62
epoxid	rPK	0,1	0,08	50	0,88
Ni-NTA	rPK-CT-His120	0,2	0,08	50	0,70
Ni-NTA	rMicNuc	0,08	0,13	82	3,63

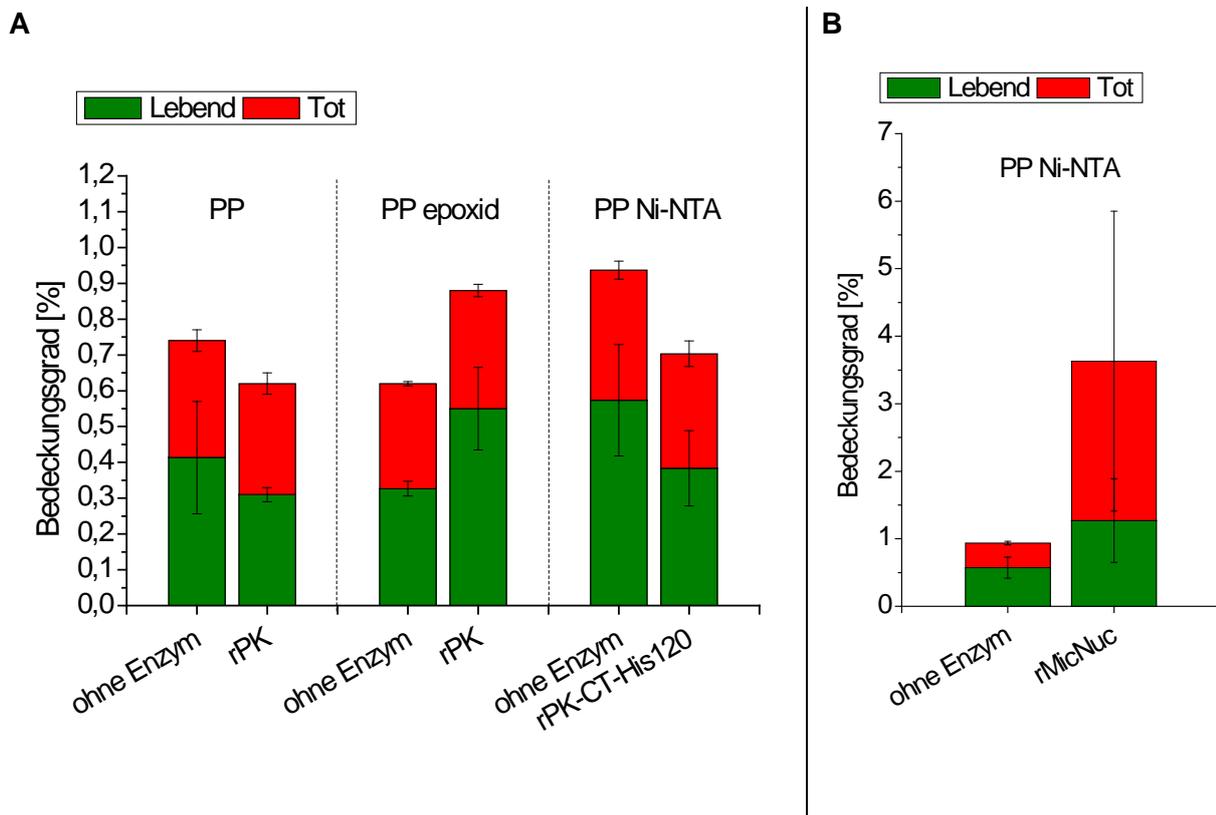


Abbildung 3-30: Einfluss der Enzymimmobilisierung auf die Biofilmbildung/Adhäsion von *Pseudomonas fluorescens* auf PP-Folien mit und ohne Enzymbeschichtung, gemessen am Bedeckungsgrad nach Lebend- und Tothfärbung. **(A)**: Bedeckungsgrad modifizierter PP-Folien mit und ohne rPK Immobilisierung (n=3). **(B)**: Bedeckungsgrad von PP<sub>Ni-NTA</sub> mit und ohne rMicNuc Immobilisierung als Referenz (n=3). Gesamtzellfärbung mit Syto® 9 und separate Tothfärbung mit Propidiumiodid. PP: Polypropylenfolie unmodifiziert; PP<sub>epoxid</sub>: PP-Folie mittels Plasmabehandlung mit EPMA beschichtet; PP<sub>Ni-NTA</sub>: epoxidierte PP-Folie mit Na<sub>2</sub>Nα-Bis(carboxymethyl)-L-Lysin und Nickelsulfat behandelt.

Beim Vergleich der CLSM-Aufnahmen von PP-Folien ohne Enzymbehandlung mit denen, die mit Enzym beschichtet wurden, war eine unterschiedliche Bedeckungsart zu erkennen. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 3-31 vergrößerte Bildausschnitte der CLSM-Aufnahmen aus Kapitel 8.2 dargestellt.

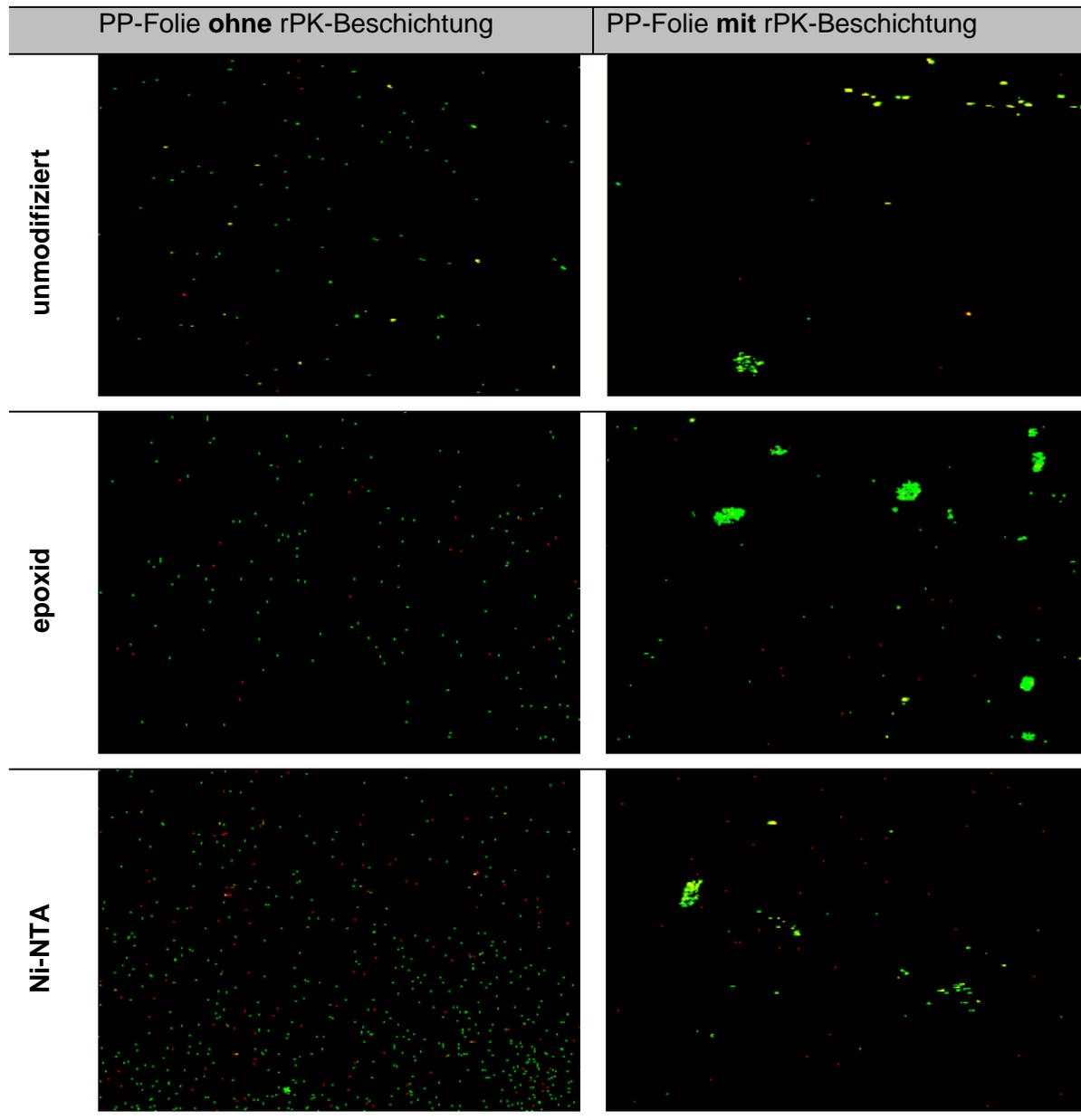


Abbildung 3-31: Ausschnitte einzelner CLSM-Aufnahmen ansiedelnder Zellen von *Pseudomonas fluorescens* zum Vergleich zwischen PP-Folien ohne rPK-Beschichtung (linke Spalte) und mit rPK-Beschichtung (rechte Spalte) im Hinblick auf die Bedeckungsart. Die Viabilitätsfärbung erfolgte mit Syto®9 (grün) und Propidiumiodid (rot). Ausgewählte Bildausschnitte aus Kapitel 8.2 sind dargestellt: unmodifiziert= Abbildung 8-1; Epoxid= Abbildung 8-2; Ni-NTA= Abbildung 8-3.

Während ohne Enzymbeschichtung die Pseudomonaden überwiegend einzeln vorlagen bzw. sich einzeln angesiedelt hatten, kam es mit Enzymbehandlung zur Bildung von Aggregaten oder Zellhaufen. Dieses Phänomen war generell bei allen Folien mit immobilisiertem Enzym zu beobachten, unabhängig wie diese vorher modifiziert wurden. Der Anteil an Einzelzellen nahm auf enzymbeschichteten Folien ab.

### 3.3.3 Zusammenfassung Kapitel 3.3

Es wurde gezeigt, dass die Beschichtung von rPK an PP-Folien einen Effekt auf die Besiedlung mit *Pseudomonas fluorescens* besitzt. Sowohl an der unmodifizierten PP-Folie als auch an PP<sub>Ni-NTA</sub> konnte ein verminderter Bedeckungsgrad nach rPK-Immobilisierung gemessen werden (Abbildung 3-30). An beiden PP-Folien konnte auch die höchste Enzymmenge immobilisiert werden. Für PP<sub>Ni-NTA</sub> konnte eine rPK-Menge von 0,23 µg/cm<sup>2</sup> (0,4 mU/cm<sup>2</sup>) und für unmodifiziertes PP von 0,095 µg/cm<sup>2</sup> (0,1 mU/cm<sup>2</sup>) gekoppelt werden (siehe Tabelle 4-5). Obwohl die trägergebundene Aktivität an epoxidierter PP-Folie, ähnlich der Aktivität an PP<sub>Ni-NTA</sub>, etwa 0,3 mU/cm<sup>2</sup> beträgt, war eine Verschlechterung des Bedeckungsgrads nach Enzymbeschichtung zu verzeichnen. Die Folie zeigte mit 0,03 µg/cm<sup>2</sup> die geringste immobilisierte rPK-Menge.

Eventuell scheint also die rPK-Menge einen positiven *Antifouling*-Effekt zu besitzen, unabhängig ob das Enzym aktiv ist oder nicht. Der Einfluss des MMB auf die rPK-Aktivität kann vernachlässigt werden, da diese maximal um 10 % sank (Abbildung 3-29).

Bei rMicNuc beschichteten PP-Folien stieg der Bedeckungsgrad im Bioassay drastisch von ca. 1 % auf bis zu 6 %. Dabei war die trägergebundene Nukleaseaktivität von 0,08 mU/cm<sup>2</sup> im MMB um weitere 80 % verringert und somit vermutlich zu gering um einen *Antifouling*-Effekt zu erzielen. Insgesamt konnten 0,2 µg/cm<sup>2</sup> rMicNuc an die PP<sub>Ni-NTA</sub>-Folie immobilisiert werden. Dies entspricht etwa soviel Enzym wie bei der rPK-CT-His120 Immobilisierung, zeigte aber keinen inhibierenden Effekt, sondern verbesserte die Anheftung mit *Pseudomonas fluorescens* an PP-Folie.

Weiter fällt auf, dass nach Enzymbeschichtung sich die Bedeckungsart änderte. Während die verschiedenen PP-Folien ohne Enzym Einzelzellanheftungen zeigten, kam es nach Enzymbeschichtung vermehrt zur Bildung von Zellhaufen (Abbildung 3-31). Diese zeigten oft gelbe *spots*, was bedeutet, dass sowohl tote als auch lebende Zellen übereinander lagen. Das Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen scheint sich nicht durch die rPK-Behandlung geändert zu haben. Im Fall der rMicNuc stieg dagegen die Anzahl der toten Zellen an.

## 4 Diskussion

### 4.1 Bereitstellung der Enzyme und deren Varianten zur gerichteten Immobilisierung

#### 4.1.1 Nuklease aus *Staphylococcus aureus*

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen aktive rMicNuc mit C-terminalem 6xHis-tag mittels T7-Promoter in *E. coli* BL21Gold (DE3) zu produzieren. Bis zu 40 % des Gesamtzellproteins bestand nach IPTG-Induktion aus dem 18,5 kDa großen Zielprotein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass eine *codon-usage* Anpassung nicht zwingend notwendig ist, um eine Verbesserung der Expression bzw. der Enzymausbeute hervorzurufen. Das verwendete MicNuc-Gen in den Arbeiten von Yuanhe *et al.* wurde nicht genoptimiert. Dennoch konnten auch hier rMicNuc-Ausbeuten mit 40 % des Gesamtzellprotein nachgewiesen werden. Damit wurde die Aussage von Jing *et al.* untermauert, dass eine *high-level* Expression in *E. coli* nicht zwingend durch eine hohe *codon-usage* Anpassung gewährleistet sein muss [Jing *et al.*, 1992].

Yuanhe *et al.* produzierten N-terminal 6xHis-getaggte rMicNuc mittels temperaturinduzierbaren  $P_R$ - und  $P_L$ -Promoter in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Die final gereinigte Enzymkonzentration lag bei nur 80 mg/L Bakterienkultur [Yuanhe *et al.*, 1997]. In der vorliegenden Arbeit konnte in nur einer IMAC-Passage eine rMicNuc-Proteinkonzentration von 250 mg/L Bakterienkultur gewonnen werden. Während die Proteinkonzentration nach chromatographischer Reinigung bei Shortle *et al.* nur 20 mg/L, Yuanhe *et al.* 80 mg/L und Jing *et al.* 90-120 mg/L betrug [Jing *et al.*, 1992; Shortle, 1986; Yuanhe *et al.*, 1997]. Die Proteinreinheit wurde auf >95 % bestimmt und entspricht der bei Yuanhe *et al.* Der Vergleich zwischen chromatographisch aufgereinigter Proben aus der vorliegenden Arbeit und von Yuanhe *et al.* ist in Abbildung 4-1 (A) Bahn 4 und (B) Bahn 4 dargestellt.

Nach nur einer Passage IMAC-Aufreinigung waren im SDS-PAGE-Gel weniger proteinogene Verunreinigung als bei Yuanhe *et al.* zu erkennen. Beim Vergleich der Bahnen 3 aus Abbildung 4-1 (A) und (B) ist zu erkennen, dass in der vorliegenden Arbeit bereits nach 4 h Inkubation nach Induktion eine ähnliche Menge rMicNuc exprimiert wurde, wie nach 5 h Inkubation bei Yuanhe *et al.* (6xHis-MicNuc R).

Rekombinante Nuklease A wurde bereits in BL21 (DE3)-Zellen mithilfe eines T7-Promoters ohne Peptid-tag hergestellt, gemessen am SDS-PAGE Gel, war die exprimierte Enzymmenge weit geringer als in der vorliegenden Arbeit (Abbildung 4-1 (C) Bahn 6) [Tang *et al.*, 2008] oder wurde nicht erwähnt [Ye *et al.*, 2000].

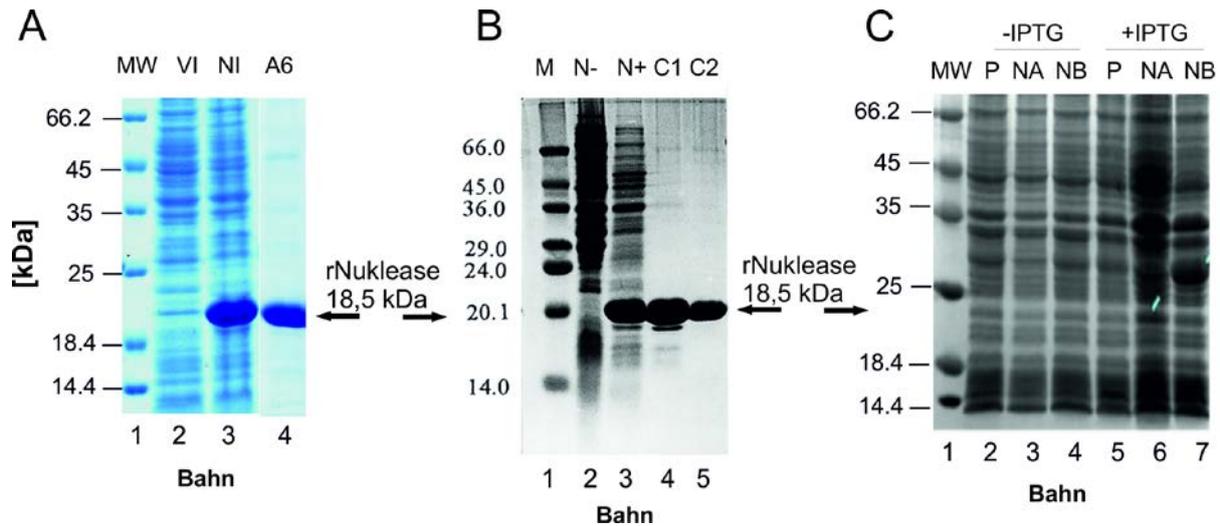


Abbildung 4-1: Vergleich Nuklease-Expressionen aus *E. coli*. **(A)**: SDS-PAGE Gel (Coomassie-Färbung) aus Proben der Schüttelkolbenexpression und IMAC von *E. coli* BL21Gold (DE3)/ pET20b-MicNuc (R)-6xHis. Bahn 1: MW-Marker; Bahn 2: 1/OD-Probe vor IPTG-Induktion; Bahn 3: 1/OD-Probe nach 4 h IPTG-Induktion; Bahn 4: IMAC 1- Elutionsfraktion A6. **(B)**: SDS-PAGE Gel (Coomassie-Färbung) aus Schüttelkolbenexpression von *E. coli* DH5a/pBVS-3 (6xHis-Nuklease R) und 2x IMAC [Yuanhe *et al.*, 1997]. Bahn 1: Marker; Bahn 2: Totalproteinextrakt *E. coli* ohne MicNuc-Gen (N-); Bahn 3: Totalproteinextrakt *E. coli* mit MicNuc-Gen nach 5 h Induktion (N+); Bahn 4: Reinheit aus erster IMAC-Aufreinigung (C1); Bahn 5: Reinheit aus zweiter IMAC-Aufreinigung (C2). **(C)**: SDS-PAGE Gel (Coomassie-Färbung) aus Schüttelkolbenexpression von *E. coli* BL21 (DE3)/pET17 ohne Nuklease-Gen (P); *E. coli* BL21 (DE3)/pET17nuc2 mit Nuklease A-Gen (NA); *E. coli* BL21 (DE3)/pET17nuc1 mit Nuklease B-Gen (NB) [Tang *et al.*, 2008]. Bahn 1: MW-Marker; Bahn 6: Expression Nuklease A nach IPTG-Induktion (siehe Pfeil).

Die tatsächliche Laufhöhe der rMicNuc-Proteinbande lag im SDS-PAGE Gel bei 20-22 kDa anstatt der erwarteten theoretischen 18,5 kDa. Dies wurde bereits durch Tang und Yuanhe beobachtet [Tang *et al.*, 2008; Yuanhe *et al.*, 1997].

Die verbesserte Nuklease-Proteinkonzentration (250 mg/L Bakterienkultur) nach nur einer IMAC-Aufreinigung lag zum einen in der Kombination von Harnstoff- und HDH-Aufschluss (Kapitel 3.1.1.3) und zum anderen an der Ni-IDA konjugierten IMAC mit gleichzeitiger Rückfaltung an der Matrix (Kapitel 2.24.1.2). Yuanhe *et al.* verwendeten ausschließlich Harnstoff zum Zellaufschluss und zwei aufeinander folgende IMAC-Aufreinigungen unter Verwendung von  $Zn^{2+}$ . Die erste IMAC diente zur eigentlichen Reinigung des Zielproteins, während die Zweite zur Rückfaltung der rMicNuc *inclusion bodies* verwendet wurde. Zink besitzt zwar eine höhere Spezifität zu Histidin getaggen Proteinen, aber Nickel besitzt die bessere Affinität und somit die höheren Bindungskapazitäten [Block *et al.*, 2011].

Ob die rMicNuc inklusive 6xHis-tag nach Expression aus 162 AS bestand (Kapitel 8.1.1), wurde nicht weiter untersucht. Eventuell könnte das Startmethionin durch die *E. coli* Methionin-Amino-Peptidase bei der Prozessierung abgespalten worden sein, wodurch die Primärstruktur um 1 AS verkürzt wäre [Jing *et al.*, 1992]. Die spezifische Aktivität der selbstproduzierten rMicNuc mit 6xHis am C-Terminus lag bei  $456 \pm 38$  U/mg (Abbildung 3-7, Seite 80). In der vorliegenden Arbeit wurden Standardtestbedingungen für den Aktivitätsassay von 25 °C und pH 7,5 gewählt, wie sie bei der Umkehrosiose von

Herstellerseite vorgegeben sind [Hermsdorf, 2011; Lanxess, 2012]. Cuatrecasas *et al.* verwendeten ursprünglich in ihrem Assay zur Nukleaseaktivitätsmessung 30 °C und einen pH von 8,8 um optimale Bedingungen zu gewährleisten [Cuatrecasas *et al.*, 1967b]. Die Abhängigkeit der Nukleaseaktivität von pH und Temperatur wird in Tabelle 4-1 zwischen rMicNuc aus der vorliegenden Arbeit und Nuklease R aus der Literatur verglichen. Die Ergebnisse der spezifischen Aktivität der rMicNuc liegen etwa im Bereich der Literaturwerte für Nuklease R aus *Staphylococcus aureus*, wobei der hauptsächliche Unterschied im Aktivitätsassay in der Art der verwendeten DNA lag.

Tabelle 4-1: Übersicht der spezifischen Aktivität von Nuklease R (rMicNuc) aus der Literatur, unter verschiedenen Bedingungen mit DNA als Substrat.

Substrat DNA aus	pH- Wert	Nuklease- Variante	Tempe- ratur [°C]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Referenz
Heringssperma (hitzenaturiert)	7,5	rMicNuc	25	456±38	vorliegende Arbeit
		(Nuklease R)	30	955±33	
	8,8	rMicNuc	25	1780±105	
		(Nuklease R)	30	2305±135	
Lachssperma (hitzenaturiert)	7,4	Nuklease R	25	732	[Yin und Jing, 2000]
			30	638±12	[Jing <i>et al.</i> , 1992]
	8,8	Nuklease R	30	2000-3000	[Yuanhe <i>et al.</i> , 1997]
			30	2090	[Jing <i>et al.</i> , 1992]

Da es in BL21Gold (DE3)/pET20b-MicNuc (R)-6xHis durch eine Basalexpression zur intrazellulären Produktion von teils aktiver rMicNuc kam, führte dies während der Plasmidpräparation zum Abbau des Plasmids (Abbildung 3-4 (B) Bahn 8). Auch in SDS-PAGE Gelbildern von Tang *et al.* ist basal exprimierte aktive rMicNuc aus BL21 (DE3) nachweisbar (Abbildung 4-1 (C) Bahn 3) [Tang *et al.*, 2008]. Die vorangegangene Klonierung in DH5α war somit essentiell um die Generierung von Mutagenesen zu ermöglichen.

Besonders stark war die Basalexpression unter Verwendung von GB-Medium statt LB-Medium. Wenn GB-Medium für die Vorkultur in der Anzucht von BL21Gold (DE3)/ pET20b-MicNuc (R)-6xHis eingesetzt wurde, kam es zum intrazellulären Plasmidabbau und eine Induktion mit IPTG war nicht möglich. Grund dafür ist die verbesserte Wachstumsrate sowie vermehrte Proteinproduktion durch das enthaltende Glycerin und den besser zu verstoffwechselnden feuchten Hefeextrakt im GB-Medium.

Nach Einführung der Serin zu Cystein-Substitutionen sank die spezifische Aktivität aufgrund von intra- und intermolekularer Disulfidbrücken stark ab (Abbildung 3-7 (B)). Nach Reduktion

mit DTT konnte die spezifische Aktivität bei der Cys-Einfach- und Cys-Zweifach-Variante bis auf 80 % und bei der Cys-Dreifach-Variante bis annähernd 100 % im Vergleich zum rMicNuc-Niveau gesteigert werden. Ein ähnliches Phänomen beschreibt Mansfeld et al. bei der Einführung von Cysteinen in einer Thermolysin ähnlichen Protease [Mansfeld et al., 1999]. Insgesamt konnten bei der Cys-Einfach-Variante 200 mg, bei der Cys-Zweifach-Variante 50 mg und bei der Cys-Dreifach-Variante 100 mg aus 1 L Bakterienkultur aufgereinigt werden. Besonders während der anschließenden Dialyse, zum Entfernen des Elutionspuffers, traten bei der Zwei- und Cys-Dreifach-Variante vermehrt starke Präzipitationen auf, was die Produktausbeute minderte. Die Zugabe von 2-Mercaptoethanol [Mansfeld et al., 1999] oder DTT [Huang et al., 1997] zum Elutionspuffer und zum Dialysepuffer könnten die Ausbeute an löslichem Enzym mit enthaltenen Cysteinen weiter erhöhen.

#### **4.1.2 Proteinase K aus *Tritirachium album***

Innerhalb einer Schüttelkolbenkultivierung konnte mithilfe pPICZαA und einer Methanolinduktion eine rPK-Aktivität von 7 U/mL X33-Kultur erzielt werden. Durch eine vergrößerte Fermentation im 20 L-Maßstab konnte die rPK-Aktivität auf bis 88 U/mL gesteigert werden. Die Proteinkonzentration nach 72 h Kultivierung lag bei 150 mg/L.

Zum Vergleich, mit Hilfe von pGAPZαA und einer konstitutiven Expression konnten lediglich 3 U/mL rPK pro Kulturmedium produziert werden. Auch die Maßstabsvergrößerung auf eine 7 L-Fermentation im Bioreaktor brachte keine Steigerung der Proteaseaktivität. Kim et al. publizierten 2005 einen Vergleich bei der Produktion einer thermostabilen Serinprotease (TfpA) aus *Thermomonospora fusca* YX mithilfe von pGAPZαA und pPICZαA in X33 [Kim und Lei, 2005]. Sie konnten zeigen, dass die methanolinduzierte Produktion deutlich bessere Ausbeuten erzielte. Mit pPICZαA konnten 41 mg/L Protease hergestellt werden, während durch die pGAPZαA-Expression lediglich knapp 10 mg/L TfpA produziert werden konnten. Zudem kam es bei der konstitutiven Expression bereits nach zwei Tagen zur Ausbildung einer Plateauphase, bei der die Proteaseausbeute stagnierte. Kim und Lei gelang durch den Wechsel von pGAPZαA auf pPICZαA, eine vierfache Steigerung der sekretierten Proteasemenge. In der vorliegenden Arbeit konnte die rPK-Aktivität von 3 U/mL (pGAPZαA) auf 88 U/mL (pPICZαA) gesteigert werden, was einer 29-fachen Steigerung der rPK-Aktivität entsprach.

Die Produktion von Histidin getaggtter rPK in *Pichia pastoris* X33 gestaltete sich schwieriger als die rMicNuc-Produktion in *E. coli*. Nach der Subklonierung des pPICZαA-Plasmids mit der enthaltenen PK-Gensequenz in *E. coli* DH5α, erfolgte die Insertion des gesamten Plasmids in das Genom von X33. Die homologe Rekombination erfolgte dabei im Bereich des AOX 1-Promoters [Daly und Hearn, 2005; Higgins, 2001]. Anschließend erfolgte das

Screening nach X33-Transformanten mit maximaler rPK-Aktivität im Medium. Idealerweise kommt es während der homologen Rekombination zum mehrfachen Einbau des Plasmids (*multiple gene insertion event*), der spontan mit einer Rate von 1-10 % unter allen Zeocintransformanten auftritt [Invitrogen, 2010a]. Durch die vermehrten Genkopien kann eine drastische Steigerung der Expressionsrate erzielt werden [Clare *et al.*, 1991]. Dabei wird empfohlen hunderte und tausende von resistenten Klonen zu untersuchen [Invitrogen, 2010a]. In der vorliegenden Arbeit wurden 220 Klone für X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK und 176 Klone für X33/pPICZ $\alpha$ A-PK-CT-6xHis auf aktiv sekretierte rPK untersucht. Innerhalb einer direkten Suche auf *multi-copy*-Insertionen, durch Verwendung von YPDS-Zeocin<sup>TM</sup>-Agarplatten mit einer gesteigerten Zeocinkonzentration von 1000 mg/L statt 100 mg/L, konnten keine resistenten Klone nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis wäre der Einsatz von quantitativer *dot-blot*-Analyse, *Southern Blot*, *real-time* qPCR oder differenzierten Hybridisierungen [Invitrogen, 2010a; Zhu *et al.*, 2009]. Ein vermehrter Screening-Aufwand in diese Richtung, d.h. Vergrößerung der Klonbibliothek und Analyse der PK-Genkopien, könnte die Ausbeute von rPK weiter steigern.

Bei der zufälligen Rekombination im 3' AOX 1-Bereich könnte es zudem zur Zerstörung des AOX 1-Gens kommen. Die resultierenden X33-Klone wären methanolsensitiv bzw. Mut<sup>S</sup> (*methanol utilization slow*) und benötigen andere Kultivierungsbedingungen. Dieses Phänomen könnte im Rahmen des Screenings zur Minderung von rPK-produzierenden Klonen geführt haben. Auf eine Unterscheidung nach der homologen Rekombination zwischen Mut<sup>S</sup> und Mut<sup>+</sup> wurde verzichtet. Generell ist es möglich, eine Verbesserung der Expressionsleistung durch Mut<sup>S</sup>-Klone zu erzielen. Krainer *et al.* konnten am Beispiel der Meerrettich-Peroxidase (HRP) eine um siebenfach verbesserte Expressionsleistung in Mut<sup>S</sup> Klonen zeigen [Krainer *et al.*, 2012]. Überwiegend werden jedoch rekombinant produzierte Proteine mit *Pichia pastoris* unter Verwendung von Mut<sup>+</sup>-Stämmen produziert.

Li *et al.* gelang die heterologe Produktion der keratinolytischen Serinprotease aus *Streptomyces fradiae* var. k11 in dem Protease-defizienten *Pichia* Stamm SMD1168 (prb1) mit einer Endkonzentration von 78 mg/L [Li *et al.*, 2007]. Auch Salamin *et al.* gelang die Überexpression einer homologen Protease der Klasse Subtilisin (PRB) aus *Pichia pastoris* GS115 (Mut<sup>+</sup>) durch pPICZ $\alpha$ A mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/L [Salamin *et al.*, 2010] und Bär konnte die Produktion von etwa 5 mg/L humaner Dipeptidylpeptidase IV mit pPICZ $\alpha$ A zeigen [Baer, 2005]. Verglichen mit möglichen Endproteinkonzentrationen anderer rekombinat in *Pichia* hergestellter und sekretierter Proteine, wie z.B. einem Wachstumsfaktor der Maus mit 2-3 g/L, sind die Ausbeuten an Proteasen eher gering [Clare *et al.*, 1991].

In der vorliegenden Arbeit konnten mithilfe von *Pichia pastoris* im Vergleich zum Ursprungsorganismus *Tritirachium album* [Ebeling *et al.*, 1974] gleiche PK-Ausbeuten erzielt werden (Tabelle 4-2). Allerdings ist die hier gezeigte Produktion/ Fermentation unoptimiert.

Tabelle 4-2: Vergleich der Ausbeute zwischen rekombinant in *Pichia Pastoris* und homolog in *Tritirachium album* [Ebeling *et al.*, 1974] hergestellter PK.

PK-Ausbeute	<i>Tritirachium album</i> [Ebeling <i>et al.</i> , 1974]	<i>Pichia pastoris</i> [vorliegende Arbeit]
Fermentationsüberstand [L]	4,25	18
Reinigungsverfahren	Ammoniumsulfat Präzipitation, mind. 3x IEC	Ultrafiltration, 1x IEC (KIA)
Proteinkonzentration PK Rohenzymextrakt (RE) [mg/L]	~256	150
PK-Menge gereinigt total [mg]	310	750
PK-Ausbeute bezogen auf RE [%]	28	28

Durch das Aufkonzentrieren der rPK im Fermentationsüberstand mittels Ultrafiltration kam es zum Verlust von etwa 23 % der ursprünglichen rPK-Aktivität (Retentat 50,5 % + Permeat 26,5 %) (Tabelle 3-3). Es wurden etwa 23 % der rPK-Aktivität an der PES-Ultrafiltrationsmembran adsorbiert oder inaktiviert, während 26,5 % im Permeat vorlagen. Nach Aussage von Herrn Vercammen (Techniker, GE-Healthcare) ist der *cut-off* (Porengrößenverteilung) bei diesen Membranen eher diffus als scharf [Vercammen, 2013]. Dies führt zu teils größeren Poren weit über 10 kDa, welche die rPK nicht zurückhalten können.

Alternativ könnte unter Verwendung der His-getaggten Variante direkt eine IMAC ohne Ultrafiltrationsschritt durchgeführt werden. Zudem war der rPK-Verlust durch die KIA, mit ungefähr 45 % (Tabelle 8-1), wesentlich größer als bei der IMAC-Reinigung ohne Verluste (Tabelle 8-2).

Auch die Fermentation wäre weiter optimierbar. Über die gesamte Fermentationszeit von 72 h konnte ein stetiger Zuwachs an Proteaseaktivität verzeichnet werden. Die Anpassungen der *feeding-Dauer*, des exponentiellen *feeding*-Profils oder der Methanolkonzentration [Fairlie *et al.*, 2000] könnte die rPK-Ausbeute weiter verbessern. Das in der vorliegenden Arbeit erreichte BTM-Konzentration von *Pichia pastoris* betrug nur 25 g/L. Digan *et al.* erreichten in einer semi-konstitutiven Produktion von bovinem Lysozym C2 BTM-Konzentrationen von 120 g/L [Digan *et al.*, 1989]. Eine weitere Möglichkeit der Optimierung wäre die Verwendung der PK eigenen nativen Signalsequenz anstatt der vorliegenden  $\alpha$ -Faktor-Signalsequenz in pPICZ $\alpha$ A. Guo *et al.* konnten beispielsweise die rekombinante Expression einer alkalischen Protease aus *Aspergillus oryzae* in *Pichia pastoris* um das 1,5-fache steigern, als sie die  $\alpha$ -Faktor-Signalsequenz durch das native Signalpeptid ersetzten [Guo und Ma, 2008].

Überraschenderweise gelang es nicht, die rPK aus der Fermentation X33/pPICZ $\alpha$ A-Pro-PK Klon 7 über IMAC aufzureinigen. Der anschließende *Western Blot* bestätigte das Fehlen des

6xHis-tag, welcher im Genom von X33 innerhalb des eingeführten pPICZαA-Plasmids vorlag. Mittels ESI-MS-Analyse konnte gezeigt werden, dass es bei der Produktion der rPK in *Pichia pastoris* zur Abspaltung des Peptid-tags am C-Terminus kam. Die Spaltung erfolgte dabei zwei und drei AS nach dem A279 (Abbildung 4-2). Nachdem ein zusätzlicher 6xHis-tag am 3' Ende des PK-Gens (A279) inseriert und die XbaI-Restriktionsschnittstelle entfernt wurde (Abbildung 3-19, Seite 96), konnte eine Proteinspezies mit C-terminalen 3xHis-tag via ESI-MS-Analyse nachgewiesen werden.

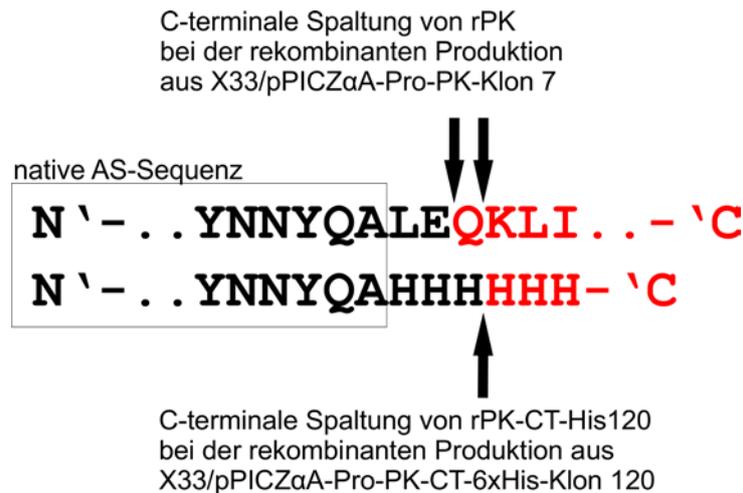


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der Spaltstelle am PK-C-Terminus der rekombinant produzierten PK-Varianten rPK und rPK-CT-His120 aus X33. A279 entspricht dem nativen C-Terminus der PK aus *Tritirachium album*. Pfeile markieren den neuen C-Terminus der rekombinant produzierten PK-Varianten.

Es bleibt ungeklärt, ob diese Spaltung während der Expression von rPK in X33 autokatalytisch oder durch extrazelluläre *Pichia pastoris*-Proteasen [Wu *et al.*, 2013] hervorgerufen wurde. Es ist bekannt, dass A279 starker Moleküldynamik während der Substratbindung unterliegt [Liu *et al.*, 2010]. Außerdem bestehen bevorzugte PK-Spaltstellen vor allem aus hydrophoben, aliphatischen oder aromatischen AS [Ebeling *et al.*, 1974; Kraus und Femfert, 1976; Morihara und Tsuzuki, 1975]. Es wäre denkbar, dass rPK-Moleküle sich gegenseitig C-terminale AS-Überhänge abspalten. So wäre eine Bindung der hydrophoben C-terminalen PK-Region (AS 266-279; siehe Anhang 8.1.2) in der Substratbindestelle anzunehmen, wobei die überhängenden AS abgespalten werden.

Eine weitere Hypothese betrifft die autokatalytische Spaltung der Pro-Sequenz. In Abbildung 1-5 (Seite 23) ist gut zu erkennen, dass der C- und N-Terminus der PK sich in direkter räumlicher Nähe zueinander befinden. So könnte die Abspaltung des Propeptids auch auf den C-Terminus Einfluss nehmen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die AS L280 und E281 keine Erkennungssequenz für eine Spaltung darstellten. Die Deletion dieser beiden AS, führte nicht zur Expression des 6xHis-Peptidtags bei rPK-CT-His120 und weiteren aktiven PK-CT-

6xHis-Varianten. Das Liao *et al.* C-terminal Histidin-getaggte PK in *E. coli* produzieren konnten, auch bei geringen Aktivitäten von unter 1 U/L [Liao *et al.*, 2007], widerspricht allerdings dieser Hypothese der C-terminalen Selbstkontrolle.

Eigene Untersuchungen bezüglich der in pPICZ $\alpha$ A vorhandenen  $\alpha$ -Signalsequenz aus *Saccharomyces* und des C-terminalen Peptid-tags bestehend aus c-myc und 6xHis mittels Gene Designer 2.0 hatten ergeben, dass die verwendeten Nukleotidsequenzen nicht für eine *Pichia Pastoris*-Expression optimiert waren. Die Triplets der klonierten Nukleotidsequenz der rPK dagegen, wurden mittels Gene Designer 2.0 codonoptimiert [Villalobos *et al.*, 2006]. Das es generell möglich ist Proteine mithilfe von pPICZ $\alpha$ A plasmidinternem Peptid-tag zu produzieren, zeigen zahlreiche Publikationen [Driss *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Salah *et al.*, 2009; Thiruvengadam *et al.*, 2011].

Weiterhin wäre ein proteolytischer Abbau durch *Pichia pastoris* eigene Proteasen möglich. X33 ist ein Wildtypstamm der zahlreiche Proteasen produziert (Tabelle 4-3). Es ist bekannt, dass es durch die methanolinduzierte Expression vermehrt zur Zelllyse kommt und die proteolytische Degradation von rekombinanten Proteinen zunimmt [Damasceno *et al.*, 2007; Jahic *et al.*, 2003b]. So sind besonders hohe Konzentrationen der hauptsächlichen Vakuolenproteasen nach Methanolinduktion im Medium nachweisbar, welche ein breites Substratspektrum besitzen: Proteinase A (PEP4-Gen), Proteinase B (PRB1-Gen), Yapsin 1 (YPS1-Gen) und Carboxypeptidase Y (PRC1-Gen). Auch ihre Konzentration im Überstand nimmt mit steigender Induktionsdauer zu [Sinha *et al.*, 2004].

Tabelle 4-3: Übersicht von *Pichia pastoris*/ *Saccharomyces cerevisiae* eigenen Proteasen, welche an der Degradation rekombinanter Proteine beteiligt sein können. n/a nicht angegeben.

Bezeichnung	Peptidase Unterfamilie	Gen	Knockout-Variante	Referenz	Substratspezifität [Apweiler R. <i>et al.</i> , 2004]
Proteinase A (PrA)	Aspartatprotease	PEP4	SMD1163; SMD1168; GS115 pep4 $\Delta$ yps1 $\Delta$	[Higgins <i>et al.</i> , 1998a], [Wu <i>et al.</i> , 2013]	Endopeptidase Funktion hydrophober AS; cpY; PrB
Proteinase B (PrB)	Serinprotease	PRB1	SMD1163; SMD1165	[Higgins <i>et al.</i> , 1998a]	Endopeptidase Funktion an R, T; cpY
Carboxypeptidase Y (cpY)	Serinprotease	PRC1	n/a	[Sinha <i>et al.</i> , 2004]	Aliphatische und hydrophobe AS an P1' und L, M, F an P1
Yapsin 1	Aspartatprotease	YPS1	GS115 pep4 $\Delta$ yps1 $\Delta$	[Wu <i>et al.</i> , 2013]	Basische AS (R, K) an P1 sowie P2 am C-Term
Kexin	Serinprotease	KEX1	SMD1168 kex1::SUC2	[Boehm <i>et al.</i> , 1999]	R oder K am C-Term

Wu *et al.* konnten nach dem Gen-*knock-out* von PEP4 und YPS1 eine verminderte Degradation eines rekombinanten Proteins beobachten. Dabei stieg die Ausbeute an intaktem, sekretiertem Zielprotein auf 80 %, während bei der Produktion im Wildtyp nur 30 % erreicht werden konnten [Wu *et al.*, 2013].

Innerhalb der Dissertation von Kabaoglu führte der Einsatz der Protease-defizienten *Pichia pastoris*-Stämme SMD1163 (PEP4- und PRB1-defizient) und SMD1165 (PRB1-defizient) allerdings nur bedingt zu einer Herabsetzung der proteolytischen Degradation rekombinanter Proteine [Kabaoglu, 2005]. Die Carboxypeptidase Y ist in der Lage endständige AS am C-Terminus abzuspalten [Ohi *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 2004]. Zudem können weitere sekretierte Proteasen aus *Pichia pastoris* die Menge an intaktem, rekombinantem Protein verringern. Die sekretierte Protease Kexin beispielsweise, ist an der extrazellulären Degradation beteiligt, spaltet dabei aber vorwiegend die  $\alpha$ -Faktor-Signalsequenz ab [Werten und Wolf, 2005]. Allerdings ist auch bekannt, dass Kexin [Boehm *et al.*, 1999; Mizuno *et al.*, 1989] oder die Aspartatprotease Yapsin [Werten und Wolf, 2005], C-terminal an basischen Aminosäuren spalten können.

Ebenso der Einsatz von Proteaseinhibitoren (z.B. Pepstatin) in der Fermentation kann zu einer verminderten Proteindegredation beitragen [Kabaoglu, 2005]. Weiter kann der pH-Wert die Degradation rekombinanter Proteine minimieren, solange dieser außerhalb des optimalen Aktivitätsbereichs liegt. So zeigten Jahic *et al.* beim Absenken des pH-Werts der *Pichia pastoris*-Kultur im Bioreaktor von pH 5.0 auf pH 4.0, dass sich die Ausbeute eines intakten Fusionsproteins von 40 % auf 90 % steigern ließ [Jahic *et al.*, 2003a]. Es bleibt weiter unklar was die Abspaltung des Peptid-tags nach dem nativen PK-C-Terminus A279 hervorrief.

Bezüglich der Aufreinigung mittels KIA wurde festgestellt, dass in den Elutionsfraktionen teils Präzipitationen auftraten. Die starke Präzipitation der rPK nach der Elution lässt sich zum einen durch die teils hohe Proteinkonzentration in den Elutionsfraktionen erklären (A12= 19,36 mg/mL). Elutionsfraktionen mit Proteinkonzentrationen  $\leq 2$  mg/mL wiesen signifikant weniger Präzipitat auf (Tabelle 8-1, Seite 175). Zum anderen scheint das im KIA-Elutionspuffer enthaltene Natriumacetat die Präzipitation zu begünstigen. Die Verwendung eines 50 mM Tris/HCl-Puffers zum Eluieren während der IMAC zeigte kein Präzipitat, obwohl Proteinkonzentrationen bis zu 2,96 mg/mL (Elutionsfraktion B7) erreicht wurden (Tabelle 8-2, Seite 176). Das produzierte rPK-Enzym ohne His-tag, welche am C-Terminus im Vergleich zum Wildtyp zwei bzw. drei zusätzliche AS trug, besaß ein Molekulargewicht zwischen 29,1 kDa (N'-...YQALE-C'; Abbildung 3-16, Seite 93) und 29,3 kDa (N'-...YQALEQ-C'; Abbildung 3-16, Seite 93) sowie eine durchschnittl. spezifische Aktivität von  $430 \pm 47$  U/mg (Tabelle 8-1, Seite 175). Die Histidin getaggte rPK-Variante rPK-CT-His120 besaß ebenfalls ein Molekulargewicht von 29,3 kDa (N'-...YQAHHH-C'; Abbildung 3-18, 95) und eine

durchschnittl spezifische Aktivität von  $409 \pm 9$  U/mg (Tabelle 8-2, Seite 176). Im Vergleich der ebenfalls in *Pichia pastoris* produzierten kommerziellen PK von Thermo-Scientific besaßen die in der vorliegenden Arbeit hergestellten rPK-Varianten eine um durchschnittlich 100 U/mg höhere spezifische Aktivität (Tabelle 4-4). In Abbildung 3-15 (A), Seite 91 ist das dazugehörige SDS-PAGE Gel dargestellt. Bahn 7 (PK von Thermo Scientific 0,5 µg) zeigte eine weitere Verunreinigung (bei ca. 26 kDa), welche in Bahn 6 (rPK 0,5 µg) nicht auftrat und somit den Unterschied in der spezifischen Aktivität verursachen könnte.

Für den Aktivitätsassay wurden Standardtestbedingungen von 25 °C und pH 7,5 gewählt, wie sie bei Umkehrosomosemodulen von Herstellerseite vorgegeben sind [Hermsdorf, 2011; Lanxess, 2012]. Aus Tabelle 4-4 wird das Verhältnis zwischen der spezifischen Aktivität der PK von synthetischem und natürlichem Substrat gezeigt. Die rPK von Thermo-Scientific besitzt laut Hersteller, mit Hämoglobin als Substrat, eine spezifische Aktivität von >30 U/mg, während es mit dem künstlichen Substrat Suc-AAPF-pNA 312 U/mg waren. Somit lag die spezifische Aktivität bei synthetischem Substrat um das Zehnfache höher.

Tabelle 4-4: Übersicht der spezifischen Aktivität von PK (Literaturwerte) bezogen auf das eingesetzte Substrat.

PK Substrat	pH-Wert	Temperatur [°C]	PK-Variante	Spezifische Aktivität	Referenz
Suc-AAPF-pNA	7,5	25	rPK	430 U/mg	vorliegende Arbeit
	7,5	25	rPK-CT-His120	409 U/mg	vorliegende Arbeit
	7,5	25	Rekomb. PK	312 U/mg	vorliegende Arbeit; [Günther, 2013; Thermo-Scientific, 2012]
Suc-AA-pNA	8,0	25	Wildtyp	150 mU/mg	[Ebeling <i>et al.</i> , 1974]
Hämoglobin	7,5	35,5	Wildtyp	30 mAnson U/mg	[Ebeling <i>et al.</i> , 1974]
	7,5	37	Rekomb. PK	>30 U/mg	[Thermo-Scientific, 2012]
Casein	8,0	37	Wildtyp	4,5 Kunitz U/mg	[Ebeling <i>et al.</i> , 1974]
	7,8	30	Wildtyp	8,8 U <sub>cas</sub> /mg	[Singh <i>et al.</i> , 2001]
			Rekomb. PK	20,1 U <sub>cas</sub> /mg	[Marx <i>et al.</i> , 2008a]
Ribonuklease	7,5	25	Wildtyp	71 mU/mg	[Ebeling <i>et al.</i> , 1974]

In Abbildung 3-15 (A), Seite 91 ist weiter der Selbstabbau (*autolysis*) in Form des Verdaumusters gezeigt. In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass es trotz Inaktivierung der rPK mit 1 mM PMSF zum Selbstabbau kam. Im Zuge der SDS-Probenpräparation, Erhitzen auf 99 °C in Abwesenheit anderer Substrate, wird der PK-Selbstverdau begünstigt [Hilz und Fanick, 1978; Hilz *et al.*, 1975]. Auch Kolvenbach *et al.* konnten, selbst bei Verwendung von 1 mM PMSF im Ansatz, ein ähnliches Verdaumuster nach der Inkubation bei 90 °C im SDS-PAGE Gel nachweisen [Kolvenbach *et al.*, 1990]. Der Vergleich der rPK mit diesem Verdaumuster ist in Abbildung 4-3 dargestellt. Erst ab einer Proteinkonzentration von unter 0,3 mg/mL verbessert sich die rPK-Inaktivierung mit 1 mM PMSF. Bei höheren rPK-Konzentrationen genügt die verwendete PMSF-Konzentration nicht, um den Selbstabbau zu unterbinden. Anhand dieser Ergebnisse lassen sich Aussagen über die Proteinreinheit machen. Die Reinheit der rPK-Lösung in der vorliegenden Arbeit, gemessen am SDS-PAGE Gel betrug >99 % (Abbildung 4-3, Bahn 5 und 6).

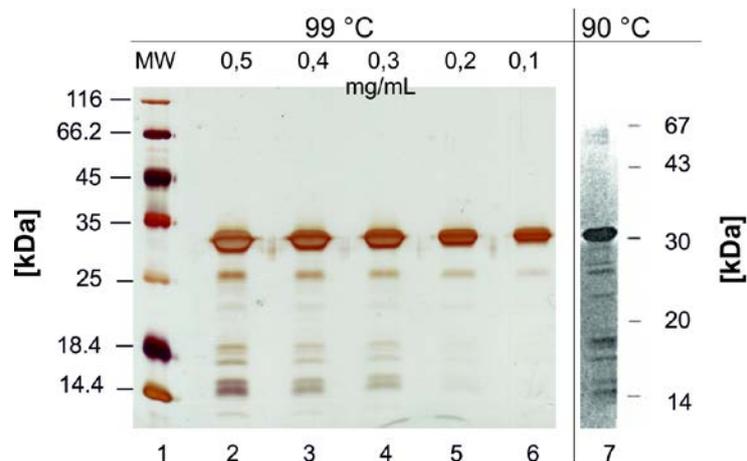


Abbildung 4-3: Selbstverdau-Spaltmustervergleich der rPK aus der vorliegenden Arbeit und von Kolvenbach *et al.* anhand der Inkubationstemperatur der SDS-PAGE Proben. Bahn 1: MW Marker [5  $\mu$ L]; Bahn 2-6: rekombinante PK aus der 20 L-Fermentation [10  $\mu$ L]; Bahn 7: Originalbildausschnitt von Kolvenbach *et al.* bei einer SDS-Proben-Inkubationstemperatur von 90 °C [Kolvenbach *et al.*, 1990].

## 4.2 Untersuchungen zur zielgerichteten Immobilisierung

### 4.2.1 Zielgerichtete Immobilisierung an porösen Trägern

In der vorliegenden Arbeit wurden rekombinante Enzyme in aktiver Form produziert, um diese in zielgerichteter, immobilisierter Form zum Abbau von Polymeren zu untersuchen, die beim Biofilmaufbau beteiligt sind. Die Immobilisierung von Histidin-getaggtter rPK-CT-His120 und rMicNuc an porösen Trägern sollte die generelle Machbarkeit zeigen. Die dabei generierten enzymgebundenen Träger (Ni-Sepharose) wiesen selbst nach sechs bis acht Monaten Lagerung Restaktivitäten zwischen 70 % und 100 % der ursprünglichen enzymatischen Aktivitäten auf (Abbildung 3-24 (B), Seite 105). Auch die über Disulfidbrücken

kovalent an ATS (aktivierte Thiolsepharose 4B) zielgerichtet immobilisierten rMicNuc-Cystein-Varianten zeigten ähnlich stabile Aktivitäten (Abbildung 3-24 (A), Seite 105).

In Tabelle 3-5 (oben) auf Seite 113 sind alle Immobilisierungsversuche an porösen Trägern mit Immobilisierungsausbeute, -Effizienz, Aktivitätsausbeute und Elutionseffizienz zusammengefasst (Definition auf Seite 99). Es konnte eindeutig die hohe Immobilisierungsausbeute der Enzyme mit His-tag oder Cysteinsubstitution im Vergleich zu den Varianten ohne His-tag oder Cysteinsubstitution beobachtet werden. Weiter sichtbar, die hohe Elutionseffizienz dieser optimierten Varianten, die die Voraussetzung für eine wiederholte Immobilisierung darstellte und somit eine Wiederbeladung der Träger ermöglicht. rPK-CT-His120 besaß eine Immobilisierungseffizienz von 26 % an Ni-Sepharose, d.h. 26 % der immobilisierten rPK-Moleküle wiesen nach der Komplexbildung zwischen His-tag und Ni-IDA-Sepharose noch Aktivität auf. Das bedeutet weiter, dass die immobilisierte spezifische Aktivität nur noch 26 % der löslichen spezifischen Aktivität ausmachte. Diese Effizienz ist im Vergleich zu anderen Immobilisierungen eher gering. Deepthi et al. zeigten Immobilisierungseffizienzen zwischen 83-90 % nach kovalenter Immobilisierung von PK an oxidierten Sucrose-Polymeren [Deepthi et al., 1998]. Tardioli et al. konnten Immobilisierungseffizienzen von maximal 54 % erreichen, als sie Alcalase (Subtilisin) ungerichtet an Glyoxyl-Agarose immobilisierten [Tardioli et al., 2003]. Sie konnten zeigen, dass durch *multipoint attachment* eine 500-fache Stabilitätssteigerung erreicht wurde.

Die Kopplung von rPK an Ni-Sepharose wurde in der vorliegenden Arbeit innerhalb von 90 min realisiert und ein *multipoint attachment* ist aufgrund der Einmalkopplung zwischen His-tag und Ni-NTA nicht möglich. Blanco et al. erreichten eine Immobilisierungseffizienz von 75 % durch die Immobilisierung von Trypsin an aminierte Agarose [Blanco et al., 1989] und Guisan et al. erreichten bei der Immobilisierung von Thermolysin an aktivierte Glyoxyl-Agarose sogar eine Immobilisierungseffizienz von 100 %, bei verbesserter Stabilität [Guisan et al., 1997].

Ni-Sepharose besitzt eine Porengröße zwischen 28-80 nm, bei ATS sind es ca. 30 nm (Tabelle 3-4, Seite 100). Bei einem Molekulargewicht von 624,7 g/mol für Suc-AAPF-pNA entspricht dies Längenmaßen von unter 0,1 nm für das Substrat [Kölling, 2013]. Generell sollte die Diffusionslimitation unter Einsatz des synthetischen Substrats Suc-AAPF-pNA bei der rPK-Aktivitätsmessung an den verwendeten porösen Trägern minimiert sein.

Beim Versuch rPK über die nativen Cysteine an ATS zu immobilisieren, konnten Immobilisierungsausbeuten zwischen 12-14 % erzielt werden (Tabelle 3-5 oben, Seite 113). Die Immobilisierungseffizienz (1,9-2,2 %) lag unter der der Ni-Sepharose-Kopplung mit rPK-CT-His120 (26 %). Die geringen Unterschiede in der spezifischen Aktivität der rPK mit bzw. ohne Reduktion und in der Immobilisierungsausbeute zeigten, dass eine Disulfidbrücken-Reduktion mit bis zu 15 mM DTT nicht möglich war. Eine Zugänglichkeit der Thiolgruppen

zum Träger war somit nicht gewährleistet. Ebenso war die Immobilisierung über das freie C73 nicht erfolgreich, was Immobilisierungs- und Elutionseffizienzen von nur 1–2 % zeigten. Nach Meinung von Gourinath *et al.* ist die Region um das aktive Zentrum verdeckt und für das Lösungsmittel bzw. DTT nicht zugänglich. C73 liegt in direkter Nähe zum H69 des aktiven Zentrums und ist höchstwahrscheinlich auch nicht zugänglich [Gourinath *et al.*, 2001]. Dies könnte das Ausbleiben einer Disulfidbrücke zwischen C73 und dem Thiol an der ATS erklären.

Der Grund für die sehr niedrigen Immobilisierungseffizienzen und Aktivitätsausbeuten im Fall der rMicNuc, welche durchschnittlich bei 1 % lagen, war der Diffusionslimitation geschuldet (Tabelle 3-5 oben, Seite 113). Dem relativ heterogenen und sehr großen DNA-Substrat war es nicht möglich in die Poren der porösen Träger einzudringen. Somit war es ausschließlich oberflächenständigen rMicNuc-Molekülen möglich das Substrat zu hydrolysieren. In Abbildung 4-4 wurde das Substrat DNA-Natriumsalz aus Heringssperma für 10 min bzw. 30 min bei 100 °C denaturiert und im Anschluss in einer Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach getrennt (Kapitel 2.8). Selbst nach einer DNA-Hitzedenaturierung von 30 min [Cuatrecasas *et al.*, 1967b] sind Oligonukleotidfragmente zwischen 500 Bp und 1000 Bp zu erkennen. Teilweise wurden diese sogar überschritten.

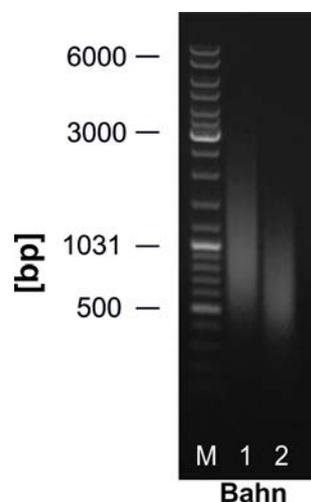


Abbildung 4-4: Agarosegel von hitzedenaturiertem DNA-Natriumsalz aus Heringssperma. Bahn M: GeneRuler DNA Ladder Mix [5µL]; Bahn 1: 0,5 mg/mL DNA, 10 min inkubiert [5 µL]; Bahn 2: 0,5 mg/mL DNA, 30 min inkubiert [5 µL].

Laut Informationstabelle der Eppendorf AG entspricht das Molekulargewicht eines durchschnittlichen DNA-Basenpaars etwa 650 g/mol [Eppendorf, 2013]. Doppelsträngige DNA-Fragmente von 500 Bp besitzen somit ein Gewicht von 325 kg/mol und 1 kB doppelsträngige DNA 660 kg/mol. Diese Molekülmassen entsprechen Partikelgrößen ähnlich der in der Ultrafiltration zwischen 60-100 nm [Kölling, 2013] und liegen über den

Porengrößen, der in der vorliegenden Arbeit verwendeten porösen Träger (Tabelle 3-4). Diese Tatsache bestärkt die Annahme, der Unzugänglichkeit der DNA-Fragmente in die Poren zu diffundieren. Auch Guisan *et al.* zeigten die Problematik der Diffusionslimitation von an Agarose immobilisierter MicNuc bei der Aktivitätsbestimmung mit DNA als Substrat [Guisan und Ballesteros, 1981]. Zudem vermuteten sie weitere störende Faktoren wie z.B. die Enzymverteilung innerhalb der Matrix. Sie konnten zeigen, dass MicNuc gebunden an Sepharose 2B (2 % Agarose) frei von Diffusionslimitation war, während sie an Sepharose 4B (4 % Agarose) und 6B (6 % Agarose) verstärkt auftrat [Guisán *et al.*, 1981a; Guisán *et al.*, 1981b].

Bei der Verwendung von niedermolekularem Substrat (z.B. Nitrophenyl-pdTp) konnten sie die Aktivitätsausbeute um 70 % steigern [Guisan und Ballesteros, 1979]. Des Weiteren führt eine erhöhte Enzymbeladung zum Absenken der Immobilisierungseffizienz. Guisan *et al.* zeigten zudem bei Untersuchungen mit synthetischem Substrat, dass trägergebundene MicNuc vermehrt als Exonuklease agiert, statt als Endonuklease. Allerdings sind solche synthetischen Substrate nicht kommerziell erhältlich. Auch als Michalon *et al.* 1993 MicNuc ungerichtet an Polystyrolkugeln kovalent immobilisierten, beobachteten sie eine starke Diffusionsbarriere. Während das lösliche Enzym Plasmid-DNA innerhalb von 2 min verdaute, benötigte das immobilisierte Enzym 120 min für die gleiche Menge DNA [Michalon *et al.*, 1993]. Generell ist DNA als Substrat für die Untersuchung des *multipoint attachment*, also auch der Immobilisierungseffizienz oder der Thermostabilität bei immobilisierter MicNuc ungeeignet, aufgrund dessen dies nicht weiter verfolgt wurde. Dennoch zeigten andere Untersuchungen eine Verbesserung der Stabilität von immobilisierter MicNuc, welche durch *multipoint attachment* erklärt werden konnte. So zeigte MicNuc immobilisiert an CNBr aktivierte Sepharose eine 700-fach verbesserte Thermostabilität im Vergleich zur löslichen Variante [Guisan *et al.*, 1993]. Dem zugrunde ist es jedoch verwundernswert, weshalb die schlechteste Lagerstabilität im Fall der MicNuc bei der Cys-Dreifach-Variante gekoppelt an ATS beobachtet wurde (Abbildung 3-24). Vermutlich kommt es zu weiteren intermolekularen Disulfidverbrückungen während der Lagerung, wobei Aggregate zwischen den *beads* entstehen und dadurch weniger MicNuc-Moleküle mit dem Substrat interagieren können. Andererseits könnte auch die Konformationsänderung der MicNuc durch *multipoint attachment* zum Verlust von Aktivität führen [Reddy und Shankar, 1993].

Für den Vergleich der immobilisierten Enzymmenge mit der Literatur wurde die gebundene Enzymmenge anhand der gebundenen Aktivität (Aktivitätsdifferenz) kalkuliert. Für eine direkte Messung der trägergebundenen Proteinmenge könnten alternativ fluoreszierende Proteine (z.B. GFP) oder, ähnlich den Arbeiten von Tasso *et al.*, der Einsatz fluoreszenzmarkierter rPK und rMicNuc verwendet werden [Tasso *et al.*, 2009a]. In Tabelle 4-5 ist eine

Übersicht der kalkulierten Enzymmengen dargestellt. Die trägergebundenen Aktivitäten wurden von Gewicht (U/g) in pro Fläche ( $\text{mU}/\text{cm}^2$ ) umgerechnet, um die Immobilisierung an porösen Trägern mit der an PP-Folien vergleichen zu können. Die Angabe der Trägeroberfläche verschiedener Sepharose-Matrizen ist kaum beschrieben.

Laut der Produktinformation der Sepharose 4B von Sigma-Aldrich besitzt 1 mL abgetropfte Matrix eine Fläche von  $5 \text{ m}^2$  [Sigma-Aldrich, 2006]. ATS entspricht der 4 % quervernetzten Agarose-Matrix von Sepharose 4B. Die Oberfläche der Ni-Sepharose war nicht bekannt. Alle Kalkulationen wurden dennoch mit der Flächenangabe von  $5 \text{ m}^2$  angestellt. Nach eigenen Untersuchungen besaß 1 g feuchte ATS ein Volumen von 1,48 mL. Demnach entsprach 1 g ATS theoretisch einer Fläche von  $7,4 \text{ m}^2$ . Auf dieser Basis konnte nun die Enzymaktivität pro Gramm in Enzymaktivität pro Quadratzentimeter umgerechnet werden.

Die trägergebundene Enzymmenge wurde theoretisch über die gekoppelte Enzymaktivität während der Immobilisierung kalkuliert (Aktivitätsdifferenz). Es konnte eine Aktivitätsdifferenz von 35 U/g an der Ni-Sepharose im Fall der rPK-CT-His120 ermittelt werden (Abbildung 3-22 (A), Seite 102). Bei der gemessenen spezifische Aktivität von 42 U/mg für rPK-CT-His120, entsprach die Enzymmenge  $0,83 \text{ mg/g}$  oder  $0,011 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  Ni-Sepharose (Tabelle 4-5).

Am Beispiel von rekombinanter PK konnten laut theoretischer Kalkulation Enzymmengen von  $0,214 \text{ mg/g}$  (rPK/ ATS) und  $0,83 \text{ mg/g}$  (rPK-CT-His120/ Ni-Sepharose) gekoppelt werden (Tabelle 4-5). Für die rMicNuc konnten Enzymmengen zwischen  $1,220 \text{ mg/g}$  (ATS) und  $2,247 \text{ mg/g}$  (ATS) immobilisiert werden (Tabelle 4-5).

Huang *et al.* immobilisierten  $0,92 \text{ mg}$  modifizierte Protease Subtilisin BPN pro 1 mL gequollene ATS-Matrix [Huang *et al.*, 1997]. Mansfeld *et al.* immobilisierten eine Thermolysin-ähnliche Protease über Cysteine an ATS und ermittelten Enzymmengen zwischen  $0,23 \text{ mg/g}$  und  $1,5 \text{ mg/g}$  [Mansfeld *et al.*, 1999]. Dabei kalkulierten sie die gekoppelte Enzymmenge jedoch auf die ungequollenen, trockenen *beads*. Da sich nach der Quellung das Volumen der *beads* etwa verdreifacht, müssten in Tabelle 4-5 alle Enzymmengen pro ATS ebenfalls noch verdreifacht werden, um die Enzymmengen mit denen von Mansfeld vergleichen zu können.

Fest steht, dass in der vorliegenden Arbeit eine höhere Enzymmenge innerhalb der Immobilisierungsreaktion eingesetzt wurde, was zu höheren gekoppelten Enzymmengen führte. Bei Proteinkonzentrationen von etwa  $0,1 \text{ mg/mL}$  und Volumina von 10-12 mL, entsprach das Gesamtproteinmengen von 1-1,2 mg. Mansfeld *et al.* setzten nur zwischen  $0,2 \text{ mg}$  und  $0,8 \text{ mg}$  Protein in den Ansätzen ein. Gerade die verwendete Enzymmenge lässt Potenzial zur Optimierung. Um die Immobilisierungseffizienz (Definition, Seite 99) zu vergrößern, müsste eine geringere Proteinmenge an die porösen Träger immobilisiert werden. Guisan *et al.* konnten die Immobilisierungseffizienz (DNA als Substrat) von 0,65 % auf 10 % steigern, als sie die gekoppelte MicNuc Menge von  $60 \mu\text{g/mL}$  auf  $15 \mu\text{g/mL}$  Sepharose 4B senkten [Guisan und Ballesteros, 1981]. Auch Uchida *et al.* zeigten einen

Anstieg der Immobilisierungseffizienz gekoppelter RNase T2 von 9 % auf 70 % beim minimieren der Enzymmenge [Uchida und Egami, 1971].

Laut Camarero ist die zielgerichtete Immobilisierung über Affinitäts-tags nicht über die Zeit stabil [Camarero, 2008]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass an Ni-Sepharose immobilisierte rPK-CT-His120 (Komplexbildung) nach acht Monaten keinen Aktivitätsverlust besaß (Abbildung 3-24 (B), Seite 105). Zudem zeigte die gekoppelte rPK-CT-His120 nach sechs Zyklen Substratbeladung nur etwa 10 % Aktivitätsverlust (Abbildung 3-25 (B), Seite 106). Zum Vergleich, an Eupergit C immobilisierte Protease der Klasse der Subtilisine (EUPERGIT-TLN) verliert bereits in den ersten drei Zyklen 23 % der Aktivität [Boller *et al.*, 2002]. Im Fall der rMicNuc-Cys-Einfach-Variante gekoppelt an ATS waren innerhalb sechs Zyklen dauerhaft über 80 % der Nukleaseaktivität bezogen auf die Anfangsaktivität messbar (Abbildung 3-25, A). Auch Reddy *et al.* konnten ebenfalls 80 % der rMicNuc-Aktivität nach Sepharosekopplung über sechs Zyklen bewahren [Reddy und Shankar, 1993].

Dank der genetischen Zugänglichkeit der rekombinant produzierten Enzyme können auch weitere Peptid-tags oder andere zielgerichtete Immobilisierungsmethoden (z.B. Inteininfusionspeptid [Kwon *et al.*, 2006] oder Staudinger-Ligation [Köhn *et al.*, 2003]) zur Kopplung genutzt werden.

Tabelle 4-5: Übersicht der trägergebundenen Aktivität und der trägergebundenen Enzymmenge an Ni-Sepharose (Ni-Sep), ATS und PP-Folien unterschiedlicher Modifikation aus der vorliegenden Arbeit. PP<sub>epoxid</sub>: PP-Folie mittels Plasmabehandlung mit EPMA beschichtet; PP<sub>Ni-NTA</sub>: epoxidierte PP-Folie mit Nα,Nα-Bis(carboxymethyl)-L-Lysin und Nickelsulfat behandelt. Empirisch ermittelte Aktivitätswerte sind hervorgehoben, alle weiteren Werte wurden berechnet. Die Umrechnung von g in cm<sup>2</sup> basiert auf der Annahme, dass 1 mL gequollener poröser Träger eine Fläche von mindestens 5 m<sup>2</sup> besitzt [Sigma-Aldrich, 2006]. Nach eigenen Untersuchungen entsprechen 1 g feuchte *beads* 1,48 mL, somit besitzen 1 g feuchte *beads* eine Fläche von 7,4 m<sup>2</sup>. Die trägergebundene Enzymmenge wurde anhand der Aktivitätsdifferenz, also der immobilisierten Aktivität und der jeweiligen spezifischen Enzymaktivität berechnet. Folgende spezifische Aktivitäten wurden zur Kalkulation herangezogen. rPK: 360 U/mg (Ni-Sep), 416 U/mg (ATS), 430 U/mg (PP); rPK-CT-His120: 42 U/mg (Ni-Sep), 409 U/mg (PP); rMicNuc: 502 U/mg; rMicNuc Cys-Einfach-Variante: 360 U/mg; rMicNuc Cys-Zweifach-Variante: 380 U/mg; rMicNuc Cys-Dreifach-Variante: 469 U/mg.

Enzym	Trägergebundene Aktivität							Trägergebundene Enzymmenge						
	Ni-Sep	ATS	Ni-Sep	ATS	PP [mU/cm <sup>2</sup> ]			Ni-Sep	ATS	Ni-Sep	ATS	PP [µg/cm <sup>2</sup> ]		
	[U/g]		[mU/cm <sup>2</sup> ]		unmodifi- ziert	epoxid	Ni-NTA	[mg/g]		[µg/cm <sup>2</sup> ]		unmodi- fiziert	epoxid	Ni-NTA
rPK	<b>0</b>	<b>2</b>	0	0,027	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	n/a	0,006	0,214	0,000	0,004	0,095	0,033	n/a
rPK-CT-His120	<b>9</b>	n/a	0,122	n/a	n/a	n/a	<b>0,4</b>	0,833	n/a	0,011	n/a	n/a	n/a	0,230
rMicNuc	<b>5</b>	<b>1</b>	0,068	0,014	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,08</b>	2,169	0,004	0,029	0,000	0,235	0,237	0,211
rMicNuc-Einfach	n/a	<b>7</b>	n/a	0,095				n/a	2,247	n/a	0,030			
rMicNuc-Zweifach	n/a	<b>6</b>	n/a	0,081				n/a	1,411	n/a	0,019			
rMicNuc-Dreifach	<b>4</b>	<b>7</b>	0,054	0,095				1,305	1,220	0,018	0,016			

## 4.2.2 Immobilisierung an PP-Oberflächen

Polypropylen (PP) ist ein kostengünstiges, chemisch stabiles Polymermaterial mit einer großen Hydrophobizität [Hausman *et al.*, 2009]. Der Kontaktwinkel den ein Flüssigkeitstropfen auf unmodifizierten PP bildet, liegt bei etwa 80 ° [Felekoglu *et al.*, 2009]. PP besitzt keine reaktiven, chemischen Gruppen mit denen Proteine interagieren können. Die Kopplung zwischen unmodifiziertem PP und Proteinen basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen [Cordeiro *et al.*, 2011; Fialova *et al.*, 2012], dabei erreicht die Menge an adsorbierten Protein ein Maximum in den pH-Bereichen des isoelektrischen Punkts der jeweiligen Proteine [Kim und Yoon, 2002]. Neben der Methode der Plasmabehandlung zur Oberflächenfunktionalisierung von PP [Felekoglu *et al.*, 2009; Oehr *et al.*, 1999; Sciarratta *et al.*, 2005] werden z.B. Polymere mittels Chromtrioxid oder Schwefelsäure oxidiert [Tao *et al.*, 2001], Copolymerisationen z.B. mit konjugierten Dienen verwendet [Arnold *et al.*, 2002] oder mit Gamma-Strahlung modifiziert [Abiona und Osinkolu, 2010]. Viele dieser Methoden führen zum Stabilitätsverlust und zur Faserdestrukturierung. Im Gegensatz dazu gilt die Plasmamodifikation als vielseitige, sanfte und umweltfreundliche Alternative zur Oberflächenbehandlung von Polymeren [Felekoglu *et al.*, 2009]. Um die Histidin-getaggte rPK und rMicNuc auf die PP-Folien zielgerichtet zu immobilisieren, wurden die unmodifizierten Folien im ersten Schritt unter Niederdruckplasma mit 2,3-Epoxypropylmethacrylat (EPMA) beschichtet. In Abbildung 4-5 (oben) ist dazu das Reaktionsschema dargestellt. Die eingeführten Epoxidgruppen reagieren mit nukleophilen Gruppen von Proteinen in folgender Priorität: Thiol → Amino → Hydroxyl → aromatisches Hydroxyl, Guanidino, Imidazol [Wong, 1991]. Mittels DTT-Reduktion konnte gezeigt werden, dass die nativen Cysteine im Fall der rPK nicht für eine Immobilisierung zugänglich waren (Abbildung 3-23 (A), Seite 103). Die Kopplung der rPK an PP<sub>epoxid</sub> erfolgte vermutlich über primäre Aminogruppen, wie bei der Kopplung der rMicNuc (keine Cysteine).

Im zweiten Schritt erfolgte eine nasschemische Modifikation der plasmabehandelten PP-Folien mit NTA (Nα,Nα-Bis(carboxymethyl)-L-Lysin) und Nickelsulfat. Die daraus resultierende Oberflächenstruktur ist schematisch in Abbildung 4-5, unten, gezeigt. Alle drei PP-Varianten, unmodifiziert, epoxidiert und Ni-NTA beschichtet, wurden innerhalb des Bioassays mit *Pseudomonas fluorescens* mit und ohne Enzymbehandlung eingesetzt. Die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der verschieden, modifizierten Polymere können sich auf die Besiedlung durch Mikroorganismen unterschiedlich auswirken. Durch die Plasmabehandlung von PP änderte sich der Oberflächencharakter von hydrophob zu hydrophil. Bei einer Niederdruckplasmabehandlung (Kaltplasmabehandlung) zwischen 60-180 W für 8 min, sinkt der Kontaktwinkel von PP von 80 ° auf unter 20 ° [Felekoglu *et al.*, 2009]. Durch die EPMA/Plasmamodifikation wurden die verwendeten PP-Folien ebenfalls stark hydrophil. Argon- bzw. Sauerstoffplasma können Carboxyl- und Hydroxylgruppen in der

PP-Oberfläche erzeugen [Massines *et al.*, 1998; Oktem *et al.*, 2000]. Dabei vergrößern die erzeugten reaktiven Gruppen die Oberflächenenergie und verkleinern gleichzeitig den Kontaktwinkel [Morent *et al.*, 2008].

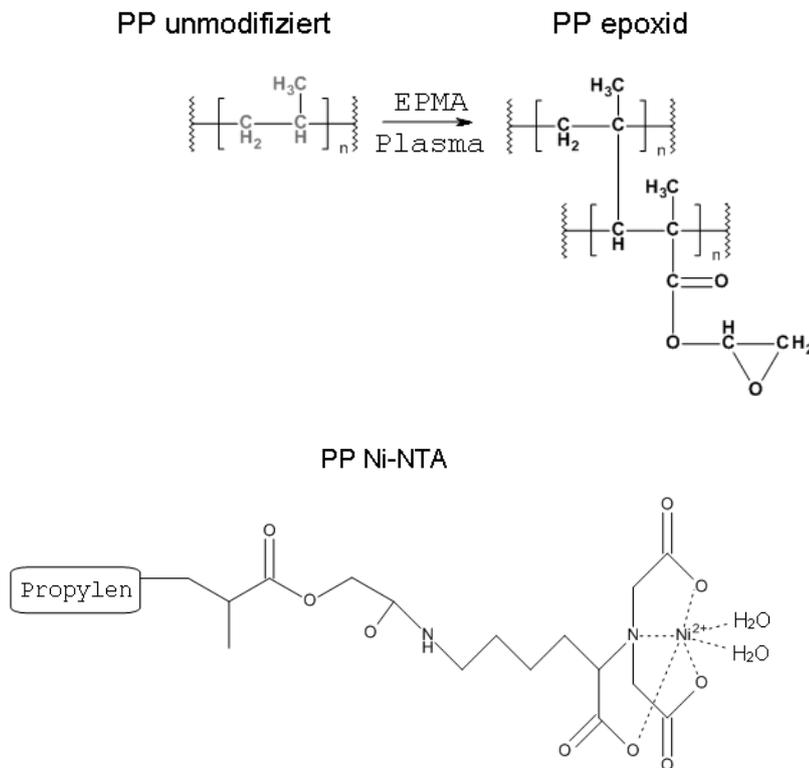


Abbildung 4-5: Reaktionsschema von PP mit EPMA während der Niederdruckplasmabehandlung (oben). Schematische Darstellung von PP<sub>Ni-NTA</sub> (unten). PP<sub>epoxid</sub>: PP-Folie mittels Plasmabehandlung mit EPMA beschichtet; PP<sub>Ni-NTA</sub>: epoxidierte PP-Folie mit Na<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Bis(carboxymethyl)-L-Lysin und Nickelsulfat behandelt.

Der Vorteil bei der verwendeten kontinuierlichen Niederdruckplasmabehandlung lag in der benötigten geringen Leistung, was zu einer überwiegenden Unversehrtheit der Epoxidringe und der PP-Polymer-Fasern führte [Oehr *et al.*, 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurden die PP-Folien mit Niederdruckplasma bei einer kontinuierlichen Leistung von 40 W für 10 min plasmabehandelt (Kapitel 2.29, Seite 66). In Abbildung 4-6 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von plasmabehandelten PP-Fasern gezeigt. Unmodifizierte PP-Fasern (Abbildung 4-6 (A)) und PP-Fasern, welche mit Plasma bei 60 W für 8 min behandelt wurden (Abbildung 4-6 (B)), zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Oberflächenrauigkeit. Fasern, die für 30 s mit einer Leistung von 300 W behandelt wurden (Abbildung 4-6 (C)), wiesen eine sichtbar höhere Rauigkeit auf [Felekoglu *et al.*, 2009; Fialova *et al.*, 2012].

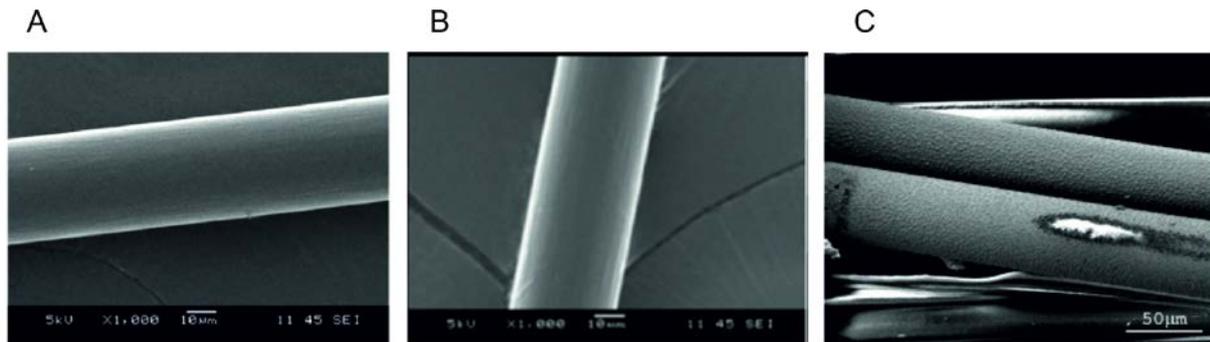


Abbildung 4-6: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen (SEM) von Polypropylen mit und ohne Plasmabehandlung. **(A)**: unmodifizierte PP-Fasern (Maßstab 10 µm, 1000x Vergrößerung) [Felekoglu *et al.*, 2009]; **(B)**: PP-Fasern mit O<sub>2</sub>-Niederdruckplasma für 8 min bei 60 W behandelt (Maßstab 10 µm, 1000x Vergrößerung) [Felekoglu *et al.*, 2009]; **(C)**: PP-Fasern mit Atmosphären-Plasma für 30 s bei 300 W behandelt (Maßstab 50 µm) [Fialova *et al.*, 2012].

PP<sub>Ni-NTA</sub>-Folien immobilisiert mit rPK-CT-His120 zeigten 99 % Immobilisierungsausbeute (Tabelle 3-5 (unten), Seite 113). rPK, welche durch eine hydrophobe Interaktion an unmodifizierter PP adsorbiert war, zeigte eine Immobilisierungsausbeute von 53 % und die geringste Immobilisierungseffizienz (0,2 %). Obwohl die geringste Immobilisierungsausbeute der rPK (18 %) an der epoxidierten PP-Folie auftrat, lag die Immobilisierungseffizienz mit 2,1 % hier am höchsten. Grund dafür könnte das *multipoint attachment* über die primären Amine der Lysinreste mit den Epoxidgruppen sein. Durch den 24 stündigen Blockschrift der Epoxidgruppen mit 5 % 2-Mercaptoethanol nach Enzyminkubation könnte das *multipoint attachment* verbessert werden [Mateo *et al.*, 2002], was zu höheren Immobilisierungseffizienzen und Stabilitäten führt. Der Überschuss an Thiolgruppen durch 2-Mercaptoethanol stoppt weitere Interaktionen zwischen Enzym und Epoxidgruppen. Während die Immobilisierungseffizienz der rPK-His120 an Ni-Sepharose 26 % betrug, lag diese bei PP<sub>Ni-NTA</sub> nur bei 0,4 % (siehe Tabelle 3-5 (unten), Seite 113). Vermutlich genügt die Länge des *Spacers* aus EPMA und NTA nicht, um eine weitere Adsorption mit dem PP zu unterbinden. Dadurch ist das aktive Zentrum nicht mehr für das Substrat zugänglich, ähnlich der ungerichteten Adsorption der rPK an unmodifizierte PP-Folie. Alternativ wäre die Verwendung von Polyacrylsäure als *Spacer* denkbar [Zhang *et al.*, 2013]. Nouaimi *et al.* untersuchten verschiedene *Spacer* zur Immobilisierung von Trypsin auf Polyester und konnten die höchste Aktivität sowie die größte Menge an immobilisiertem Enzym bei Verwendung des größten *Spacers* (BSA) beobachten [Nouaimi *et al.*, 2001]. Die am höchsten immobilisierte Enzymmenge wurde mit 0,23 µg/cm<sup>2</sup> für Folie PP<sub>Ni-NTA</sub> kalkuliert (Tabelle 4-5, Seite 137). Die geringste Enzymmenge mit 0,033 µg/cm<sup>2</sup> konnte für PP<sub>epoxid</sub> gezeigt werden. Diese Werte lassen sich mit denen von Tasso *et al.* vergleichen [Tasso *et al.*, 2009a]. Sie verwendeten für die Immobilisierung von Subtilisin A zweidimensionale POMA-Copolymer-Filme (Poly-Octadecan-Maleinsäureanhydrid), an denen sie eine maximale Enzymmenge von 0,4 µg/cm<sup>2</sup> immobilisieren konnten (siehe Abbildung 4-7). Die

POMA-Oberfläche ähnelt der zweidimensionalen Epoxidmonolage der PP-Folien. Tasso *et al.* verwendeten Enzymlösungen mit bis zu 30 mg/mL, wobei nach 10 mg/mL eine Sättigung der Oberfläche zu beobachten war. Bei der geringsten Ausgangskonzentration einer Subtilisin A-Lösung von 0,5 mg/mL wurden Enzymmengen von 0,12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  erreicht. Bei der Immobilisierung von rPK bzw. rMicNuc an PP-Folien wurden wesentlich geringere Proteinkonzentrationen eingesetzt (siehe Abschnitt 2.29). Es wurden Enzymlösungen zwischen 0,002-0,0024 mg/mL eingesetzt. Zur Steigerung der immobilisierten Enzymmenge könnten höhere Startenzymkonzentrationen [Tasso *et al.*, 2009a] oder poröse PP-Folien eingesetzt werden [Tanioka *et al.*, 1998]. Laut Slovakova *et al.* könnte der Einsatz von Kalzium während der Immobilisierung zur Verbesserung der immobilisierten rPK-Proteinmenge beitragen [Slováková *et al.*, 2008]. Zudem können dreidimensionale Oberflächenstrukturen wie PEMA (Poly-Ethylen-Maleinsäureanhydrid) zu Erhöhung der immobilisierten Enzymmengen führen (siehe Abbildung 4-7).

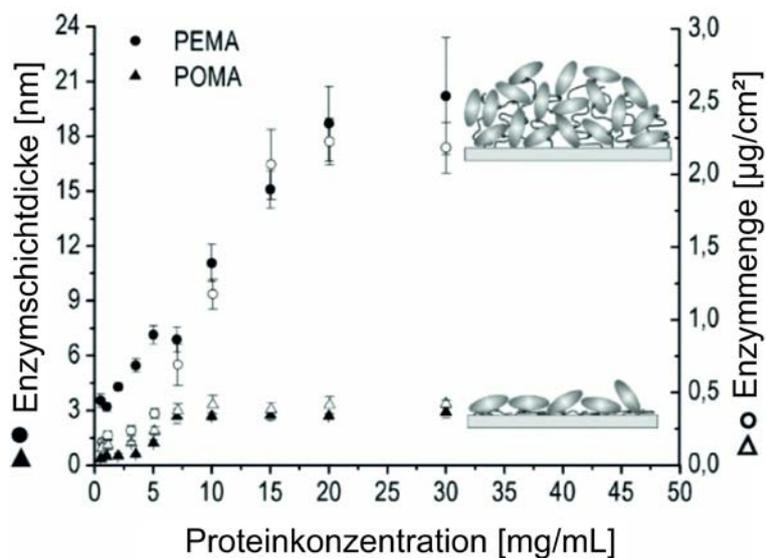


Abbildung 4-7: Übersicht der immobilisierten Enzymmenge und der Schichtdicke nach Immobilisierung von Subtilisin A in Abhängigkeit der eingesetzten Proteinkonzentration, an die zweidimensionale Struktur der POMA-Copolymerfilme (Dreieck) und dreidimensionale Struktur der PEMA-Copolymerfilme (Kreis). POMA (Poly-Octadecene-Maleinsäureanhydrid), PEMA (Poly-Ethylen-Maleinsäureanhydrid) (nach [Tasso *et al.*, 2009a] geändert).

Trotz der geringen Immobilisierungseffizienz von rPK-CT-His120 an  $\text{PP}_{\text{Ni-NTA}}$  konnte die höchste trägergebundene Aktivität mit 0,4 mU/cm<sup>2</sup> gemessen werden (Tabelle 4-5, Seite 137). Diese zeigte eine geringere Lagerstabilität als bei der ungerichteten Immobilisierung von rPK an  $\text{PP}_{\text{epoxid}}$  (Abbildung 3-27, Seite 109). Diese Beobachtungen sind vermutlich auf die einfache Immobilisierung über His-tag, im Vergleich zum *multipoint attachment*, zurückzuführen. Der Vorteil in der His-tag und Ni-NTA-Komplexbildung liegt in der Wiederbeladung. Die  $\text{PP}_{\text{Ni-NTA}}$ -Folie konnte in vier Zyklen mit rPK-CT-His120 neubeladen bzw. eluiert werden (Abbildung 3-28, Seite 111). Tasso *et al.* zeigten bereits nach einer 24 h

Lagerung in Millipore-Wasser Aktivitätsverluste von über 50 %. Die POMA- bzw. PEMA-Oberflächen mit der höchsten Aktivität, zeigten ebenfalls den größten Aktivitätsverlust [Tasso, 2009]. Im Vergleich zeigten in der vorliegenden Arbeit rPK-beschichtete PP-Folien erst nach 15 Tagen ( $PP_{Ni-NTA}$ ) bzw. >55 Tagen ( $PP_{epoxid}$ ) Aktivitätsverluste von 50 % (siehe Abbildung 3-27).

Im Fall der rMicNuc-Immobilisierung an den unterschiedlich modifizierten PP-Folien zeigten alle Versuche sehr hohe Immobilisierungsausbeuten zwischen 87-99 % (siehe Tabelle 3-5, Seite 113). Obwohl die Diffusionslimitierung an den nicht-porösen PP-Folien, im Vergleich zu den eingesetzten porösen Trägern, zu vernachlässigen ist, konnte nur an  $PP_{Ni-NTA}$  eine Immobilisierungseffizienz von 0,1 % ermittelt werden. Bei den unmodifizierten Folien scheint die Adsorption über hydrophobe Wechselwirkungen zur kompletten Inaktivierung der rMicNuc zu führen. Dennoch wurden ähnliche Enzymmengen an der Folie gekoppelt, aber es konnte keine trägergebundene rMicNuc-Aktivität nachgewiesen werden (Tabelle 4-5, Seite 137). Eventuell adsorbiert das DNA-Substrat ebenfalls stark an die PP-Folien, was den Zugang zum aktiven Zentrum der rMicNuc zusätzlich erschwert. Es bleibt weiter unklar, weshalb die Immobilisierungseffizienz der rMicNuc bei der Immobilisierung an PP-Folien so gering blieb. Niedermolekulare Substrate könnten zur Aufklärung dieser Fragestellung beitragen.

### 4.3 Untersuchungen zur Biofilmprävention

Polypropylen (PP) besitzt aufgrund der geringen Oberflächenenergie von  $-67,2 \text{ mJ/m}^2$  eine große Hydrophobizität [Oliveira *et al.*, 2001]. Generell steigt die Hydrophobizität bei sinkender Oberflächenenergie. Die meisten Bakterien besiedeln eher hydrophobe Oberflächen [Van Loosdrecht *et al.*, 1987]. Durch die Plasmabehandlung der PP-Folie bekommt diese einen stark hydrophilen Charakter und die bakterielle Adhäsion wird verschlechtert. Dies lässt sich im Vergleich des Bedeckungsgrads zwischen PP und  $PP_{epoxid}$  ohne Enzymbehandlung in Tabelle 3-6 auf Seite 118 erkennen. Oliveira *et al.* konnten die höchste bakterielle Adhäsion von *Alcaligenes denitrificans*-Zellen an Materialien mit der geringsten Oberflächenenergie (PP) erkennen [Oliveira *et al.*, 2001]. Es wurde beobachtet, dass die größte Adhäsion zwischen hydrophilen Bakterienzellen und hydrophoben Oberflächen besteht. In einem weiteren Versuch steigerten Oliveira *et al.* die Hydrophilität von Zellosediacetatoberflächen und untersuchten die Adhäsion mit *Staphylococcus epidermidis*-Zellen. Oberflächen mit gesteigerter Hydrophilität zeigten signifikant weniger adhäsierete Zellen. Van Loosdrecht *et al.* untersuchten die Hydrophobizität von *Pseudomonas fluorescens*-Zellen mittels Kontaktwinkelmessung und ermittelten  $21^\circ$  [Van Loosdrecht *et al.*, 1987]. Das erklärt warum die sehr hydrophilen Pseudomonaden auf unmodifizierten PP-Folien

besonders stark adhäsieren. Auch die Ausbildung von Zahnplaque ist an hydrophoben Oberflächen größer [Bruinsma *et al.*, 2001]. Zhu *et al.* beschichteten PP mit Thiolgruppen und Silberionen und beobachteten eine zunehmende Hydrophilität, die zur verminderten bakteriellen Adhäsion mit *E. coli*-Zellen führte [Zhu *et al.*, 2011]. Außerdem konnte mittels SEM-Aufnahmen eine Senkung der Oberflächenrauigkeit nach der PP-Modifikation nachgewiesen werden. Glatte Oberflächen zeigten einen erhöhten *Antifouling*-Effekt als raue Oberflächen [Knoell *et al.*, 1999; Pasmore *et al.*, 2001]. Ob sich in der vorliegenden Arbeit durch die einzelnen Modifikationen die Oberflächenrauigkeit von PP geändert hat, bleibt zu untersuchen.

Der höchste Bedeckungsgrad von 0,93 % (Tabelle 3-6) wurde an den mit Ni-NTA modifizierten PP-Folien ( $PP_{Ni-NTA}$ ) gemessen. Zur Entwicklung von *feed spacer* innerhalb der Umkehrosmose, modifizierten Hausmann *et al.* PP-Folien mit EPMA sowie Cu-IDA und konnten nach 24 h Inkubation eine 14-fach verminderte Adhäsion mit *E. coli*-Zellen zeigen [Hausman *et al.*, 2009]. Zudem zeigten Kupfer- oder Nickel-beschichtete Oberflächen verstärkte *Antifouling*-Effekte [Cao *et al.*, 2011; Kleinau, 1980]. Ein Grund für die verstärkte *Pseudomonas fluorescens*-Adhäsion liegt vermutlich in der geringeren Nickelkonzentration im Vergleich zur Kupferkonzentration bei Hausman *et al.*, welche sich in keiner sichtbaren Blaufärbung der PP-Folie äußerte. Weiter ist das Adhäsionsverhalten von *E. coli* und *Pseudomonas fluorescens* unterschiedlich. So produziert *E. coli* weniger EPS als *Pseudomonas fluorescens*. Vermutlich hat die Ni-NTA-Behandlung auch einen negativen Einfluss auf die Oberflächenrauigkeit. In einem Vergleich zur Lebensdauer einzelner Mikroorganismen in Grundwasserbiofilmen zeigten Biofilm-assoziierte Pseudomonaden längere Lebenszyklen als assoziierte *E. coli*-Zellen [Banning *et al.*, 2003]. Nach der ungerichteten Immobilisierung der rPK an unmodifiziertes PP und der zielgerichteten Immobilisierung an  $PP_{Ni-NTA}$  zeigten beide Folien verringerte Bedeckungsgrade. Obwohl die im Bioassay eingesetzte trägergebundene rPK-Startaktivität bei  $PP_{epoxid}$ -Folien (0,1 mU/cm<sup>2</sup>) größer als an unmodifizierten Folien mit rPK-Immobilisierung war (0,03 mU/cm<sup>2</sup>), konnte hier keine Verbesserung des *Antifouling*-Effekts erreicht werden (Tabelle 3-6). Allerdings wurde an den epoxidierten Folien die geringste Enzymmenge mit 0,033 µg/cm<sup>2</sup> immobilisiert (Tabelle 4-5). Die Ergebnisse der Immobilisierung von rPK auf PP-Folien zeigten, dass in zwei von drei Fällen ein verbesserter *Antifouling*-Effekt zu verzeichnen ist. Das beste Ergebnis erzielte die zielgerichtete Immobilisierung der rPK-CT-His120 über Komplexbildung. Somit genügt bereits eine rPK-Aktivität zwischen 0,03-0,2 mU/cm<sup>2</sup>, um die Adhäsion von *Pseudomonas fluorescens* an PP-Folien zu verschlechtern. Dabei ist die Menge an immobilisierter rPK von entscheidender Bedeutung. Laut Leroy *et al.* besitzt selbst hitzeinaktiviertes Subtilisin einen *Antifouling*-Effekt in der Prävention von Biofilmformationen [Leroy *et al.*, 2008b]. Vermutlich trägt nicht nur die Enzymaktivität der rPK, sondern auch die immobilisierte Enzymmenge zur Senkung des Bedeckungsgrads von *Pseudomonas*

*fluorescens* bei. Außerdem zeigten Leroy *et al.* mit löslichem Subtilisin, dass mit zunehmender Inkubationszeit die Inhibition von bakterieller Adhäsion steigt. Langzeituntersuchungen der enzymbehandelten PP-Folien wären sinnvoll. Auch Leroy *et al.* schlugen eine direkte Immobilisierung von Subtilisin an Oberflächen vor. Generell verbessert sich der *Antifouling*-Effekt mit steigender, immobilisierter Enzymkonzentration und Enzymaktivität [Khan *et al.*, 2014; Tasso *et al.*, 2009b].

Beim Vergleich zwischen den POMA- und PEMA-Copolymerfilmen (Abbildung 4-7) zeigten die dreidimensionalen PEMA-Filme mit den höchsten Enzymaktivitäten die geringste Adhäsion durch die Grünalge *Ulva linza*. Außerdem konnten Tasso *et al.* zeigen, dass nach Subtilisin-Immobilisierung eine höhere *Antifouling*-Effizienz, als mit der gleichen Menge Subtilisin in Lösung, zu verzeichnen war [Tasso *et al.*, 2009b].

Im Fall der Immobilisierung von rPK an PP<sub>epoxid</sub> und rMicNuc an PP<sub>Ni-NTA</sub> wurde die Anheftung mit Pseudomonaden vergrößert. Die erzeugte Proteinschicht, welche als künstlicher *conditioning film* bezeichnet werden könnte, ändert die bakterielle Adhäsion. Unabhängig der hydrolytischen Aktivitäten auf der Trägeroberfläche kann diese Proteinschicht zur erhöhten Adhäsionen führen. In den Arbeiten von Tasso *et al.* zeigten nicht-enzymbeschichtete POMA-Oberflächen nach Inkubation mit *Ulva linza* etwa 100 adhäsierete Sporen pro mm<sup>2</sup>. Nach Immobilisierung von aktiven Subtilisin (0,3 µg/cm<sup>2</sup>) stieg die Zahl der Sporen auf 700/mm<sup>2</sup>. Bei der Immobilisierung von hitzeinaktiviertem Enzym, belief sich die Sporenzahl sogar auf über 1200/mm<sup>2</sup> [Tasso *et al.*, 2009b]. Der inhibitorische Effekt durch eine enzymatische Aktivität auf die bakterielle Adhäsion muss also über dem des negativen Adhäsionseffekts durch Protein-Immobilisierung liegen. Im Fall der rMicNuc wurde nur eine sehr geringe enzymatische Aktivität von 0,08 mU/cm<sup>2</sup> gemessen, welche durch das MMB um weitere 80 % minimiert wurde (Abbildung 3-29). Die immobilisierte Enzymmenge lag bei 0,2 µg/cm<sup>2</sup> aber im ähnlichen Bereich der rPK-Menge. Der negative Effekt durch die Protein-Immobilisierung auf die bakterielle Adhäsion ist somit größer, als ein positiver Effekt durch die Enzymaktivität. Der Bedeckungsgrad steigt von etwa 1 % ohne rMicNuc bis zu 6 % bei immobilisierter rMicNuc. Es bleibt unklar ob eine gesteigerte Nukleaseaktivität einen positiven *Antifouling*-Effekt im Fall von *Pseudomonas fluorescens* aufweisen könnte. Bei *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilmen konnte zumindest eine 2,5-fache Biofilminimierung durch Verwendung von löslicher rMicNuc nachgewiesen werden [Tang *et al.*, 2011]. Es ist bekannt, dass Biofilme von *Pseudomonas fluorescens* resistenter als die von *Pseudomonas aeruginosa* sein können [Johansen *et al.*, 1997]. Die Nukleaseaktivität der via Komplexbildung zielgerichtet immobilisierten rMicNuc auf PP-Folien zeigte keinen positiven *Antifouling*-Effekt gegenüber *Pseudomonas fluorescens*-Zellen. Die Immobilisierung führte im Gegenteil zur Steigerung der bakteriellen Adhäsion. Die Kopplung von PK (rPK-CT-His120) an PP<sub>Ni-NTA</sub> hingegen, führte zur Senkung der Adhäsion durch *Pseudomonas fluorescens*-Zellen um 25 %. Cordeiro *et al.* konnte eine Senkung der Adhäsion von

*Pseudomonas aeruginosa*-Zellen durch Subtilisin A-Immobilisierung um 44 % nachweisen [Cordeiro *et al.*, 2011]. Dabei zeigte auch diese Arbeitsgruppe hohe Standardabweichungen im Rahmen eines Bioassays. Zudem ist es schwierig bei einem Probenumfang von jeweils drei PP-Folien eine statistische Signifikanz, in einem biologischen System mit einer Vielzahl von Einflussgrößen, zu erreichen.

Es bleibt weiter von entscheidender Bedeutung, welche Art von Enzymen, an welchen Mikroorganismen zum Antifouling eingesetzt werden. Im Fall Cordeiro *et al.* zeigte Subtilisin A eine Verbesserung von 44 %, während immobilisierte Zellulase keine Wirkung auf die Besiedlung mit Pseudomonaden hatte [Cordeiro *et al.*, 2011]. Umgekehrt zeigte Subtilisin A keinen Effekt auf *Staphylococcus epidermidis*-Biofilme, während immobilisierte Zellulase eine Reduktion um 67 % verursachte.

Das in etwa gleich viele lebende Zellen, wie tote Zellen durch die CLSM-Auswertung detektiert werden konnten, steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Khan *et al.* [Khan *et al.*, 2014]. Sie untersuchten das *Biofouling*-Verhalten von Umkehrosomemembranen mit und ohne Enzymbehandlung (u.a. Subtilisin). Unabhängig davon wie sie die Membranen behandelten, blieb das Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen gleich groß. Die in Abbildung 3-31 beobachteten Zellhaufen bzw. Mikrokolonien, konnten auch durch Beobachtungen von Khan *et al.* und Zhu *et al.* bestätigt werden [Khan *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2011]. Khan *et al.* beobachteten weiter, dass die Mehrheit der toten Zellen in direkter Nähe zur Oberfläche lokalisiert waren und sich die lebenden Zellen auf den abgestorbenen Zellen ansiedelten. Dieses Phänomen erklärt die häufig vorkommenden Gelbtöne der Zellhaufen nach der CLSM-Auswertung, bei denen die Zellhaufen von *Pseudomonas fluorescens* sowohl lebende als auch tote Zellen enthielten. Vermutlich adhäsieren lebende Bakterienzellen an inaktivierten Enzymen auf der Oberfläche leichter, auf denen sich wiederum neue Zellen ansiedeln und aufgrund von verschlechterter Nährstoffzugänglichkeit sterben diese anschließend ab. Die toten Zellen wiederum bieten eine bessere Adhäsionsgrundlage, was zur Verbesserung der Besiedlung führt. Das würde erklären, warum bei der PP<sub>NI-NTA</sub>-Folie immobilisiert mit rMicNuc besonders viele bakterielle Zellhaufen und vermehrt tote Zellen zu beobachten waren (siehe Anhang, Abbildung 8-4). Dieser Hypothese widersprechen allerdings Ergebnisse von Zhu *et al.* Sie konnten bakterielle Zellhaufen (*E. coli* bzw. *Staphylococcus aureus*) auch auf unmodifiziertem Polypropylen (PP) nachweisen [Zhu *et al.*, 2011]. Die Zusammensetzung und die Eigenschaften von *Pseudomonas fluorescens*-Biofilmen unterscheiden sich jedoch von *Escherichia* und *Staphylococcus*.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Untersuchung von immobilisierter Proteinase K und Nuklease R zur Vermeidung der mikrobiologischen Biofilmbildung. In der Mehrheit der Veröffentlichungen wurden ausgebildete Biofilme durch den Einsatz dieser Enzyme zerstört oder von Oberflächen abgelöst. Aufgrund des breiten Anwendungsspektrums und der unspezifischen Hydrolyse von Peptiden und Nukleinsäuren, besitzen beide Enzyme ein Potential in der Biofilmprävention und damit zur Langlebigkeit diverser technischer Prozesse beizutragen. Es sollte eine Möglichkeit geschaffen werden, Oberflächen, welche mit Enzym beschichtet sind, zu reinigen und erneut mit Enzym zu beladen.

Dazu wurden die rPK und die rMicNuc erfolgreich hergestellt und mit einem Histidin-tag versehen. Im Fall der rPK (rPK-CT-His120) wurde erstmalig die Produktion einer C-terminal His-getaggen PK in *Pichia pastoris* X33 gezeigt. Unklar bleibt, was das Abspalten des Peptid-tags am C-terminus vermittelt. rPK konnte mit einer Ausbeute von 150 mg/L in *Pichia pastoris* X33 produziert werden. Die spezifische Aktivität der gereinigten Enzymlösung lag bei ~430 U/mg (rPK) und ~409 U/mg (rPK-CT-His120).

Weiter wurden Cysteine in die native rMicNuc-AS-Struktur eingeführt. Für rMicNuc, produziert in *E. coli* BL21Gold (DE3), konnten Proteinkonzentrationen von etwa 250 mg/L erzielt werden. Die spezifische Aktivität der rMicNuc wurde auf ~456 U/mg bestimmt. Die Proteinausbeute der rMicNuc Cystein-Varianten und deren spezifische Aktivität, war aufgrund von intra- bzw. intermolekularer Disulfidbrücken herabgesetzt.

Sowohl durch Komplexbildung als auch durch Sulfidbrückenbildung ist es gelungen enzymatisch aktive Oberflächen (Sephrose) zu erzeugen. Diese Oberflächen wiesen gute Lagerstabilitäten auf (Restaktivitäten nach acht Monaten zwischen 60-100 %) und zeigten keinen signifikanten Aktivitätsverlust nach Mehrfachverwendung innerhalb sechs Zyklen. Die wiederholte Anwendung konnte durch Elutionseffizienzen von über 80 % nachgewiesen werden.

Durch die zielgerichtete Immobilisierung von rPK-CT-His120 an Polypropylen (PP)-Folien konnte die Besiedlung durch *Pseudomonas fluorescens*-Zellen um 25 % verringert werden. Die PP-Folien mit zielgerichtet immobilisierter rMicNuc führten zu keiner reduzierten Anheftung, sondern steigerten den bakteriellen Bedeckungsgrad signifikant.

Die Verwendung von Enzymen zur Biofilmprävention war bislang sehr begrenzt. Zum einen, durch die geringe Anzahl an Techniken um den Effekt von Enzymen, bezogen auf die EPS von Mikroorganismen und die Beschaffenheit von Oberflächen genauer zu evaluieren. Zum anderen, aufgrund der geringen Kosten alternativer Chemikalien. Zwar konnte mithilfe einzelner Enzyme (im Besonderen Subtilisin) die Biofilmbildung ausgewählter Bakterien gehemmt oder verringert werden, allerdings sind die Erfolgsaussichten durch die Anwendung einzelner Enzyme aufgrund der Heterogenität der Biofilmmatrizen verschiedener

Mikroorganismen eher begrenzt. Das hoch komplexe Zusammenspiel mehrerer Mikroorganismen und verschiedener Polymerklassen zum Aufbau eines Biofilms, kann nur durch Zusammenwirken mehrerer Enzymklassen effektiv vermieden werden. Es wäre von Vorteil Proteinase K und Nuklease R sowie weitere Enzyme wie Zellulasen oder Glykosidasen gleichermaßen auf Oberflächen zu immobilisieren. Die vorliegende Arbeit soll grundlegend dazu beitragen neue Anwendungsbereiche für rekombiante PK und MicNuc im Bereich Biofilmbekämpfung zu etablieren und die zukünftige Beseitigung von Biofilmen mithilfe von nachhaltigen und biologischen Verfahren zu realisieren.

## 6 Ausblick

Neben der Steigerung der Proteinausbeuten beider Enzyme durch Optimierung der verwendeten Fermentationen, gilt es besonders weiterführende Untersuchungen anzustellen, weshalb es im Fall der rPK-Produktion in *Pichia pastoris* zur Spaltung am C-Terminus kam. Dazu sollten Fermentationen mit gesenktem pH-Wert von 3,0 und Proteaseinhibitoren durchgeführt werden. Der Einfluss extrazellulär vorliegender Proteasen auf die rPK-Degradation könnte detailliert aufgeklärt werden. Außerdem wäre ein optimiertes Screening auf genomische Mehrfachinsertionen des Pro-PK-Gens in *Pichia pastoris* sinnvoll, um Klone mit höheren Proteaseaktivitäten zu generieren.

Weiterführende Untersuchungen am C-Terminus der rPK, könnten zur Detektion von Varianten mit verlängertem His-tag (>H<sub>3</sub>) führen. Sollte die Spaltstelle stets zwei bis drei AS nach dem nativen C-Terminus A279 auftreten, könnte dieser um einige AS verkürzt werden, um einen 6xHis-tag oder höher zu erzeugen.

Durch eigens synthetisierte, niedermolekulare Substrate zur Bestimmung der rMicNuc-Aktivität könnten bessere Aussagen über Immobilisierungseffizienzen und Aktivitätsausbeuten während der Immobilisierung gemacht werden. Im Zuge dessen sollte die Thermostabilität von unterschiedlich immobilisierter rMicNuc und rPK untersucht werden. Falls es bei der Kopplung zwischen gentechnisch inserierten Cysteinen und modifizierter Trägeroberfläche zu *multipoint attachment*-Ereignissen kommt, könnte dies über die Stabilität bei höheren Temperaturen rückgeschlossen werden.

Die Enzymmenge innerhalb der Immobilisierung an PP-Folien sollte optimiert werden. Dazu könnten zum einen mehr reaktive Gruppen, z.B. durch veränderte Plasmabehandlung oder dreidimensionale mehrschichtige Strukturen, z.B. mit Polyacrylsäure oder Polyanilin eingeführt werden. Dadurch würde sich der Enzymabstand zur Oberfläche vergrößern und negative Adsorptionseffekte, welche die Enzymaktivität beeinflussen, könnten verringert werden.

Am Beispiel der zielgerichtet an PP immobilisierten rPK konnte eine geringere Besiedlung mit *Pseudomonas fluorescens* beobachtet werden. Im Fall der rMicNuc führte die Kopplung zu einem vergrößerten Bewuchs. Allerdings ist weiter unklar, ob rMicNuc keinen Einfluss auf die EPS und somit die Besiedlung mit *Pseudomonas fluorescens* besitzt oder ob die immobilisierte Aktivität zu gering für einen positiven *Antifouling*-Effekt war. Im Zuge dessen, sollten Langzeitversuche im Bioassay über 24 h durchgeführt werden. Besonders interessant ist die Durchführung von Abspüluntersuchungen nach Tasse *et al.* Während beispielsweise die Sporenzahl der Grünalge *Ulva linza* auf der PEMA-Oberfläche ohne Enzym, im Vergleich zu immobilisiertem Enzym, nach einem einfachen Waschschrift stieg, konnte nach dem Abspülen der Oberfläche mit einem Wasserstrahl bei 34 kPa wesentlich mehr Sporen abgelöst werden, wenn die PEMA-Oberfläche zuvor mit aktivem Enzym beschichtet wurde.

Aufgrund dieser Beobachtungen und der Tatsache, dass die verwendeten PP-Folien durch dreimaliges mechanisches Waschen bzw. Eintauchen in Leitungswasser von nicht adhäsierten *Pseudomonas fluorescens*-Zellen befreit wurden, könnten Abspüluntersuchungen mit einem Wasserstrahl weitere Erkenntnisse über den *Antifouling*-Effekt aktiver rPK geben. Möglicherweise ist der Bedeckungsgrad auf den PP-Folien mit aktivem Enzym nach Wasserstrahlspülung bei 34 kPa geringer, als nach dem mechanischen Waschschrift in der vorliegenden Arbeit. Des Weiteren wäre ein Vergleich zwischen löslichen- und immobilisierten- sowie hitzeinaktivierten Enzymmengen bezogen auf den Bedeckungsgrad von Interesse.

Da Nukleasen vermehrt bei *Staphylococccen* zum Biofilmabbau verwendet wurden, wären unter anderem auch Bioassays mit *Staphylococcus aureus* denkbar.

## 7 Literatur

- Abdelhady, W., Bayer, A. S., Seidl, K., Nast, C. C., Kiedrowski, M. R., Horswill, A. R., Yeaman, M. R. und Xiong, Y. Q. (2013). "Reduced Vancomycin Susceptibility in an In Vitro Catheter-Related Biofilm Model Correlates with Poor Therapeutic Outcomes in Experimental Endocarditis Due to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**, 1447-1454.
- Abiona, A. A. und Osinkolu, A. G. (2010). "Gamma-irradiation induced property modification of polypropylene." *International Journal of the Physical Sciences*, **5**, 960-967.
- ABRF. (2014). "Delta Mass- A Database of Protein Post Translational Modifications." Association of Biomolecular Resource Facilities (ABRF), <http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home?AvgMass=all>.
- Al-Fattani, M. A. und Douglas, L. J. (2006). "Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance." *Journal of Medical Microbiology*, **55**, 999-1008.
- Alcantara, A., Ballesteros, A., Heras, A. M., Montero, J. M. und Sinisterra, J. V. (1988). "Behavior and application of immobilized micrococcal nuclease." *Annals of the New York Academy of Sciences*, **542**, 1-6.
- Aldridge, Chmurny, A. B. F., Durham, D. R. G. und Roberts, R. L. "Proteases to inhibit and remove biofilm." EP 0 590 746 B1.
- Allermann, K. und Schneider, I. "Antifouling paint composition comprising rosin and enzyme." WO0172911 (A1).
- Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M. und Tolker-Nielsen, T. (2006). "A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms." *Molecular Microbiology*, **59**, 1114-1128.
- Anfinsen, C. B., Cuatrecasas, P. und Taniuchi, H. "Staphylococcal nuclease. Chemical properties and catalysis." 177-204.
- Appendini, P. und Hotchkiss, J. H. (1997). "Immobilization of Lysozyme on Food Contact Polymers as Potential Antimicrobial Films." *Packaging Technology and Science*, **10**, 271-279.
- Apweiler R., B. A., Wu C.H., Barker W.C., Boeckmann B., Ferro , S., G. E., Huang H., Lopez R., Magrane M., Martin M.J., und Natale D.A., O. D. C., Redaschi N. and Yeh L.L. (2004). "UniProt: the Universal Protein knowledgebase." *Nucleic Acids Res.*, **32**.
- Argüello, M. A., Álvarez, S., Riera, F. A. und Álvarez, R. (2002). "Enzymatic Cleaning of Inorganic Ultrafiltration Membranes Fouled by Whey Proteins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1951-1958.
- Argüello, M. A., Álvarez, S., Riera, F. A. und Álvarez, R. (2003). "Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes used for whey protein fractionation." *Journal of Membrane Science*, **216**, 121-134.
- Arnold, M., Bornemann, S., Schimmel, T. und Heinze, T. (2002). "Modified polypropylenes by copolymerization with nonconjugated dienes and additional chemical reactions." *Macromolecular Symposia*, **181**, 5-16.
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T. und Atroshi, F. (2004). "Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms." *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **7**, 55-64.
- Baer. (2005). "Struktur-Funktionsuntersuchungen von humaner Dipeptidylpeptidase IV und Prolylendopeptidase in Bezug auf die Hydrolyse von artifiziellen und physiologischen Substraten," Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät (Fachbereich Biochemie/Biotechnologie), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Bajorath, J., Hinrichs, W. und Saenger, W. (1988). "THE ENZYMATIC-ACTIVITY OF PROTEINASE-K IS CONTROLLED BY CALCIUM." *European Journal of Biochemistry*, **176**, 441-447.

- Banning, N., Toze, S. und Mee, B. J. (2003). "Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system." *Microbiology*, **149**, 47-55.
- Barton, N. "Enzymes and the nucleic acids encoding them and methods for making and using them." WO2004066945 (A3).
- Bartosova, Z. und Krejci, L. (2014). "Nucleases in homologous recombination as targets for cancer therapy." *FEBS Letters*, **588**, 2446-2456.
- Bazaka, K., Jacob, M., Crawford, R. und Ivanova, E. (2012). "Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **95**, 299-311.
- Becker, D. M. und Guarente, L. (1991). "HIGH-EFFICIENCY TRANSFORMATION OF YEAST BY ELECTROPORATION." *Methods in Enzymology*, **194**, 182-187.
- Bereschenko, L. A., Prummel, H., Euverink, G. J. W., Stams, A. J. M. und van Loosdrecht, M. C. M. (2011). "Effect of conventional chemical treatment on the microbial population in a biofouling layer of reverse osmosis systems." *Water Research*, **45**, 405-416.
- Berg, R. D. (1996). "The indigenous gastrointestinal microflora." *Trends in Microbiology*, **4**, 430-435.
- Berlin, Y. A., D'Yakov, V. L. und Kolosov, M. N. (1974). "Hydrolysis of oligodeoxyribonucleotides by phosphohydrolases immobilized on cellulose." *Biokhimiya*, **39**, 747-50.
- Berliner, K., Hershkovitz, E., Ronen, Z. und Kasher, R. (2009). "Immobilization of Antimicrobial Peptides on Reverse Osmosis Polyamide Membranes: Potential Biofilm Inhibitors?" In: *Peptides for Youth* (Back, N., Cohen, I. R., Lajtha, A., Lambris, J. D. und Paoletti, R., eds.), Springer New York, 241-242, 611.
- Berry, D., Xi, C. und Raskin, L. (2006). "Microbial ecology of drinking water distribution systems." *Current Opinion in Biotechnology*, **17**, 297-302.
- Betzal, C., Pal, G. P. und Saenger, W. (1988). "3-DIMENSIONAL STRUCTURE OF PROTEINASE-K AT 0.15-NM RESOLUTION." *European Journal of Biochemistry*, **178**, 155-171.
- Betzal, C., Pal, G. P., Struck, M., Jany, K. D. und Saenger, W. (1986). "ACTIVE-SITE GEOMETRY OF PROTEINASE-K - CRYSTALLOGRAPHIC STUDY OF ITS COMPLEX WITH A DIPEPTIDE CHLOROMETHYL KETONE INHIBITOR." *FEBS Letters*, **197**, 105-110.
- Betzal, C., Teplyakov, A. V., Harutyunyan, E. H., Saenger, W. und Wilson, K. S. (1990). "Thermitase and proteinase K: a comparison of the refined three-dimensional structures of the native enzymes." *Protein Engineering*, **3**, 161-172.
- Beule, A. G. H., W. . (2007). "Bacterial Biofilms." *Laryngo-Rhino-Otol*, **86**, 886-898.
- Beyerodt, C. (2013). "persönliche Mitteilung."
- Bizily, S. P., Rugh, C. L., Summers, A. O. und Meagher, R. B. (1999). "Phytoremediation of methylmercury pollution: merB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 6808-6813.
- Blanco, R. M., Calvete, J. J. und Guisan, J. (1989). "Immobilization-stabilization of enzymes; variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multipoint attachment." *Enzyme and Microbial Technology*, **11**, 353-359.
- Block, H., Maertens, B., Priestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J. und Schaefer, F. (2011). "Reprint of: Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review." *Protein Expression and Purification*.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). "Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Böckelmann, U., Janke, A., Kuhn, R., Neu, T. R., Wecke, J., Lawrence, J. R. und Szewzyk, U. (2006). "Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure." *FEMS Microbiology Letters*, **262**, 31-38.

- Boehm, T., Pirie-Shepherd, S., Trinh, L.-B., Shiloach, J. und Folkman, J. (1999). "Disruption of the KEX1 gene in *Pichia pastoris* allows expression of full-length murine and human endostatin." *Yeast*, **15**, 563-572.
- Boles, B. R. und Horswill, A. R. (2008). "agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms." *PLoS Pathog*, **4**, e1000052.
- Boles, B. R. und Horswill, A. R. (2011). "Staphylococcal biofilm disassembly." *Trends in Microbiology*, **19**, 449-455.
- Boller, T., Meier, C. und Menzler, S. (2002). "EUPERGIT oxirane acrylic beads: How to make enzymes fit for biocatalysis." *Organic Process Research & Development*, **6**, 509-519.
- Bonaventura, C., Bonaventura, J. und Hooper, I. R. "Anti-fouling methods using enzyme coatings." US5998200 (A).
- Bothe, H. (2014). "Personal Communication- Streptavidin Sepharose High Performance Poresize." GE Healthcare Lifesciences, Germany.
- Bowen, J., Pettitt, M. E., Kendall, K., Leggett, G. J., Preece, J. A., Callow, M. E. und Callow, J. A. (2007). "The influence of surface lubricity on the adhesion of *Navicula perminuta* and *Ulva linza* to alkanethiol self-assembled monolayers." *Journal of the Royal Society Interface*, **4**, 473-477.
- Boyd, A. und Chakrabarty, A. M. (1994). "Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*." *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2355-2359.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bruinsma, G. M., van der Mei, H. C. und Busscher, H. J. (2001). "Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses." *Biomaterials*, **22**, 3217-3224.
- Brunner, W., Staub, D. und Leisinger, T. (1980). "Bacterial degradation of dichloromethane." *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 950-8.
- Budtz-Jorgensen, E., Kelstrup, J. und Poulsen, S. (1983). "Reduction of formation of denture plaque by a protease (Alcalase)." *Acta Odontol Scand*, **41**, 93-8.
- Burnette, W. N. (1981). "Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Analytical Biochemistry*, **112**, 195-203.
- Camarero, J. A. (2008). "Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports." *Biopolymers*, **90**, 450-458.
- Cantone, S., Ferrario, V., Corici, L., Ebert, C., Fattor, D., Spizzo, P. und Gardossi, L. (2013). "Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods." *Chemical Society Reviews*, **42**, 6262-6276.
- Cao, S., Wang, J., Chen, H. und Chen, D. (2011). "Progress of marine biofouling and antifouling technologies." *Chinese Science Bulletin*, 1-15.
- Carter, P. und Wells, J. A. (1988). "Dissecting the catalytic triad of a serine protease." *Nature*, **332**, 564-568.
- Catlin, B. W. und Cunningham, L. S. (1958). "Studies of extracellular and intracellular bacterial deoxyribonucleic acids." *J. Gen. Microbiol.*, **19**, 522-39.
- Cereghino, J. L. und Cregg, J. M. (2000). "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." *Fems Microbiology Reviews*, **24**, 45-66.
- Ceresana-Research. (2012). "Marktstudie Polypropylen." <http://www.ceresana.com/de/marktstudien/kunststoffe/polypropylen/>, p.732.
- Chaignon, P., Sadvovskaya, I., Ragunah, C., Ramasubbu, N., Kaplan, J. und Jabbouri, S. (2007). "Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **75**, 125-132.
- Chang, S. I. und Gray, K. A. (2003). "Chemical composition and Cu complexation characteristics of the extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Prepr. Ext. Abstr. ACS Natl. Meet., Am. Chem. Soc., Div. Environ. Chem.*, **43**, 529-530.
- Characklis, W. G. (1990). "Microbial fouling." In *Biofilms* ed., Wiley, New York, 523-584.

- Cherry, J. R. und Fidantsef, A. L. (2003). "Directed evolution of industrial enzymes: an update." *Current Opinion in Biotechnology*, **14**, 438-443.
- Cheryan, M. (1990). "Handbuch Ultrafiltration." B. Behr's Verlag GmbH&Co, Germany.
- Chiruvolu, V., Cregg, J. M. und Meagher, M. M. (1997). "Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations." *Enzyme and Microbial Technology*, **21**, 277-283.
- Christensen, B. E., Ertesvag, H., Beyenal, H. und Lewandowski, Z. (2001). "Resistance of biofilms containing alginate-producing bacteria to disintegration by an alginate degrading enzyme (AlgL)." *Biofouling*, **17**, 203-210.
- Clare, J. J., Romanos, M. A., Rayment, F. B., Rowedder, J. E., Smith, M. A., Payne, M. M., Sreekrishna, K. und Henwood, C. A. (1991). "Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies." *Gene*, **105**, 205-12.
- Cleland, W. W. (1964). "Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups\*." *Biochemistry*, **3**, 480-482.
- Cohn, E. J., Hughes, W. L. und Weare, J. H. (1947). "PREPARATION AND PROPERTIES OF SERUM AND PLASMA PROTEINS .13. CRYSTALLIZATION OF SERUM ALBUMINS FROM ETHANOL WATER MIXTURES." *Journal of the American Chemical Society*, **69**, 1753-&.
- Cole, R. B. und Editor. (1997). "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications." Wiley, 577 pp.
- Cone, J. L., Cusumano, C. L., Taniuchi, H. und Anfinsen, C. B. (1971). "Staphylococcal Nuclease (Foggi Strain): II. THE AMINO ACID SEQUENCE." *Journal of Biological Chemistry*, **246**, 3103-3110.
- Conrad, A., Kontro, M., Keinänen, M., Cadoret, A., Faure, P., Mansuy-Huault, L. und Block, J.-C. (2003). "Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs." *Lipids*, **38**, 1093-1105.
- Cordeiro, A. L., Hippius, C. und Werner, C. (2011). "Immobilized enzymes affect biofilm formation." *Biotechnology Letters*, **33**, 1897-1904.
- Cordeiro, A. L. und Werner, C. (2011). "Enzymes for Antifouling Strategies." *Journal of Adhesion Science and Technology*, **25**, 2317-2344.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. und Lappin-Scott, H. M. (1995). "Microbial Biofilms." *Annual Review of Microbiology*, **49**, 711-745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. und Greenberg, E. P. (1999). "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections." *Science*, **284**, 1318-1322.
- Cotton, F. A., Hazen, E. E. und Legg, M. J. (1979). "STAPHYLOCOCCAL NUCLEASE - PROPOSED MECHANISM OF ACTION BASED ON STRUCTURE OF ENZYME-THYMIDINE 3',5'-BISPHOSPHATE-CALCIUM ION COMPLEX AT 1.5-Å RESOLUTION." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**, 2551-2555.
- Cowan, D. A. und Fernandez-Lafuente, R. (2011). "Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization." *Enzyme and Microbial Technology*, **49**, 326-346.
- Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y. und Madden, K. R. (1985). "PICHIA-PASTORIS AS A HOST SYSTEM FOR TRANSFORMATIONS." *Molecular and Cellular Biology*, **5**, 3376-3385.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J. Y. und Higgins, D. R. (2000). "Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*." *Molecular Biotechnology*, **16**, 23-52.
- Crowe, J. S., Cooper, H. J., Smith, M. A., Sims, M. J., Parker, D. und Gewert, D. (1991). "IMPROVED CLONING EFFICIENCY OF POLYMERASE CHAIN-REACTION (PCR) PRODUCTS AFTER PROTEINASE-K DIGESTION." *Nucleic Acids Research*, **19**, 184-184.
- Cuatrecasas, P., Fuchs, S. und Anfinsen, C. B. (1967a). "The Binding of Nucleotides and Calcium to the Extracellular Nuclease of *Staphylococcus aureus* : STUDIES BY GEL FILTRATION." *Journal of Biological Chemistry*, **242**, 3063-3067.

- Cuatrecasas, P., Fuchs, S. und Anfinsen, C. B. (1967b). "CATALYTIC PROPERTIES AND SPECIFICITY OF EXTRACELLULAR NUCLEASE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS." *Journal of Biological Chemistry*, **242**, 1541-&.
- Cunningham, L., Catlin, B. W. und de Garihe, M. P. (1956). "A deoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes*." *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4642-5.
- Daly, R. und Hearn, M. T. W. (2005). "Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production." *Journal of Molecular Recognition*, **18**, 119-138.
- Damasceno, L., Huang, C., Jr. und Batt, C. (2012). "Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **93**, 31-39.
- Damasceno, L. M., Anderson, K. A., Ritter, G., Cregg, J. M., Old, L. J. und Batt, C. A. (2007). "Coexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 381-389.
- Damnjanovic, J. J., Zusa, M. G., Savanovic, J. K., Bezbradica, D. I. und Mijin, D. Z. (2011). "Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor." *J Mol Catal B Enzym*, **75**, 10-10.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. und Greenberg, E. P. (1998). "The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm." *Science*, **280**, 295-298.
- Deepthi, S., Venkatesh, R. und Sundaram, P. V. (1998). "Catalytic Efficiency of Covalently Modified Proteases against Proteinaceous Substrates." *Annals of the New York Academy of Sciences*, **864**, 521-523.
- Dekker, H. L., Van, S. J. W., Vollenbroek, E. G. M. und Wever, R. "Antifouling paint containing haloperoxidases and method to determine halide concentrations." WO9527009 (A1)
- Digan, M. E., Lair, S. V., Brierley, R. A., Siegel, R. S., Williams, M. E., Ellis, S. B., Kellaris, P. A., Provow, S. A., Craig, W. S., Velicelebi, G., Harpold, M. M. und Thill, G. P. (1989). "Continuous Production of a Novel Lysozyme via Secretion from the Yeast, *Pichia pastoris*." *Nat Biotech*, **7**, 160-164.
- Dobretsov, S., Xiong, H., Xu, Y., Levin, L. und Qian, P.-Y. (2007). "Novel Antifoulants: Inhibition of Larval Attachment by Proteases." *Marine Biotechnology*, **9**, 388-397.
- Dolashka, P., Filippi, B., Wilson, K. S., Betzel, C. und Genov, N. (1992). "SPECTROSCOPIC STUDIES ON PROTEINASE-K AND SUBTILISIN-DY - RELATION TO X-RAY MODELS." *International Journal of Peptide and Protein Research*, **40**, 465-471.
- Dong. (2004). "Quorum sensing and quorum-quenching enzymes." *The Journal of Microbiology*, **43**, 101-109.
- Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I. J. und Wishart, D. S. (2004). "PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps." *Nucleic Acids Research*, **32**, W660-W664.
- Donlan, R. M. (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging infectious diseases 2002." *Emerg Infect Dis*, **8**.
- Donlan, R. M. und Costerton, J. W. (2002). "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms." *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**, 167-193.
- Driss, D., Bhiri, F., ghorbel, R. und Chaabouni, S. E. (2012). "Cloning and constitutive expression of His-tagged xylanase GH 11 from *Penicillium occitanis* Pol6 in *Pichia pastoris* X33: Purification and characterization." *Protein Expression and Purification*, **83**, 8-14.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D. und Lang, H. (1974). "Proteinase K from *Tritirachium album* Limber." *European Journal of Biochemistry*, **47**, 91-97.
- Eppendorf. (2013). "Molekularbiologische Informationen: Daten, Fakten, Tipps und Tricks." Eppendorf <http://www.eppendorf.de/catstat/106/de/01.html>.
- ExpASy. (2010). "Compute pI/Mw Tool." SIB Swiss Institute of Bioinformatics [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/).

- Fairlie, W. D., Zhang, H.-P., Brown, P. K., Russell, P. K., Bauskin, A. R. und Breit, S. N. (2000). "Expression of a TGF- $\beta$ 2 superfamily protein, macrophage inhibitory cytokine-1, in the yeast *Pichia pastoris*." *Gene*, **254**, 67-76.
- Felekoglu, B., Tosun, K. und Baradan, B. (2009). "A comparative study on the flexural performance of plasma treated polypropylene fiber reinforced cementitious composites." *Journal of Materials Processing Technology*, **209**, 5133-5144.
- Fialova, M., Skacelova, D., Stahel, P. und Cernak, M. (2012). "IMPROVEMENT OF SURFACE PROPERTIES OF REINFORCING POLYPROPYLENE FIBRES BY ATMOSPHERIC PRESSURE PLASMA TREATMENT." *Chemické Listy*, **106**, S1439-S1442.
- Flemming, H.-C. (1995a). "Biofouling und Biokorrosion — die Folgen unerwünschter Biofilme." *Chemie Ingenieur Technik*, **67**, 1425-1430.
- Flemming, H.-C. (1998). "Relevance of biofilms for the biodeterioration of surfaces of polymeric materials\*." *Polymer Degradation and Stability*, **59**, 309-315.
- Flemming, H.-C. und Wingender, J. (2010). "The biofilm matrix." *Nat Rev Micro*, **8**, 623-633.
- Flemming, H. C. (1995b). "Biofouling bei Membranprozessen." Springer-Verlag, 181, ISBN 3-540-58596-6.
- Flemming, H. C. (2002). "Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasures." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**, 629-640.
- Flügge, C. (1886). "Die Mikroorganismen: Mit besonderer Berücksichtigung der Ätiologie der Infektionskrankheiten." F. C. W. Vogel., Leipzig, Germany, 2.
- Fredheim, E. G. A., Klingenberg, C., Rohde, H., Frankenberger, S., Gaustad, P., Flaegstad, T. und Sollid, J. E. (2009). "Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*." *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 1172-1180.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K. und Nielsen, P. H. (1996). "Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin." *Water Research*, **30**, 1749-1758.
- GE-Healthcare. (2005). "Instructions 71-5027-67 AE, Ni Sepharose™ High Performance."
- GE-Healthcare. (2006). "Instructions 18-1171-69 AG, Kwick Lab and Kwick Flow Cassettes".
- GE-Healthcare. (2007). "Instructions 52-1308-00 BB, PD-10 Desalting Columns."
- GE-Healthcare. (2008). "Instructions 71-7106-00 AF, Activated Thiol Sepharose 4 B."
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D. und Sand, W. (1998). "Importance of Extracellular Polymeric Substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for Bioleaching." *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 2743-2747.
- Genov, N., Filippi, B., Dolashka, P., Wilson, K. S. und Betzel, C. (1995). "Stability of subtilisins and related proteinases (subtilases)." *International Journal of Peptide and Protein Research*, **45**, 391-400.
- Georgieva, D., Genov, N., Voelter, W. und Betzel, C. (2006). "Catalytic efficiencies of alkaline proteinases from microorganisms." *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, **61**, 445-452.
- Gerard, J. T., Funke, B. R. und Case, C. L. (1998). "Microbiology: An Introduction." Benjamin/Cummings.
- Gerber, S., Kirchhof, K., Kressler, J. r., Schmelzer, C. E. H., Scholz, C., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008). "Cloning, expression, purification, and characterization of a designer protein with repetitive sequences." *Protein Expression and Purification*, **59**, 203-214.
- Gourinath, S., Degenhardt, M., Eschenburg, S., Moore, K., Delucas, L. J., Betzel, C. und Singh, T. P. (2001). "Mercury induced modifications in the stereochemistry of the active site through Cys-73 in a serine protease - Crystal structure of the complex of a partially modified proteinase K with mercury at 1.8 Å... resolution." *Indian J. Biochem. Biophys.*, **38**, 298-302.
- Grazú, V., López-Gallego, F., Montes, T., Abian, O., González, R., Hermoso, J. A., García, J. L., Mateo, C. und Guisán, J. M. (2010). "Promotion of multipoint covalent immobilization through different regions of genetically modified penicillin G acylase from *E. coli*." *Process Biochemistry*, **45**, 390-398.

- Guisan, J. und Ballesteros, A. (1979). "Preparation of immobilized sepharose-micrococcal nuclease derivatives: activity and stability." *Journal of Solid-Phase Biochemistry*, **4**, 245-252.
- Guisán, J., Melo, F. und Ballesteros, A. (1981a). "Determination of intrinsic properties of immobilized enzymes 1. Kinetic Studies on Sepharose-Staphylococcal Nuclease in the Absence of Diffusional Limitations." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **6**, 37-51.
- Guisán, J., Melo, F. und Ballesteros, A. (1981b). "Determination of intrinsic properties of immobilized enzymes 2. Kinetic Studies on Sepharose-Staphylococcal Nuclease in the Presence of Diffusional Limitations." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **6**, 25-36.
- Guisan, J. M. und Ballesteros, A. (1981). "Hydrolysis of nucleic acids by sepharose-micrococcal endonuclease." *Enzyme and Microbial Technology*, **3**, 313-320.
- Guisan, J. M., Polo, E., Aguado, J., Romero, M. D., Alvaro, G. und Guerra, M. J. (1997). "Immobilization-stabilization of thermolysin onto activated agarose gels." *Biocatalysis and Biotransformation*, **15**, 159-173.
- Guisan, J. M., Serrano, J. und Ballesteros, A. (1993). "Stabilization of Micrococcal Endonuclease by Immobilization on Agarose Gels Highly Activated with CNBr." *Biocatalysis and Biotransformation*, **8**, 81-89.
- Gunkel, F. A. und Gassen, H. G. (1989). "Proteinase K from *Tritirachium album* Limber." *European Journal of Biochemistry*, **179**, 185-194.
- Günther, M. (2013). "Untersuchungen zur gezielten Mutagenese der Proteinase K aus *Tritirachium album* Limber," Master, Institut für Pharmazie, AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Universität Halle-Wittenberg.
- Guo, J.-P. und Ma, Y. (2008). "High-level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris*." *Protein Expression and Purification*, **58**, 301-308.
- Gutcho, S. (1970). "Nucleotides as flavor enhancers." (Corporation, N. D., ed.), New Jersey, 181.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. und Stoodley, P. (2004). "Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases." *Nat Rev Micro*, **2**, 95-108.
- Hamade, R. und Yamamori, N. "Incorporating an enzyme and a substrate in paint matrix beforehand to allow said enzyme and said substrate to react with each other in said matrix to thereby produce said compound having antimicrobial activity." US6150146 (A).
- Hamade, R., Yamamori, N. und Okahata, Y. (1998). "Glucoxide derivatives for enzyme modification, lipid-coated enzymes, method of producing such enzymes and antifouling paint composition." Google Patents.
- Hanahan, D. (1983). "STUDIES ON TRANSFORMATION OF *ESCHERICHIA-COLI* WITH PLASMIDS." *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557-580.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. und Magner, E. (2009). "Understanding enzyme immobilisation." *Chemical Society Reviews*, **38**, 453-468.
- Hangler, M., BurmÄ, lle, M., Schneider, I., Allermann, K. und Jensen, B. (2009). "The serine protease Esperase HPF inhibits the formation of multispecies biofilm." *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, **25**, 667-674.
- Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E. und Al-Ahmad, A. (2007). "Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel in situ." *Archives of Oral Biology*, **52**, 1048-1056.
- Hasan, F., Shah, A. A. und Hameed, A. (2006). "Industrial applications of microbial lipases." *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 235-251.
- Hausman, R., Gullinkala, T. und Escobar, I. C. (2009). "Development of low-biofouling polypropylene feedspacers for reverse osmosis." *Journal of Applied Polymer Science*, **114**, 3068-3073.
- Hazan, Z., Zumeris, J., Jacob, H., Raskin, H., Kratysh, G., Vishnia, M., Dror, N., Barliya, T., Mandel, M. und Lavie, G. (2006). "Effective Prevention of Microbial Biofilm Formation

- on Medical Devices by Low-Energy Surface Acoustic Waves." *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, **50**, 4144-4152.
- Hedstrom, L. (2002). "Serine protease mechanism and specificity." *Chemical Reviews*, **102**, 4501-4523.
- Hehemann, J.-H., Redecke, L., Murugaiyan, J., von Bergen, M., Betzel, C. und Saborowski, R. (2008). "Autoproteolytic stability of a trypsin from the marine crab *Cancer pagurus*." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **370**, 566-571.
- Henrici, A. T. (1933). "Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique." *Journal of Bacteriology*, **25**, 277-287.
- Hermsdorf, N. (2011). "persönliche Mitteilung." Lanxess IAB Ionenaustauscher GmbH, Bitterfeld-Wolfen.
- Hernandez, K. und Fernandez-Lafuente, R. (2011). "Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance." *Enzyme and Microbial Technology*, **48**, 107-122.
- Herzberg. (2007). "Biofouling of reverse osmosis membranes: Role of biofilm-enhanced osmotic pressure." *Journal of Membrane Science*, **295**.
- Higgins, D., Cregg, J., Gleeson, M. G., White, C., Meininger, D. und Komives, E. (1998a). "Generation of Protease-Deficient Strains and Their Use in Heterologous Protein Expression." In: *Pichia Protocols*, Humana Press, 81-94, 103.
- Higgins, D., Cregg, J., Stratton, J., Chiruvolu, V. und Meagher, M. (1998b). "High Cell-Density Fermentation." In: *Pichia Protocols*, Humana Press, 107-120, 103.
- Higgins, D. R. (2001). "Overview of Protein Expression in *Pichia pastoris*." In: *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc.
- Hilz, H. und Fanick, W. (1978). "Divergent denaturation of proteases by urea and dodecylsulfate in the absence of substrate." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, **359**, 1447-50.
- Hilz, H., Wieggers, U. und Adamietz, P. (1975). "Stimulation of Proteinase K Action by Denaturing Agents: Application to the Isolation of Nucleic Acids and the Degradation of 'Masked' Proteins." *European Journal of Biochemistry*, **56**, 103-108.
- Hintermann, G., Fischer, H. M., Cramer, R. und Hutter, R. (1981). "SIMPLE PROCEDURE FOR DISTINGUISHING CCC, OC, AND L FORMS OF PLASMID DNA BY AGAROSE-GEL ELECTROPHORESIS." *Plasmid*, **5**, 371-373.
- Hofmeister, F. (1888). "Zur Lehre von der Wirkung der Salze." *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, **25**, 1-30.
- Hogan, C. (2013). "Retrieved from <http://www.eoearth.org/view/article/150368>" *Bacteria*.
- Honraet, K. und Nelis, H. J. (2006). "Use of the modified robbins device and fluorescent staining to screen plant extracts for the inhibition of *S. mutans* biofilm formation." *J Microbiol Methods*, **64**, 217-24.
- Huang, C., Jr., Damasceno, L. M., Anderson, K. A., Zhang, S., Old, L. J. und Batt, C. A. (2011). "A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **90**, 235-247.
- Huang, C. T., James, G., Pitt, W. G. und Stewart, P. S. (1996). "Effects of ultrasonic treatment on the efficacy of gentamicin against established *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **6**, 235-242.
- Huang, W., Wang, J. Q., Bhattacharyya, D. und Bachas, L. G. (1997). "Improving the activity of immobilized subtilisin by site-specific attachment to surfaces." *Analytical Chemistry*, **69**, 4601-4607.
- Huang, Y., Chen, Y., Mo, D., Cong, P. und He, Z. (2012). "Attenuated Secretion of the Thermostable Xylanase xynB from *Pichia pastoris* Using Synthesized Sequences Optimized from the Preferred Codon Usage in Yeast." *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 316-325.
- Huijs, F. M., Klijnstra, J. W. und Van, Z. J. "Antifouling coating comprising a polymer with functional groups bonded to an enzyme, EP1661955 (A1)".
- Hutchison, C. A., Phillips, S., Edgell, M. H., Gillam, S., Jahnke, P. und Smith, M. (1978). "MUTAGENESIS AT A SPECIFIC POSITION IN A DNA-SEQUENCE." *Journal of Biological Chemistry*, **253**, 6551-6560.

- Ikemura, H. und Inouye, M. (1988). "INVITRO PROCESSING OF PRO-SUBTILISIN PRODUCED IN ESCHERICHIA-COLI." *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 12959-12963.
- Ikemura, H., Takagi, H. und Inouye, M. (1987). "REQUIREMENT OF PRO-SEQUENCE FOR THE PRODUCTION OF ACTIVE SUBTILISIN-E IN ESCHERICHIA-COLI." *Journal of Biological Chemistry*, **262**, 7859-7864.
- Inouye, M. (1991). "INTRAMOLECULAR CHAPERONE - THE ROLE OF THE PRO-PEPTIDE IN PROTEIN FOLDING." *Enzyme*, **45**, 314-321.
- Invitok. (2008). "MSB® Spin PCRapace Kit." *Nutzerhandbuch*.
- Invitrogen. (2002). "Pichia Fermentation Process Guidelines Version B 053002."
- Invitrogen. (2008). "pGAPZ $\alpha$  A, B, and C- Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins." *Nutzerhandbuch*, **Katalognummer V200-20 und V205-20**.
- Invitrogen. (2010a). "EasySelect Pichia Expression Kit- For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ $\alpha$  in Pichia pastoris." *Nutzerhandbuch*, **Katalognummer K1740-01**.
- Invitrogen. (2010b). "pPICZ $\alpha$  A, B, and C - Pichia expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of recombinant proteins." *Nutzerhandbuch*, **Katalognummer V195-20**.
- Izano, E. A., Shah, S. M. und Kaplan, J. B. (2009). "Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable Haemophilus influenzae biofilms." *Microbial Pathogenesis*, **46**, 207-213.
- Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A.-K., Martinelle, M. und Enfors, S.-O. (2003a). "Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in Pichia pastoris fed-batch processes." *Journal of Biotechnology*, **102**, 45-53.
- Jahic, M., Rotticci-Mulder, J., Martinelle, M., Hult, K. und Enfors, S. O. (2002). "Modeling of growth and energy metabolism of Pichia pastoris producing a fusion protein." *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **24**, 385-393.
- Jahic, M., Wallberg, F., Bollok, M., Garcia, P. und Enfors, S.-O. (2003b). "Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in Pichia pastoris bioreactor cultures." *Microb. Cell Fact.*, **2**, No pp. given.
- Jahn, A., Griebe, T. und Nielsen, P. H. (1999). "Composition of pseudomonas putida biofilms: Accumulation of protein in the biofilm matrix." *Biofouling*, **14**, 49-57.
- Janning, W. und Knust, E. (2004). "Allgemeine Genetik- Molekulare Genetik- Entwicklungsgenetik." Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Jany, K. D. und Mayer, B. (1985). "PROTEINASE-K FROM TRITIRACHIUM-ALBUM LIMBER .1. MOLECULAR MASS AND SEQUENCE AROUND THE ACTIVE-SITE SERINE RESIDUE." *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **366**, 485-492.
- Jing, G. Z., Liu, L. J., Jiang, M. Y., Qiang, Z. und He, R. Q. (1992). "HIGH-LEVEL EXPRESSION OF STAPHYLOCOCCAL NUCLEASE R-GENE IN ESCHERICHIA-COLI." *Journal of Biotechnology*, **22**, 271-282.
- Johansen, C., Falholt, P. und Gram, L. (1997). "Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms." *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 3724-8.
- Kabaoglu, F. (2005). "Studien zur Optimierung der rekombinanten Genexpression in der methylo-trophen Hefe Pichia pastoris," Fachbereich Biologie, Universität Konstanz, Konstanz.
- Kaplan, J. B. (2009). "Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes." *Int. J. Artif. Organs*, **32**, 545-554.
- Kaplan, J. B., Raganath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H. und Ramasubbu, N. (2004). "Enzymatic detachment of Staphylococcus epidermidis biofilms." *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 2633-6.
- Karunakaran, E. und Biggs, C. A. (2011). "Mechanisms of Bacillus cereus biofilm formation: an investigation of the physicochemical characteristics of cell surfaces and extracellular proteins." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **89**, 1161-1175.

- Katchalski-Katzir, E. und Kraemer, D. M. (2000). "Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **10**, 157-176.
- Kayser, F. H. (2010). "Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie." Thieme.
- KDRI. (2007). "Codon Usage Database." <http://www.kazusa.or.jp/codon/>.
- Khan, M., Danielsen, S., Johansen, K., Lorenz, L., Nelson, S. und Camper, A. (2014). "Enzymatic cleaning of biofouled thin-film composite reverse osmosis (RO) membrane operated in a biofilm membrane reactor." *Biofouling*, **30**, 153-167.
- Kim, J. H. und Yoon, J. Y. (2002). "Protein adsorption on polymer particles." *Encyclopedia of surface and colloid science*, **4**, 4373-4381.
- Kim, T. und Lei, X. G. (2005). "Expression and characterization of a thermostable serine protease (TfpA) from *Thermomonospora fusca* YX in *Pichia pastoris*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**, 355-359.
- Kirk, O., Borchert, T. V. und Fuglsang, C. C. (2002). "Industrial enzyme applications." *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 345-351.
- Kleinau, M. (1980). "COPPER-NICKEL-ALLOYS WITH ANTIFOULING PROPERTIES." *Metall*, **34**, 280-281.
- Knezevic-Jugovic, Z. D., Bezbradica, D. I., Mijin, D. Z. und Antov, M. G. (2011). "The immobilization of enzyme on Eupergit supports by covalent attachment." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, **679**, 99-111.
- Knoell, T., Safarik, J., Cormack, T., Riley, R., Lin, S. W. und Ridgway, H. (1999). "Biofouling potentials of microporous polysulfone membranes containing a sulfonated polyether-ethersulfone/polyethersulfone block copolymer: correlation of membrane surface properties with bacterial attachment." *Journal of Membrane Science*, **157**, 117-138.
- Knorre, D. G., Melamed, N. V., Starostina, V. K. und Shubina, T. N. (1973). "Use of water-insoluble enzymes for the determination of nucleotide composition and 5'-terminal analysis of oligonucleotides." *Biokhimiya*, **38**, 121-3.
- Köhn, M., Wacker, R., Peters, C., Schröder, H., Soullère, L., Breinbauer, R., Niemeyer, C. M. und Waldmann, H. (2003). "Staudinger Ligation: A New Immobilization Strategy for the Preparation of Small-Molecule Arrays." *Angewandte Chemie International Edition*, **42**, 5830-5834.
- Kölling. (2013). "conversion log µm // m // mm // µm // nm // Angström // Dalton / molar weight." Uni Bremen-Zentrum für marine Umweltwissenschaft, <http://www-user.uni-bremen.de/koelling/dalton.html>, 1.
- Kolter, R. und O'toole, G. (1999). "Regulation of biofilm formation." WO1999055368 A1.
- Kolvenbach, C. G., Narhi, L. O., Lazenby, K., Samal, B. und Arakawa, T. (1990). "Comparative study on proteinase R, T, and K from *Tritirachium album limber*." *International Journal of Peptide and Protein Research*, **36**, 387-391.
- Krainer, F. W., Dietzsch, C., Hajek, T., Herwig, C., Spadiut, O. und Glieder, A. (2012). "Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway." *Microbial Cell Factories*, **11**.
- Kraus, E. und Femfert, U. (1976). "Proteinase K from the mold *Tritirachium album Limber*. Specificity and mode of action." *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 937-47.
- Kristensen, J. B., Meyer, R. L., Laursen, B. S., Shipovskov, S., Besenbacher, F. und Poulsen, C. H. (2008). "Antifouling enzymes and the biochemistry of marine settlement." *Biotechnol Adv*, **26**, 471-81.
- Kumar, C. G. und Takagi, H. (1999). "Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint." *Biotechnology Advances*, **17**, 561-594.
- Kwon, Y., Coleman, M. A. und Camarero, J. A. (2006). "Selective Immobilization of Proteins onto Solid Supports through Split-Intein-Mediated Protein Trans-Splicing." *Angewandte Chemie International Edition*, **45**, 1726-1729.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680-685.
- Lanxess. (2012). "LEWABRANE® RO B370 HF & LEWABRANE® RO B370 HF." Product information, Leverkusen, Germany.

- Larsen, A. N., Moe, E., Helland, R., Gjellesvik, D. R. und Willassen, N. P. (2006). "Characterization of a recombinantly expressed proteinase K-like enzyme from a psychrotrophic *Serratia* sp." *FEBS Journal*, **273**, 47-60.
- Lee, J. H., Kaplan, J. B. und Lee, W. Y. (2008). "Microfluidic devices for studying growth and detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *Biomed Microdevices*, **10**, 489-98.
- Lee, K.-B., Park, S.-J., Mirkin, C. A., Smith, J. C. und Mrksich, M. (2002). "Protein Nanoarrays Generated By Dip-Pen Nanolithography." *Science*, **295**, 1702-1705.
- Lehman, I. R. (1974). "DNA LIGASE - STRUCTURE, MECHANISM, AND FUNCTION." *Science*, **186**, 790-797.
- Lemercier, G., Bakalara, N. und Santarelli, X. (2003). "On-column refolding of an insoluble histidine tag recombinant exopolyphosphatase from *Trypanosoma brucei* overexpressed in *Escherichia coli*." *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **786**, 305-309.
- Leroy, C., Delbarre, C., Ghillebaert, F., Compere, C. und Combes, D. (2008a). "Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium." *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, **24**, 11 - 22.
- Leroy, C., Delbarre, C., Ghillebaert, F., Compere, C. und Combes, D. (2008b). "Influence of subtilisin on the adhesion of a marine bacterium which produces mainly proteins as extracellular polymers." *Journal of Applied Microbiology*, **105**, 791-799.
- Li, J., Shi, P.-J., Han, X.-Y., Meng, K., Yang, P.-L., Wang, Y.-R., Luo, H.-Y., Wu, N.-F., Yao, B. und Fan, Y.-L. (2007). "Functional expression of the keratinolytic serine protease gene *sfp2* from *Streptomyces fradiae* var. *k11* in *Pichia pastoris*." *Protein Expression and Purification*, **54**, 79-86.
- Li, Y., Hu, Z., Jordan, F. und Inouye, M. (1995). "Functional Analysis of the Propeptide of Subtilisin E as an Intramolecular Chaperone for Protein Folding: REFOLDING AND INHIBITORY ABILITIES OF PROPEPTIDE MUTANTS." *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 25127-25132.
- Liao, J., Warmuth, M., Govindarajan, S., Ness, J., Wang, R., Gustafsson, C. und Minshull, J. (2007). "Engineering proteinase K using machine learning and synthetic genes." *BMC Biotechnology*, **7**, 16.
- Lide, D. R. (2005). "CRC Handbook of Chemistry and Physics." 85th ed., CRC Press, Boca Raton Florida, 2712, Internet Version 2005 <http://www.hbcpnetbase.com>.
- Linn, S. und Arber, W. (1968). "Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **59**, 1300-1306.
- Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao, Y. und Shen, Q. (2012). "Characterization of a thermostable beta-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33." *Microbial Cell Factories*, **11**.
- Liu, S.-Q., Meng, Z.-H., Fu, Y.-X. und Zhang, K.-Q. (2010). "Insights derived from molecular dynamics simulation into the molecular motions of serine protease proteinase K." *Journal of Molecular Modeling*, **16**, 17-28.
- Liu, Y., Yang, S.-F., Li, Y., Xu, H., Qin, L. und Tay, J.-H. (2004). "The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment." *Journal of Biotechnology*, **110**, 251-256.
- Loeb, G. I. und Neihof, R. A. (1975). "Marine conditioning films." *Adv. Chem. Ser.*, **145**, 319-35.
- Loiselle, M. und Anderson, K. W. (2003). "The Use of Cellulase in Inhibiting Biofilm Formation from Organisms Commonly Found on Medical Implants." *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, **19**, 77-85.
- Lu, T. K. und Collins, J. J. (2007). "Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 11197-11202.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W., Short, J. M., Sorge, J. A. und Mathur, E. J. (1991). "HIGH-FIDELITY AMPLIFICATION USING A THERMOSTABLE DNA-POLYMERASE ISOLATED FROM *PYROCOCCUS-FURIOSUS*." *Gene*, **108**, 1-6.

- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. und Harvey, L. M. (2005). "Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system." *Yeast*, **22**, 249-270.
- Madhyastha, Gawanda und Lovetri. "Dispersin B,5-Fluorouracil, Deoxyribonuclease I and Proteinase K-based antibiofilm compositions and uses thereof." WO 2009/121183 A1.
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L. H., Smeltzer, M. S., Horswill, A. R. und Bayles, K. W. (2009). "Modulation of eDNA Release and Degradation Affects *Staphylococcus aureus* Biofilm Maturation." *PLoS ONE*, **4**, e5822.
- Mansfeld, J. und Ulbrich-Hofmann, R. (2000). "Site-specific and random immobilization of thermolysin-like proteases reflected in the thermal inactivation kinetics." **32 ( Pt 3)**, 189-195.
- Mansfeld, J., Vriend, G., Van den Burg, B., Eijsink, V. G. H. und Ulbrich-Hofmann, R. (1999). "Probing the Unfolding Region in a Thermolysin-like Protease by Site-Specific Immobilization" *Biochemistry*, **38**, 8240-8245.
- Manyak, D., Weiner, R., Carlson, P. und Quintero, E. "Microbulbifer culture for use in the generation of agarase and chitinase for use in mixture for treatment and prevention of bacterial infection." US2005003503 (A1).
- Marin-Zamora, M. E. und Rojas-Melgarejo, F. (2006). "Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on d-sorbitol cinnamic ester." *Journal of Biotechnology*, **126**, 295-303.
- Marion, K. "Method of removing a biofilm." US2005079594 (A1)
- Markland, F. S. und Smith, E. L. (1971). "Subtilisins: primary structure, chemical and physical properties." *The Enzymes*, **3**, 561-608.
- Marx, C., Hertel, T. und Pietzsch, M. (2007). "Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*." *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1543 - 1550.
- Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008a). "Purification and activation of a recombinant histidine-tagged pro-transglutaminase after soluble expression in *E. coli* and characterization of the active enzyme." *Enzyme and Microbial Technology*, **42**, 568-575.
- Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008b). "Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat-sensitive variants." *Journal of Biotechnology*, **136**, 156-162.
- Massines, F., Messaoudi, R. und Mayoux, C. (1998). "Comparison Between Air Filamentary and Helium Glow Dielectric Barrier Discharges for the Polypropylene Surface Treatment." *Plasmas and Polymers*, **3**, 43-59.
- Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pedroche, J., Fernández-Lafuente, R. und Guisan, J. M. (2002). "Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment." *Biotechnology Progress*, **18**, 629-634.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. und Fernandez-Lafuente, R. (2007). "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques." *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1451-1463.
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J. und Flemming, H.-C. (1999). "The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms." *International Journal of Biological Macromolecules*, **26**, 3-16.
- Menendez, C., Hernandez, L. und Banguela, A. (2004). "Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*." *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, 446-452.
- Merril, C. R. (1986). "Development and mechanisms of silver stains for electrophoresis." *Acta Histochem. Cytochem.*, **19**, 655-67.
- Merus. (2011). "Newsletter No 1- Biofilm and Biofouling." <http://www.merusononline.com/merusnewsletter1>.

- Michalon, P., Roche, J., Couturier, R., Favre-Bonvin, G. und Marion, C. (1993). "DNase activity of micrococcal endonuclease covalently immobilized on nylon and polystyrene." *Enzyme and Microbial Technology*, **15**, 215-221.
- Minteer, S. D., Knežević-Jugović, Z., Bezbradica, D., Mijin, D. und Antov, M. (2011). "The Immobilization of Enzyme on Eupergit® Supports by Covalent Attachment." In: *Enzyme Stabilization and Immobilization*, Humana Press, 99-111, 679.
- Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S. und Matsuo, H. (1989). "CHARACTERIZATION OF KEX2-ENCODED ENDOPEPTIDASE FROM YEAST SACCHAROMYCES-CEREVISIAE." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **159**, 305-311.
- Molobela. (2010). "Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria." *African Journal of Microbiology Research*, **4**, 1515-1524.
- Morent, R., De Geyter, N., Verschuren, J., De Clerck, K., Kiekens, P. und Leys, C. (2008). "Non-thermal plasma treatment of textiles." *Surface & Coatings Technology*, **202**, 3427-3449.
- Morihara, K. und Tsuzuki, H. (1975). "SPECIFICITY OF PROTEINASE-K FROM TRITIRACHIUM-ALBUM LIMBER FOR SYNTHETIC PEPTIDES." *Agricultural and Biological Chemistry*, **39**, 1489-1492.
- Muller, A., Hinrichs, W., Wolf, W. M. und Saenger, W. (1994). "CRYSTAL-STRUCTURE OF CALCIUM-FREE PROTEINASE-K AT 1.5-ANGSTROM RESOLUTION." *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 23108-23111.
- Müller, R., Thalhoffer, J., Geipel, F., Glaser, S., Hölke, W., Schön, H. und Kirschbaum, T. "Expression der rekombinanten Proteinase K aus *Tritirachium album* in Hefe ", European Patent Office; Patent EP1360283B1.
- Müller, R., Thalhoffer, J. P., Rexer, B., Schmuck, R., Geipel, F., Glaser, S., Schoen, H., Meier, T., Rudolph, R. und Lilie, H. (2008). "Recombinant proteinase k." Patent EP1360284 B1.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). "Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**, 263-273.
- Muñoz-Aguado, M. J., Wiley, D. E. und Fane, A. G. (1996). "Enzymatic and detergent cleaning of a polysulfone ultrafiltration membrane fouled with BSA and whey." *Journal of Membrane Science*, **117**, 175-187.
- Neuhoff, V., Stamm, R., Pardowitz, I., Arold, N., Ehrhardt, W. und Taube, D. (1990). "ESSENTIAL PROBLEMS IN QUANTIFICATION OF PROTEINS FOLLOWING COLLOIDAL STAINING WITH COOMASSIE BRILLIANT BLUE DYES IN POLYACRYLAMIDE GELS, AND THEIR SOLUTION." *ELECTROPHORESIS*, **11**, 101-117.
- Nicholson, T. L., Shore, S. M., Smith, T. C. und Fraena, T. S. (2013). "Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (LA-MRSA) isolates of swine origin form robust biofilms." *PloS one*, **8**, e73376-e73376.
- Nijland, R., Hall, M. J. und Burgess, J. G. (2010). "Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase." *PLoS ONE*, **5**, e15668.
- Nouaimi, M., Moschel, K. und Bisswanger, H. (2001). "Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers." *Enzyme and Microbial Technology*, **29**, 567-574.
- Novagen. (2005). "pET System Manual." **11**.
- O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D. A., Loughman, A., Foster, T. J. und O'Gara, J. P. (2008). "A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB." *Journal of Bacteriology*, **190**, 3835-3850.
- Oehr, C., Muller, M., Elkin, B., Hegemann, D. und Vohrer, U. (1999). "Plasma grafting - a method to obtain monofunctional surfaces." *Surface and Coatings Technology*, **116-119**, 25-35.
- Ogston, A. (1882). "Micrococcus Poisoning." *J Anat Physiol.*, **16**, 526-567.

- Ohi, H., Ohtani, W., Okazaki, N., Furuhata, N. und Ohmura, T. (1996). "Cloning and characterization of the *Pichia pastoris* PRC1 gene encoding carboxypeptidase Y." *Yeast*, **12**, 31-40.
- Oktem, T., Seventekin, N., Ayhan, H. und Piskin, E. (2000). "Modification of polyester and polyamide fabrics by different in situ plasma polymerization methods." *Turkish Journal of Chemistry*, **24**, 275-285.
- Oliveira, R., Azeredo, J., Teixeira, P. und Fonseca, A. P. (2001). "The role of hydrophobicity in bacterial adhesion." *Biofilm community interactions : chance or necessity?*, BioLine, ed., UK, Cardiff, 11-22.
- Olsen, S. M., Pedersen, L. T., Laursen, M. H., Kiil, S. und Dam-Johansen, K. (2007). "Enzyme-based antifouling coatings: a review." *Biofouling*, **23**, 369-383.
- Pähler, A., Banerjee, A., Dattagupta, J. K., Fujiwara, T., Lindner, K., Pal, G. P., Suck, D., Weber, G. und Saenger, W. (1984). "3-DIMENSIONAL STRUCTURE OF FUNGAL PROTEINASE-K REVEALS SIMILARITY TO BACTERIAL SUBTILISIN." *Embo Journal*, **3**, 1311-1314.
- Pal, A. und Paul, A. (2008). "Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation." *Indian Journal of Microbiology*, **48**, 49-64.
- PALL\_Corporation. (2013). "IMAC HyperCel™ Chromatography Resin." <http://fr.pall.com/main/Laboratory/Literature-Library-Details.page?id=49527>.
- Palmgren, R. und Nielsen, P. H. r. (1996). "Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures." *Water Science and Technology*, **34**, 233-240.
- Pasmore, M., Todd, P., Smith, S., Baker, D., Silverstein, J., Coons, D. und Bowman, C. N. (2001). "Effects of ultrafiltration membrane surface properties on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm initiation for the purpose of reducing biofouling." *Journal of Membrane Science*, **194**, 15-32.
- Petrus, H. B., Li, H., Chen, V. und Norazman, N. (2008). "Enzymatic cleaning of ultrafiltration membranes fouled by protein mixture solutions." *Journal of Membrane Science*, **325**, 783-792.
- Pettitt, M. E., Henry, S. L., Callow, M. E., Callow, J. A. und Clare, A. S. (2004). "Activity of commercial enzymes on settlement and adhesion of cypris larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*, spores of the green alga *Ulva linza*, and the diatom *Navicula perminuta*." *Biofouling*, **20**, 299-311.
- Pingoud, A. und Jeltsch, A. (2001). "Structure and function of type II restriction endonucleases." *Nucleic Acids Research*, **29**, 3705-3727.
- Porath, J., Carlsson, J. A. N., Olsson, I. und Belfrage, G. (1975). "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation." *Nature*, **258**, 598-599.
- Post, J. C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. und Ehrlich, G. D. (2004). "The role of biofilms in otolaryngologic infections." *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, **12**, 185-190.
- Poulsen, C. und Kragh, K. "Composition. ." US20020106361 A1.
- Pratt, L. A. und Kolter, R. (1998). "Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili." *Molecular Microbiology*, **30**, 285-293.
- Qin, Z., Ou, Y., Yang, L., Zhu, Y., Tolker-Nielsen, T., Molin, S. und Qu, D. (2007). "Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*." *Microbiology*, **153**, 2083-2092.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. und Deshpande, V. V. (1998). "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 597-+.
- Rawlings, N. D., Salvesen, G. S., Academic, P. und Elsevier. (2013). "Handbook of Proteolytic Enzymes: Vol. 1." Academic Press.
- Reddy, L. G. und Shankar, V. (1993). "Immobilized Nucleases." *Critical Reviews in Biotechnology*, **13**, 255-273.
- Regina, V. R., Sohoel, H., Lokanathan, A. R., Bischoff, C., Kingshott, P., Revsbech, N. P. und Meyer, R. L. (2012). "Entrapment of Subtilisin in Ceramic Sol-Gel Coating for Antifouling Applications." *Acs Applied Materials & Interfaces*, **4**, 5915-5921.

- Richter, K. (2012). Masterarbeit, Fraunhofer IWM Halle, unpublished.
- Rossi, R., Montecucco, A., Ciarrocchi, G. und Biamonti, G. (1997). "Functional characterization of the T4 DNA ligase: A new insight into the mechanism of action." *Nucleic Acids Research*, **25**, 2106-2113.
- Rouhi, A. M. (1998). "The Squeeze On Tributyltins." *Chemical & Engineering News Archive*, **76**, 41-42.
- Ryan, R. P. und Dow, J. M. (2008). "Diffusible signals and interspecies communication in bacteria." *Microbiology*, **154**, 1845-1858.
- Salah, R. B., Gargouri, A., Verger, R., Gargouri, Y. und Mejdoub, H. (2009). "Expression in *Pichia pastoris* X33 of His-tagged lipase from a novel strain of *Rhizopus oryzae* and its mutant Asn 134 His: purification and characterization." *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **25**, 1375-1384.
- Salamin, K., Sriranganadane, D., Léchenne, B., Jousson, O. und Monod, M. (2010). "Secretion of an Endogenous Subtilisin by *Pichia pastoris* Strains GS115 and KM71." *Applied and Environmental Microbiology*, **76**, 4269-4276.
- Samal, B. B., Karan, B., Boone, T. C., Chen, K. K., Rohde, M. F. und Stabinsky, Y. (1989). "Cloning and expression of the gene encoding a novel proteinase from *Tritirachium album* Limber." *Gene*, **85**, 329-333.
- Samal, B. B., Karan, B., Boone, T. C., Osslund, T. D., Chen, K. K. und Stabinsky, Y. (1990). "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE GENE ENCODING A NOVEL, THERMOSTABLE SERINE PROTEINASE FROM THE MOLD TRITIRACHIUM-ALBUM LIMBER." *Molecular Microbiology*, **4**, 1789-1792.
- Samal, B. B., Karan, B., Parker, C. und Stabinsky, Y. (1991). "Isolation and thermal stability studies of two novel serine proteinases from the fungus *Tritirachium album* Limber." *Enzyme and Microbial Technology*, **13**, 66-70.
- Sambrook, J., Russel, D., Fritsch, E. und Maniatis, T. (2001). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual.", (3, ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Satorius. (1999). "Betriebshandbuch Biostat C." *Nutzerhandbuch*, **BADC Rev. 2.4-1299 sw 4.1**.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. und Davies, D. G. (2002). "*Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm." *Journal of Bacteriology*, **184**, 1140-1154.
- Sciarratta, V., Hegemann, D., Müller, M., Vohrer, U. und Oehr, C. (2005). "Upscaling of Plasma Processes for Carboxyl Functionalization." In: *Plasma Processes and Polymers*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 39-49.
- Seidl, K., Goerke, C., Woiz, C., Mack, D., Berger-Baechi, B. und Bischoff, M. (2008). "Staphylococcus aureus CcpA affects biofilm formation." *Infection and Immunity*, **76**, 2044-2050.
- Shak, S., Capon, D. J., Hellmiss, R., Marsters, S. A. und Baker, C. L. (1990). "Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 9188-92.
- Sheldon, R. A. (2007). "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance." *Advanced Synthesis & Catalysis*, **349**, 1289-1307.
- Sheldon, R. A. und van Pelt, S. (2013). "Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how." *Chemical Society Reviews*, **42**, 6223-6235.
- Shi, Q., Su, Y., Ning, X., Chen, W., Peng, J. und Jiang, Z. (2010). "Trypsin-enabled construction of anti-fouling and self-cleaning polyethersulfone membrane." *Bioresource Technology*, **102**, 647-651.
- Shortle, D. (1983). "A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease." *Gene*, **22**, 181-189.
- Shortle, D. (1986). "Guanidine hydrochloride denaturation studies of mutant forms of staphylococcal nuclease." *Journal of Cellular Biochemistry*, **30**, 281-289.
- Siezen, R. J. und Leunissen, J. A. M. (1997). "Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases." *Protein Science*, **6**, 501-523.
- Sigma-Aldrich. (2006). "Sephacrose® 4B- Product Number 4 B200." *Produktinformation*, 1.

- Sigma-Aldrich. (2008). "Colorimetric Alkaline Phosphatase and Peroxidase Substrate Detection Systems." *Biofiles*, **3**.
- Simoës, M., Carvalho, H., Pereira, M. O. und Vieira, M. J. o. (2003). "Studies on the behaviour of pseudomonas fluorescens biofilms after orthoâ€"phthalaldehyde treatment." *Biofouling*, **19**, 151-157.
- Singh, R. K., Gourinath, S., Sharma, S., Roy, I., Gupta, M. N., Betzel, C., Srinivasan, A. und Singh, T. P. (2001). "Enhancement of enzyme activity through three-phase partitioning: crystal structure of a modified serine proteinase at 1.5 Å resolution." *Protein Engineering*, **14**, 307-313.
- Sinha, J., Plantz, B. A., Inan, M. und Meagher, M. M. (2004). "Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: Case study with recombinant ovine interferon-Î„." *Biotechnol. Bioeng.*, **89**, 102-112.
- Slováková, M., Peyrin, J.-M., Bílková, Z., Juklíčková, M., Hernychová, L. und Viovy, J.-L. (2008). "Magnetic Proteinase K Reactor as a New Tool for Reproducible Limited Protein Digestion." *Bioconjugate Chemistry*, **19**, 966-972.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *Journal of Molecular Biology*, **189**, 113-130.
- Sutherland, I. W. (1999). "Polysaccharases for microbial exopolysaccharides." *Carbohydrate Polymers*, **38**, 319-328.
- Sutherland, I. W. (2001). "The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment." *Trends in Microbiology*, **9**, 222-227.
- Takahara, M., Hibler, D. W., Barr, P. J., Gerlt, J. A. und Inouye, M. (1985). "The ompA signal peptide directed secretion of Staphylococcal nuclease A by *Escherichia coli*." *Journal of Biological Chemistry*, **260**, 2670-2674.
- Tang, J., Kang, M., Chen, H., Shi, X., Zhou, R., Chen, J. und Du, Y. (2011). "The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria." *Science China Life Sciences*, **54**, 863-869.
- Tang, J., Zhou, R., Shi, X., Kang, M., Wang, H. und Chen, H. (2008). "Two thermostable nucleases coexisted in *Staphylococcus aureus*: evidence from mutagenesis and in vitro expression." *FEMS Microbiology Letters*, **284**, 176-183.
- Tanioka, A., Yokoyama, Y. und Miyasaka, K. (1998). "Preparation and Properties of Enzyme-Immobilized Porous Polypropylene Films." *Journal of Colloid and Interface Science*, **200**, 185-187.
- Tao, G., Gong, A., Lu, J., Sue, H.-J. und Bergbreiter, D. E. (2001). "Surface Functionalized Polypropylene:â€" Synthesis, Characterization, and Adhesion Properties." *Macromolecules*, **34**, 7672-7679.
- Tao, Y., Rao, Z.-H. und Liu, S.-Q. (2010). "Insight Derived from Molecular Dynamics Simulation into Substrate-Induced Changes in Protein Motions of Proteinase K." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **28**, 143-157.
- Tardioli, P. W., Pedroche, J., Giordano, R. L. C., Fernández-Lafuente, R. und Guisán, J. M. (2003). "Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose." *Biotechnology Progress*, **19**, 352-360.
- Tasso, M. (2009). "Bioactive coatings to control marine biofouling," Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften technische Universität Dresden, Dissertation.
- Tasso, M., Cordeiro, A. L., Salchert, K. und Werner, C. (2009a). "Covalent Immobilization of Subtilisin A onto Thin Films of Maleic Anhydride Copolymers." *Macromolecular Bioscience*, **9**, 922-929.
- Tasso, M., Pettitt, M. E., Cordeiro, A. L., Callow, M. E., Callow, J. A. und Werner, C. (2009b). "Antifouling potential of Subtilisin A immobilized onto maleic anhydride copolymer thin films." *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, **25**, 505-516.
- Taylor, R. G., Walker, D. C. und McInnes, R. R. (1993). "E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing." *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1677-8.

- Taylor, W. R. (1986). "The classification of amino acid conservation." *Journal of Theoretical Biology*, **119**, 205-218.
- Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **60**, 523-533.
- Thermo-Scientific. (2011a). "GeneJet™ Gel Extraction Kit." *product information*.
- Thermo-Scientific. (2011b). "GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit." *Product information*.
- Thermo-Scientific. (2012). "Proteinase K (recombinant), PCR grade #EO0491." *Product information*.
- Thiruvengadam, G., Init, I., Fong, M. Y. und Lau, Y. L. (2011). "Optimization of the expression of surface antigen SAG1/2 of Toxoplasma gondii in the yeast Pichia pastoris." *Trop Biomed*, **28**, 506-13.
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F. und Jaeger, K.-E. (2005). "Pseudomonas aeruginosa lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation." *Microbiology*, **151**, 1313-1323.
- Torres, C. E., Lenon, G., Craperi, D., Wilting, R. und Blanco, A. (2011). "Enzymatic treatment for preventing biofilm formation in the paper industry." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 95-103.
- Tucker, P. W., Hazen, E. E. und Cotton, F. A. (1978). "Staphylococcal nuclease reviewed: A prototypic study in contemporary enzymology. I isolation; physical and enzymatic properties." *Molecular and Cellular Biochemistry*, **22**, 67-78.
- Uchida, T. und Egami, F. "Microbial ribonucleases with special reference to RNases T1, T2, N1, and U2." 205-50.
- Udou, T. und Ichikawa, Y. (1980). "Effect of Sodium Chloride on the Activity and Production of Staphylococcal Exonuclease." *Journal of General Microbiology*, **116**, 69-74.
- Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G. und Zehnder, A. J. B. (1987). "The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion." *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1893-7.
- Vercammen, S. (2013). "Product question for an Kwick Lab Cassette-personal communication." Halle (Saale).
- Vilain, S., Pretorius, J. M., Theron, J. und Brozel, V. S. (2009). "DNA as an Adhesin: Bacillus cereus Requires Extracellular DNA To Form Biofilms." *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 2861-2868.
- Villalobos, A., Ness, J. E., Gustafsson, C., Minshull, J. und Govindarajan, S. (2006). "Gene Designer: a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments." *BMC Bioinformatics*, **7**, 285.
- Viswanath, S., Wang, J., Bachas, L. G., Butterfield, D. A. und Bhattacharyya, D. (1998). "Site-directed and random immobilization of subtilisin on functionalized membranes: Activity determination in aqueous and organic media." *Biotechnology and Bioengineering*, **60**, 608-616.
- Vrouwenvelder, J. S., Graf von der Schulenburg, D. A., Kruithof, J. C., Johns, M. L. und van Loosdrecht, M. C. M. (2009). "Biofouling of spiral-wound nanofiltration and reverse osmosis membranes: A feed spacer problem." *Water Research*, **43**, 583-594.
- Walker, J., Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. e., Wilkins, M., Appel, R. und Bairoch, A. (2005). "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server." In: *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 571-607.
- Wang, J., Bhattacharyya, D. und Bachas, L. G. (2001). "Improving the activity of immobilized subtilisin by site-directed attachment through a genetically engineered affinity tag." *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **369**, 280-285.
- Wang, M., Feng, Y., Yao, H. und Wang, J. (2010). "Importance of the C-Terminal Loop L137~S141 for the Folding and Folding Stability of Staphylococcal Nuclease." *Biochemistry*, **49**, 4318-4326.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. und Bauer, J. C. (1994). "Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction." *Gene*, **151**, 119-23.

- Werten, M. W. T. und Wolf, F. A. (2005). "Reduced proteolysis of secreted gelatin and Yps1-mediated  $\alpha$ -factor leader processing in a *Pichia pastoris* *kex2* disruptant." *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2310-2317.
- Westall, F., de, W. M. J., Jesse, D., Sjerry, v. d. G., de, R. C. E. J. und Dane, G. (2001). "Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa." *Precambrian Research*, **106**, 93-116.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. und Mattick, J. S. (2002). "Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation." *Science*, **295**, 1487.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C. und Wiebe, W. J. (1998). "Prokaryotes: The unseen majority." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 6578-6583.
- Whittaker, C., Ridgway, H. und Olson, B. H. (1984). "EVALUATION OF CLEANING STRATEGIES FOR REMOVAL OF BIOFILMS FROM REVERSE-OSMOSIS MEMBRANES." *Applied and Environmental Microbiology*, **48**, 395-403.
- Williams, A. und Hagel, L. (1999). "2 - Size Exclusion for Analysis and Purification of Aqueous Macromolecules." In: *Column handbook for size exclusion chromatography* (Wu, C.-s., ed.), Academic Press, San Diego, Calif. :, 27-74.
- Williams, C. (2011). "Who are you calling simple?" *New Scientist*, **211**, 38-41.
- Wingender, J., Neu, T. R. und Flemming, H.-C. (1999). "Microbial extracellular polymeric substances : characterization, structure, and function." Springer, Berlin; New York.
- Winkler, C., Denker, K., Wortelkamp, S. und Sickmann, A. (2007). "Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS." *ELECTROPHORESIS*, **28**, 2095-2099.
- Wolfram, M. (2011). "persönliche Mitteilung."
- Wong, L. S., Khan, F. und Micklefield, J. (2009). "Selective Covalent Protein Immobilization: Strategies and Applications." *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)*, **109**, 4025-4053.
- Wong, S. S. (1991). "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking." (1, ed.), CRC Press, 340.
- Wu, M., Shen, Q., Yang, Y., Zhang, S., Qu, W., Chen, J., Sun, H. und Chen, S. (2013). "Disruption of YPS1 and PEP4 genes reduces proteolytic degradation of secreted HSA/PTH in *Pichia pastoris* GS115." *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 589-599.
- Xavier, J. B., Picioreanu, C., Rani, S. A., van Loosdrecht, M. C. M. und Stewart, P. S. (2005). "Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix - a modelling study." *Microbiology*, **151**, 3817-3832.
- Xiong, Y. und Liu, Y. (2013). "Importance of extracellular proteins in maintaining structural integrity of aerobic granules." *Colloids Surf., B*, **112**, 435-440.
- Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K. und Mikata, K. (1995). "The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs : The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov.(Saccharomycetaceae)." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **59**, 439-444.
- Ye, K., Jing, G. und Wang, J. (2000). "Interactions between subdomains in the partially folded state of staphylococcal nuclease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1479**, 123-134.
- Yeon, K.-M., Cheong, W.-S., Oh, H.-S., Lee, W.-N., Hwang, B.-K., Lee, C.-H., Beyenal, H. und Lewandowski, Z. (2008). "Quorum Sensing: A New Biofouling Control Paradigm in a Membrane Bioreactor for Advanced Wastewater Treatment." *Environmental Science & Technology*, **43**, 380-385.
- Yin, J. und Jing, G. (2000). "Tryptophan 140 Is Important, but Serine 141 Is Essential for the Formation of the Integrated Conformation of Staphylococcal Nuclease." *Journal of Biochemistry*, **128**, 113-119.
- Yoshikawa, H., Hirano, A., Arakawa, T. und Shiraki, K. (2012). "Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol." *Int. J. Biol. Macromol.*, **50**, 865-871.
- Yuanhe, L., Zhaojie, L. und Guozhong, J. (1997). "Overexpression, purification of poly-his-nuclease R and its potential use." *Biotechnology Techniques*, **11**, 729-732.
- Yunker, L. P. E., Stoddard, R. L. und McIndoe, J. S. (2013). "Practical approaches to the ESI-MS analysis of catalytic reactions." *Journal of Mass Spectrometry*, **49**, 1-8.

- 
- Zanaroli, G., Negroni, A., Calisti, C., Ruzzi, M. und Fava, F. (2011). "Selection of commercial hydrolytic enzymes with potential antifouling activity in marine environments." *Enzyme and Microbial Technology*, **49**, 574-579.
- Zhang, C., Jin, J., Zhao, J., Jiang, W. und Yin, J. (2013). "Functionalized polypropylene non-woven fabric membrane with bovine serum albumin and its hemocompatibility enhancement." *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **102**, 45-52.
- Zhu, T., Guo, M., Tang, Z., Zhang, M., Zhuang, Y., Chu, J. und Zhang, S. (2009). "Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*." *Journal of Applied Microbiology*, **107**, 954-963.
- Zhu, X., Tang, L., Wee, K.-H., Zhao, Y.-H. und Bai, R. (2011). "Immobilization of silver in polypropylene membrane for anti-biofouling performance." *Biofouling*, **27**, 773-786.
- Zimmermann, J. L., Nicolaus, T., Neuert, G. und Blank, K. (2010). "Thiol-based, site-specific and covalent immobilization of biomolecules for single-molecule experiments." *Nat. Protocols*, **5**, 975-985.
- Zuza, M. G., Siler-Marinkovic, S. S. und Knezevic, Z. D. (2007). "Immobilization of penicillin acylase from *Escherichia coli* on commercial Sepabeads EC-EP carrier." *Acta Period. Technol.*, **38**, 173-182.
- Zvab, U., Lavrencic Stangar, U. und Bergant Marusic, M. (2014). "Methodologies for the analysis of antimicrobial effects of immobilized photocatalytic materials." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 1925-1936.

## 8 Anhang

### 8.1 Translationskarten

#### 8.1.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenz (5' → 3') des MicNuc-Gens aus pET20b(+)

Im Folgenden ist die *codon translation map* der optimierten Genkonstruktion MicNuc (Nuklease R) mit C-terminalen 6x Polyhistidin-tag aus dem Vektor pET20b-MicNuc (R)-6xHis dargestellt. Rot markiert sind die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen NdeI (AS 1/ M) und XhoI (nicht translatiert). Grün markiert ist der für die MicNuc R typische 6x AS-Rest der Nuklease B. AS 8 bis 156 entspricht der natürlichen Nuklease A-Sequenz, AS 149 der aus *Staphylococcus aureus*.

```

1 ATGGATCCGACCGTGTATTCTGCTACCTCTACCAAGAAACTGCATAAAGAACCGCAACC
1 M D P T V Y S A T S T K K L H K E P A T
61 CTGATTAAGCGATCGATGGCGATACTGTAAAAGTACAAAGGTCAGCCGATGACC
21 L I K A I D G D T V K L M Y K G Q P M T
121 TTTCGTCTGCTGCTGGTGGACACCCCGGAGACTAAACACCCGAAGAAAGGCGTTGAAAAA
41 F R L L L V D T P E T K H P K K G V E K
181 TATGGTCCGGAGGCGTCTGCTTTCACGAAGAAAATGGTAGAAAACGCGAAGAAAATTGAA
61 Y G P E A S A F T K K M V E N A K K I E
241 GTTGAATTGACAAGGGTCAACGCACTGACAAAATACGGTCGCGGCCTGGCGTATATTTAC
81 V E F D K G Q R T D K Y G R G L A Y I Y
301 GCAGATGGTAAAATGGTTAACGAAGCACTGGTTCGTCAGGGTCTGGCGAAAGTAGCATAAC
101 A D G K M V N E A L V R Q G L A K V A Y
361 GTGTACAAACCGAACAATACTCACGAACAGCATCTGCGTAAGTCCGAAGCTCAGGCAAAG
121 V Y K P N N T H E Q H L R K S E A Q A K
421 AAAGAGAACTGAACATTTGGTCCGAAGACAATGCCGATTCTGGTCAGCATCACCATCAC
141 K E K L N I W S E D N A D S G Q H H H H
481 CATCACTGATGACCGCTCGAG
161 H H * * P L E

```

#### 8.1.2 Nukleotid- und Aminosäuresequenz (5' → 3') des Prä-Pro-PK-Gens aus pPICZαA

Im Folgenden ist die *codon translation map* der gesamten *Codon usage* optimierten Genkonstruktion von Prä-Pro-Proteinase K aus dem Vektor pPICZαA-Pro-PK gezeigt. Rot markiert sind die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen EcoRI (AS -92; -91/ EF) und XbaI (AS 280; 281/ LE). Nach der XbaI-Schnittstelle folgt der vektorinterne Peptid-tag aus c-Myc Epitop (EQKLISEEDL) und 6x Polyhistidin-tag. In blau ist die Pro-Sequenz der rPK hervorgehoben. Die α-Faktor-Signalsequenz beginnt am Startmethionin und endet bei EcoRI.

```

-544                                     ATG
-182                                     M
-541 AGATTTCCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCA
-181 R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P
-481 GTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTAC
-161 V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G Y
-421 TCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAAC
-141 S D L E G D F D V A V L P F S N S T N N
-361 GGGTTATGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCT
-121 G L L F I N T T I A S I A A K E E G V S
-301 CTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCGAATTCGCACCTGCTGTGCAACAAGATCTGAGGCA
-101 L E K R E A E A E F A P A V E Q R S E A
-241 GCTCCATTAATTGAAGCAAGAGGGGAGATGGTTGCTAACAAGTATATCGTTAAGTTCAAG
-81 A P L I E A R G E M V A N K Y I V K F K
-181 GAAGGTTTCGCATTGTCCGCTCTGGATGCAGCTATGGAGAAAATATCCGGTAAGCCAGAT
-61 E G S A L S A L D A A M E K I S G K P D
-121 CACGCTATAAAAACGTTTTCTCTGGATTTGCCGCCACACTTGATGAGAACATGGTCAGA
-41 H V Y K N V F S G F A A T L D E N M V R
-61 GTTCTTAGAGCCCACCCAGATGTTGAGTACATTGAACAGGACGCAGTAGTGACTATCAAC
-21 V L R A H P D V E Y I E Q D A V V T I N
1 GCTGCCCAAACGAACGCTCCATGGGGTTTGCTAGAATTCATCAACATCCCCTGGTACG
1 A A Q T N A P W G L A R I S S T S P G T
61 TCAACTTACTACTACGATGAATCAGCCGGTCAAGGTTTCATGCGTCTATGTTATTGATACC
21 S T Y Y D E S A G Q G S C V Y V I D T
121 GGCATCGAAGCTAGTCACCTGAGTTTCGAGGGGCGTGCACAGATGGTTAAAACCTACTAT
41 G I E A S H P E F E G R A Q M V K T Y Y
181 TACTCCTCTCGTGACGGTAATGGCCACGGTACCCACTGTGCTGGAAGTGTGGGTTCAAGA
61 Y S S R D G N G H G T H C A G T V G S R
241 ACCTACGGGGTGGCTAAGAAAACGCAATTGTTCCGGTGTCAAAGTTTTGGACGACAATGGA
81 T Y G V A K K T Q L F G V K V L D D N G
301 TCTGGACAGTACTCTACGATTATAGTCAGGGATGGATTTTGTGGCTAGTGATAAAAACAAT
101 S G Q Y S T I I A G M D F V A S D K N N
361 CGTAAGTGTCCAAAAGGGGTTGTAGCTTCACTTTCTTTAGGAGGAGGTATTCTCTAGT
121 R N C P K G V V A S L S L G G G Y S S S
421 GTCAATTTCGACCCGCTCGTTTGCAAAGTCTGGGGTTCATGGTTGCCGTTGCTGCCGGC
141 V N S A A A R L Q S S G V M V A V A A G
481 AATAACAACGCAGATGCCAGAACTATAGTCCAGCATCTGAACCAAGTGTGTGCACGGTG
161 N N N A D A R N Y S P A S E P S V C T V
541 GGTGCTTCTGACCGTTACGATAGACGTTCCCTCTTTTAGTAACTATGGATCAGTTTTAGAT
181 G A S D R Y D R R S S F S N Y G S V L D
601 ATTTTCGGTCTCGGTACCTCTATTTTATCTACCTGGATTGGAGGTAGTACCCGTTCTATT
201 I F G P G T S I L S T W I G G S T R S I
661 TCAGGACAGTCAATGGCCACGCCTCACGTTGCTGGTCTTGCTGCATATCTGATGACACTT
221 S G T S M A T P H V A G L A A Y L M T L
721 GGTAAGACAACAGTGCAGTGCATGTAGATATATAGCTGACACTGCTAACAAGGGAGAT
241 G K T T A A S A C R Y I A D T A N K G D
781 CTTTCTAATATTCCTTTTGGCACCGTGAACCTTTTAGCATATAACAACCTACCAAGCTCTA
261 L S N I P F G T V N L L A Y N N Y Q A L
841 GAACAAAACCTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCAT
281 E Q K L I S E E D L N S A V D H H H H H
901 CATTGA
301 H *

```

## 8.2 CLSM-Aufnahmen

Im folgenden Abschnitt sind alle CLSM-Aufnahmen der eingesetzten PP-Folien nach Viabilitätsfärbung mit Syto®9 (grün) und Propidiumiodid (rot) dargestellt.

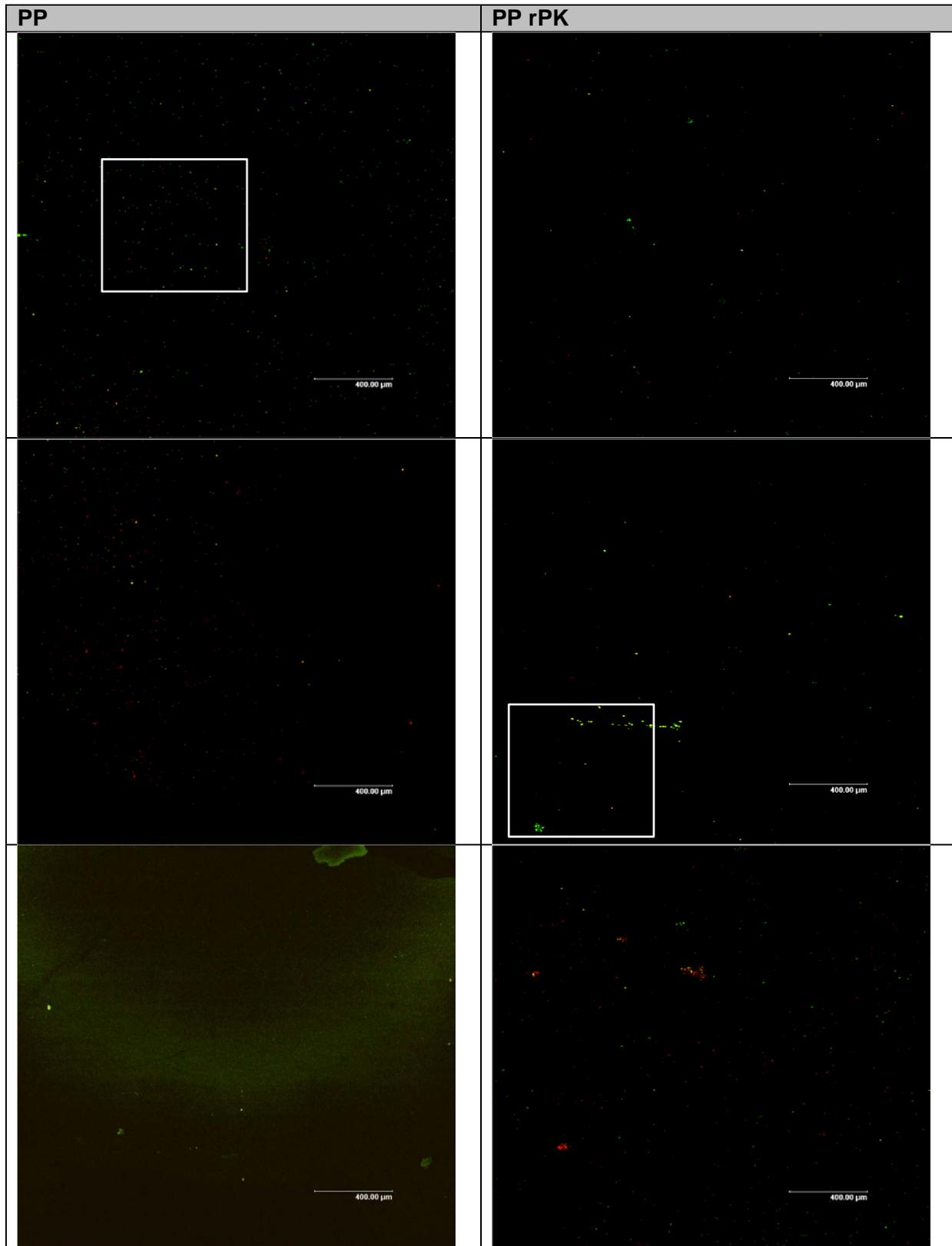


Abbildung 8-1: CLSM-Aufnahmen ansiedelnder Zellen von *Pseudomonas fluorescens* an unmodifizierten PP-Folien ohne Enzymbeschichtung (linke Spalte) und mit rPK-Beschichtung (rechte Spalte). Pro Spalte sind drei unmodifizierte PP-Folien gezeigt (von oben nach unten). Jede gezeigte Aufnahme besitzt eine Fläche von 2,25 mm<sup>2</sup> und besteht aus neun zusammengesetzten Einzelbildern (20x Vergrößerung). Die Viabilitätsfärbung erfolgte mit Syto@9 (grün) und Propidiumiodid (rot). Das weiße Rechteck markiert den Ausschnitt aus Abbildung 3-31.

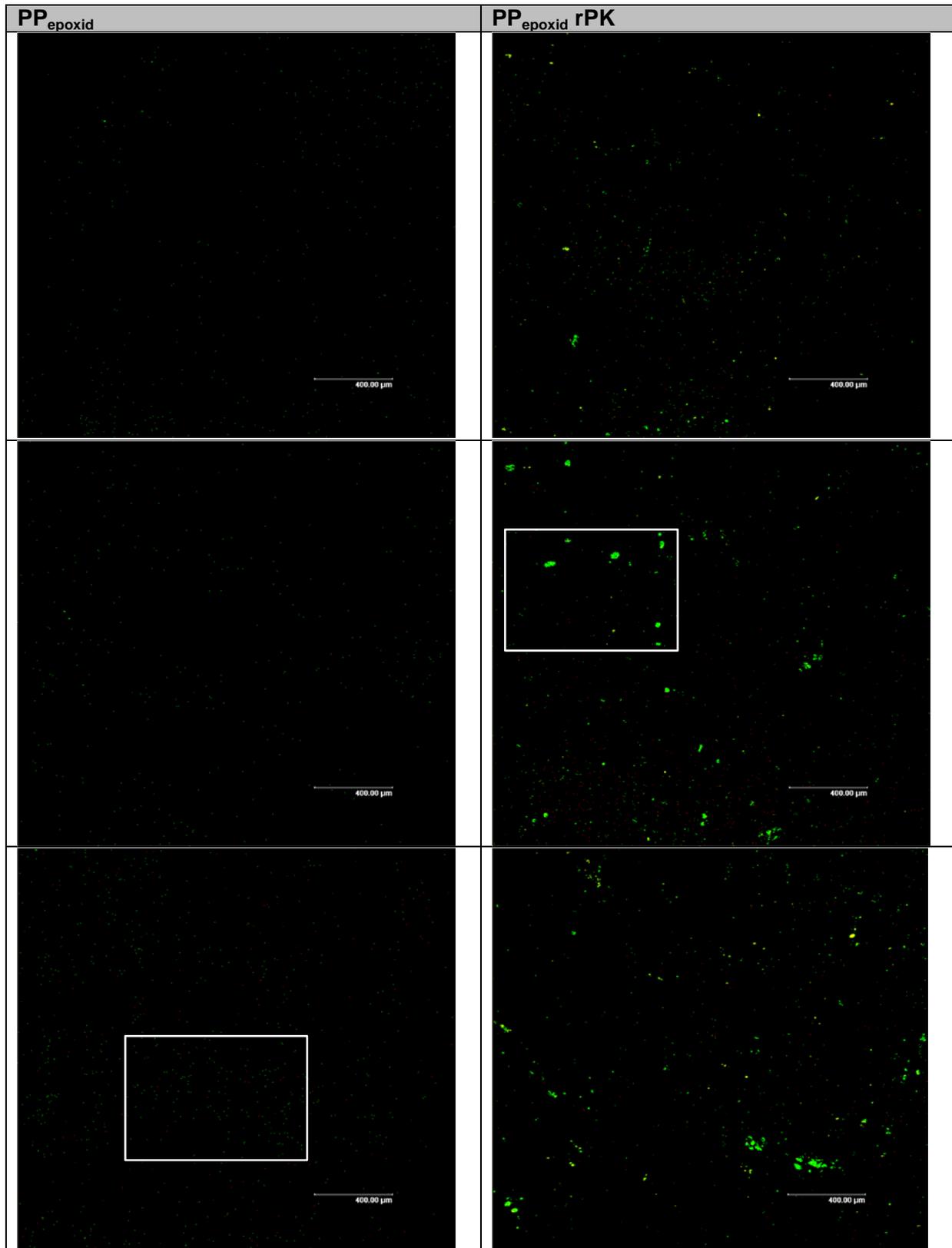


Abbildung 8-2: CLSM-Aufnahmen ansiedelnder Zellen von *Pseudomonas fluorescens* an Plasma und EPMA behandelten PP-Folien ohne Enzymbeschichtung (linke Spalte) und mit rPK-Beschichtung (rechte Spalte). Pro Spalte sind drei behandelte PP-Folien gezeigt (von oben nach unten). Jede gezeigte Aufnahme besitzt eine Fläche von 2,25 mm<sup>2</sup> und besteht aus neun zusammengesetzten Einzelbildern (20x Vergrößerung). Die Viabilitätsfärbung erfolgte mit Syto®9 (grün) und Propidiumiodid (rot). Das weiße Rechteck markiert den Ausschnitt aus Abbildung 3-31.

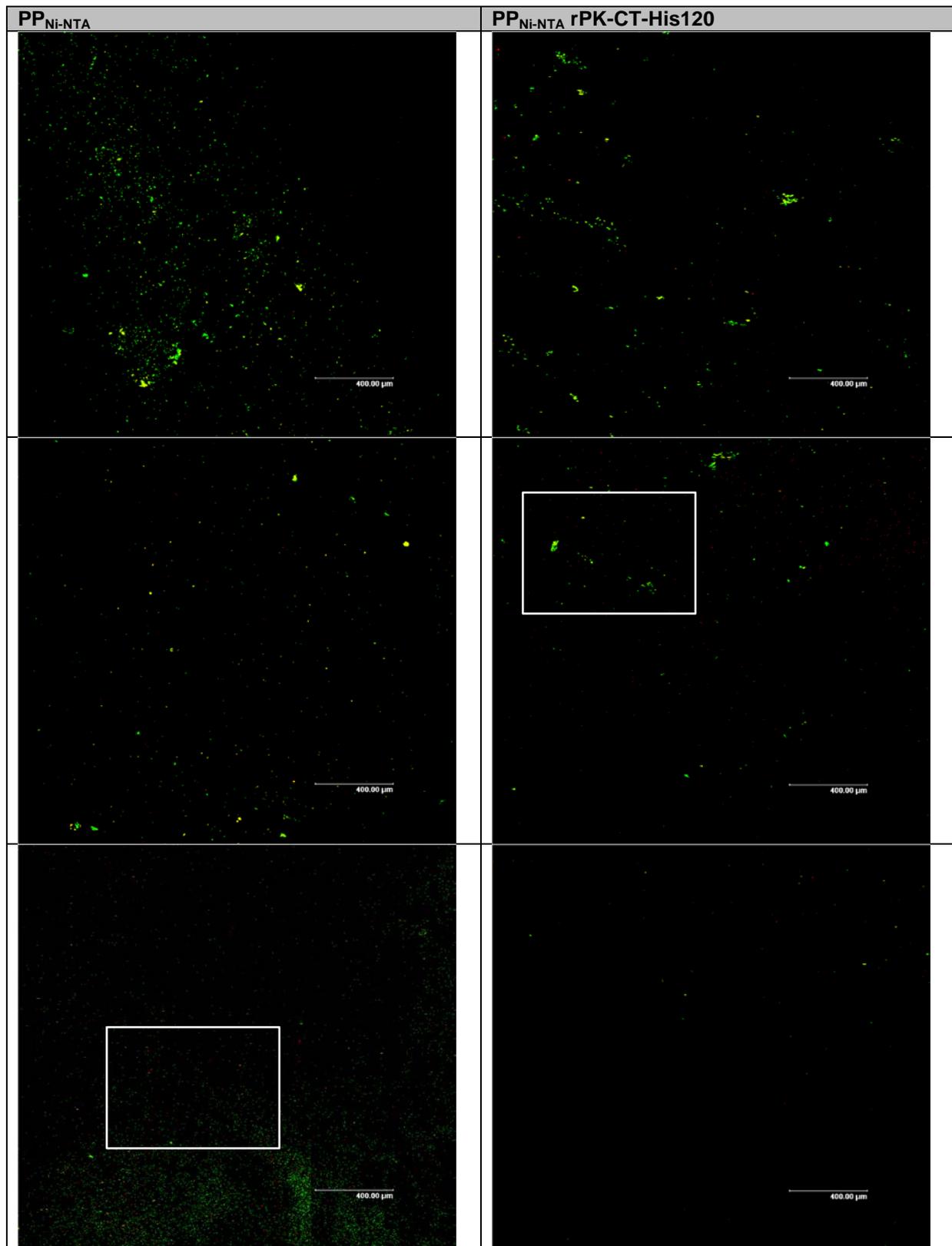


Abbildung 8-3: CLSM-Aufnahmen ansiedelnder Zellen von *Pseudomonas fluorescens* an Plasma und  $N\alpha,N\alpha$ -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin sowie Nickelsulfat behandelten PP-Folien ohne Enzymbeschichtung (linke Spalte) und mit rPK-Beschichtung (rechte Spalte). Pro Spalte sind drei behandelte PP-Folien gezeigt (von oben nach unten). Jede gezeigte Aufnahme besitzt eine Fläche von 2,25 mm<sup>2</sup> und besteht aus 9 zusammengesetzten Einzelbildern (20x Vergrößerung). Die Viabilitätsfärbung erfolgte mit Syto®9 (grün) und Propidiumiodid (rot). Das weiße Rechteck markiert den Ausschnitt aus Abbildung 3-31.

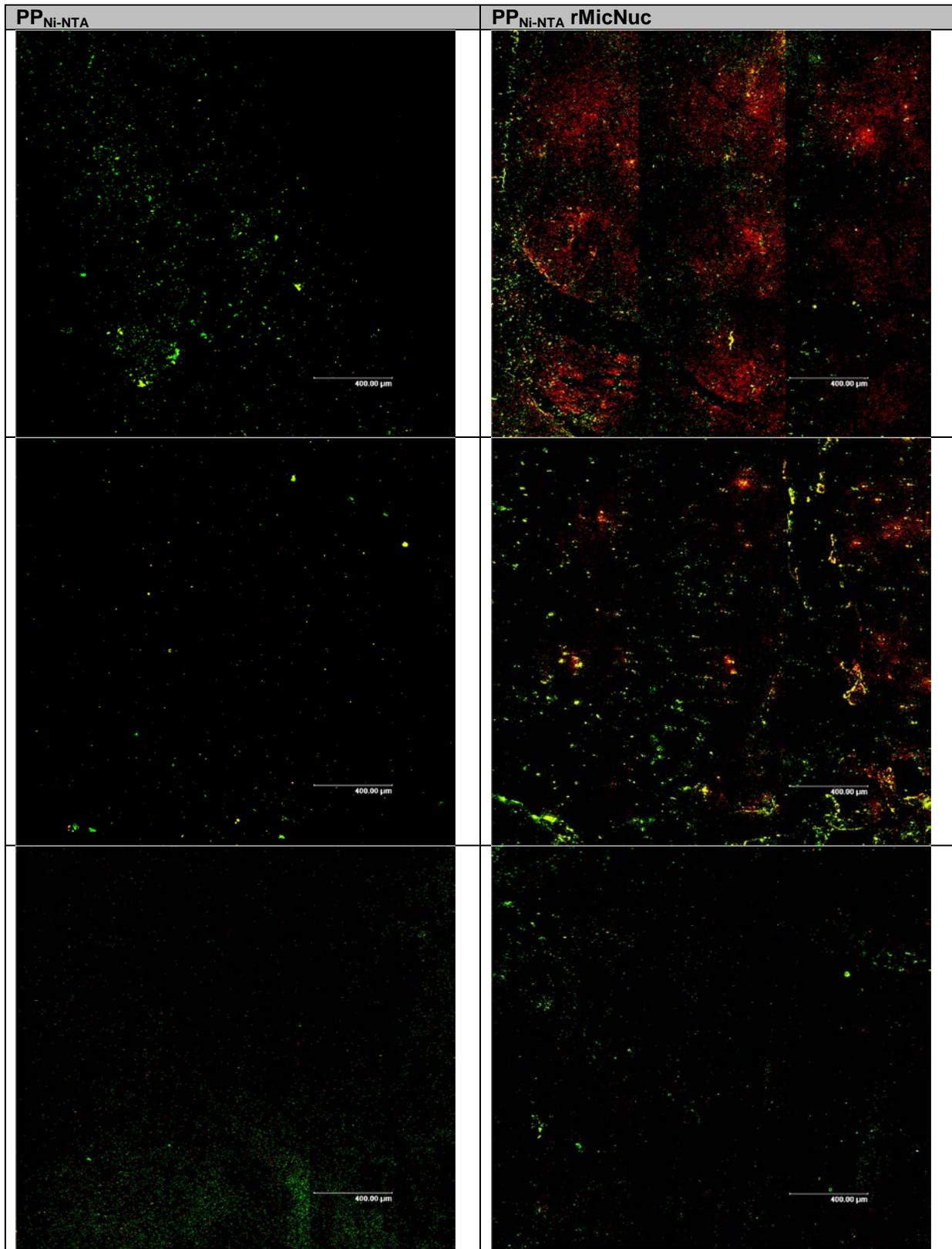


Abbildung 8-4: CLSM-Aufnahmen ansiedelnder Zellen von *Pseudomonas fluorescens* an Plasma und  $N\alpha,N\alpha$ -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin sowie Nickelsulfat behandelte PP-Folien ohne Enzymbeschichtung (linke Spalte) und mit rMicNuc-Beschichtung (rechte Spalte). Pro Spalte sind drei behandelte PP-Folien gezeigt (von oben nach unten). Jede gezeigte Aufnahme besitzt eine Fläche von 2,25 mm<sup>2</sup> und besteht aus 9 zusammengesetzten Einzelbildern (20x Vergrößerung). Die Viabilitätsfärbung erfolgte mit Syto®9 (grün) und Propidiumiodid (rot).

## 8.3 Ergänzende Ergebnisse

### 8.3.1 KIA-Chromatographiedaten der rPK-Aufreinigung

Tabelle 8-1: Proteaseaktivitäten von Fraktionen vor und nach der KIA aus ultrafiltriertem und dialysiertem Überstand aus der Fermentation. <sup>1</sup> Präzipitat in 20 mM- 1 M Kaliumphosphatpuffer (KPP) pH 7 resolubilisiert. <sup>2</sup> Präzipitat in 1 M Natriumphosphatpuffer pH 7 resolubilisiert. \* Proteinkonzentration gemessen mit Bradford nach der Resolubilisierung des Pellets. n/a= nicht angegeben

	Fraktion	Volumen [mL]	Protein-konz. [mg/mL]*	Aktivität [U/mL]	Gesamt-aktivität [U]	Gesamt-aktivität [%]	Spez. Aktivität [U/mg]*
Vor KIA	Retentat 1	130	1,90	1295	168350	100	680
Nach KIA	Peak in Waschfraktion	12	n/a	400	4800	3	n/a
	Durchlauf	130	n/a	37	4810	3	n/a
	A11	5	2,52	1134 <sup>1</sup>	5670	3	450 <sup>1</sup>
	A12	5	19,36	7743 <sup>1</sup>	38715	23	400 <sup>1</sup>
	B12	5	6,42	2887 <sup>1</sup>	14435	9	450 <sup>1</sup>
	B11	5	4,52	1822 <sup>1</sup>	9110	5	403 <sup>1</sup>
	B10	5	2,51	1255 <sup>2</sup>	6275	4	500 <sup>2</sup>
	B09	5	n/a	855 <sup>1</sup>	4275	3	n/a
	B08	5	1,59	588 <sup>1</sup>	2940	2	370 <sup>1</sup>

### 8.3.2 IMAC- Chromatographiedaten der rPK-CT-His120-Aufreinigung

Tabelle 8-2: Proteaseaktivitäten von Fraktionen vor und nach der IMAC aus dialysiertem Überstand der Schüttelkolbenexpression X33/pPICZαA-Pro-PK-CT-6xHis Klon 120. \* Proteinkonzentration gemessen mit Bradford.

	Fraktion	Volumen [mL]	Aktivität [U/mL]	Gesamtaktivität [U]	Gesamtaktivität [%]	Proteinkonzentration [mg/mL]	Spez. Aktivität* [U/mg]
Vor IMAC	Überstand	500	15	7500	100	0,053	283
	Durchlauf	500	0,4	210	2,87		
	B2	1,5	2	3	0,04		
	B3	1,5	13	20	0,27	/	/
	B4	1,5	68	102	1,36		
	B5	1,5	369	553	7,38		
	B6	1,5	941	1412	18,82		
	B7	1,5	1232	1848	24,64	2,96	416
	B8	1,5	1174	1761	23,48		
	B9	1,5	665	998	13,30		
	B10	1,5	366	549	7,32		
Nach IMAC	B11	1,5	256	385	5,13		
	B12	1,5	198	297	3,96		
	B13	1,5	109	164	2,19		
	B14	1,5	65	98	1,30	/	/
	B15	1,5	36	54	0,72		
	C1	1,5	19	28	0,38		
	C2	1,5	14	20	0,27		
	C3	1,5	8	11	0,15		
	C4	1,5	5	8	0,10		
	C5	1,5	4	6	0,08		
	C6	1,5	3	4	0,05		
Pool	B4-B7	6	564	3384	45,12	1,40	402

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Uwe Hildebrandt Familienstand: ledig  
Geburtsdatum/-ort: 12.03.1984 Schkeuditz Akademischer Grad: Diplom-Biologe  
Nationalität: deutsch

### Schulischer und Beruflicher Werdegang

12/2014– derzeit	<b>Process Manager Vaccines</b> IDT-Biologika GmbH; Bereich Impfstoffe Human
11/2010– 12/2015	<b>Promotion Universität Halle-Wittenberg</b> Institut für Pharmazie; Institutsbereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie; AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte „Design und Einsatz von Enzymen zur Bekämpfung von Biofilmen“
10/2004– 11/2010	<b>Studium Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg</b> Studium der Biologie an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften Diplomarbeit (AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte) „Untersuchungen zur Optimierung einer mikrobiellen Transglutaminase mittels DNA-Shuffling“
09/2009– 03/2010	<b>Hilfskraft Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg</b> Institut für Pharmazie; Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte
05/2009– 06/2009	<b>Praktikum Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg</b> Medizinische Fakultät; Institut für medizinische Immunologie Abteilung HLA-Labor; Low-Resolution-HLA-Typisierung mittels SSP-PCR, Crossmatch-ELISA zum Nachweis Spenderspezifischer Antikörper im Serum potentieller Transplantatempfänger
12/2008– 04/2009	<b>Praktikum Biologikum Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg</b> Abteilung Entwicklungsgenetik; Histonmodifikation und Kontrolle der Heterochromatinstillegung in <i>Drosophila melanogaster</i> ; Mutagenese-experimente der Positions-Effekt Varigation am Beispiel pitkin
09/2008– 12/2008	<b>Hilfskraft Martin-Luther- Universität Halle-Wittenberg</b> Helmholz Institut Halle; Zentrum für Umweltforschung UFZ
07/2003– 03/2004	<b>Grundwehrdienst der Bundeswehr</b>
09/2000– 07/2003	<b>Wirtschaftsgymnasium „Dr. Hermann Schulze-Delitzsch“</b> Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

Uwe Hildebrandt

Leipzig, den 12.04.2015