

Entwicklung eines Expressionsscreenings zur Herstellung antimikrobieller Peptide

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Dipl.-Biochem. Christine Schreiber
geboren in Gelnhausen

Gießen, 2017

Diese Veröffentlichung ist Teil meiner Promotion zum Doktor der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) durch den Fachbereich Biologie und Chemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.

Dekan: Prof. Dr. Volker Wissemann

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

Zweitgutachter: Prof. Dr. Marc F. Schetelig

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und
Pharmazeutische Technologie

Band 7

Christine Schreiber

**Entwicklung eines Expressionsscreenings
zur Herstellung antimikrobieller Peptide**

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag
Aachen 2017

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2017

Copyright Shaker Verlag 2017

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-5507-8

ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Danksagung

Ohne das Mitwirken zahlreicher Personen und Institutionen wäre das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Deswegen danke ich:

Meinem Doktorvater Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen, die Betreuung und die Freiheiten in Konzeption und Durchführung des Promotionsprojekts.

Prof. Dr. Marc F. Schetelig für die konstruktive Kritik zur Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dem Land Hessen, der Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz (LOEWE) und der Technischen Hochschule Mittelhessen für die Finanzierung meiner Promotionsstelle inklusive der Bereitstellung von Arbeitsmitteln und der Teilnahme an Konferenzen und Fortbildungen.

Dr.-Ing. Denise Salzig für die fachliche Betreuung, ihre konstruktiven Anregungen sowie ihr ständig offenes Ohr und ihre Diskussionsbereitschaft – und die Fähigkeit zur Motivation während der Durststrecken, in denen nichts klappen wollte.

Dr.-Ing. Tobias Weidner für die kompetente Übernahme der fachlichen Betreuung gegen Ende des Projekts trotz der damit verbundenen Mühe der Einarbeitung in ein bereits fortgeschrittenes Projekt und für die konstruktive Kritik zur vorliegenden schriftlichen Ausarbeitung.

Dr. Doreen Heerd für ihr offenes Ohr und ihre hilfreichen Vorschläge zum Promotionsprojekt und dem Verfassen von Publikation und Dissertation.

Den Bacheloranden Nicolas Schneider und Moritz Klein für die Durchführung von Experimenten zum Expressionsscreening in *E. coli* (Nicolas Schneider: Etablierung des Screenings, Moritz Klein: Durchführung des Screenings).

Der Bachelorandin Katharina Marburger für die Mitarbeit in der Zellkultur (Etablierung der Kultivierung von S2-Zellen in unserem Labor, Vorarbeiten zur Etablierung einer Transfektionsmethode, Erstellen der Dosis-Wirkungskurve von Blasticidin S auf S2-Zellen, Hilfe bei der Stammhaltung der S2-Zellen).

Florian Scholz für die Reaktorkultivierungen von *E. coli* und die Mithilfe bei den Experimenten zur Etablierung einer Aufreinigungsstrategie von BR021.

Malte Loos, Miriam Blumenstock und Gabriele Steppeler für die Mithilfe bei der Stammhaltung der S2-Zellen.

Jan Zitzmann für die tatkräftige Hilfe und Erklärungen bei der Reaktorkultivierung der S2-Zellen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik am IBPT, allen voran meinen Bürokollegen Gundula Sprick und Daniel Hoffmann, für das tolle Arbeitsklima, die vielen, vielen anregenden Gespräche, die konstruktive Kritik und das Teilen des Leids in den Phasen, in denen ein erfolgreicher Abschluss des Projekts unerreichbar schien.

Außerdem meinen Freunden und meiner Familie für die moralische Unterstützung und Motivation während der gesamten Promotionsphase.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Veröffentlichungen mit Peer-Review-Prozess

Schreiber C*, Müller H*, Birrenbach O, Klein M, Heerd D, Weidner T, Salzig D, Czermak P (2017): A high-throughput expression screening platform to optimize the production of antimicrobial peptides. *Microbial Cell Factories* 16 (1):29ff (*: geteilte Erstautorenschaft)

Bolouri Moghaddam MR, Tonk M, **Schreiber C**, Salzig D, Czermak P, Vilcinskas A, Rahnamaeian M (2016): The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides. *Biological Chemistry* 397 (9):939–945

Buchkapitel

Zitzmann J, Sprick G, Weidner T, **Schreiber C**, Czermak P (2017): Process Optimization for Recombinant Protein Expression in Insect Cells. In Gowder S (ed.): New Insights into Cell Culture Technology. *InTech Europe*, ISBN 978-953-51-3133-5

Konferenz-Vortrag

Schreiber C, Weidner T, Salzig D, Czermak P (2016): Expression screening in *Escherichia coli* using a Golden Gate based modular plasmid library. *17th European Congress on Biotechnology*, Krakau (Polen). Abstract wurde veröffentlicht in *New Biotechnology* 33:S48-S49

Konferenz-Poster

Schreiber C, Salzig D, Czermak P (2015): Engineering of stable *Drosophila melanogaster* cell lines for recombinant protein production by recombinase-mediated cassette exchange. *24th ESACT Meeting*, Barcelona (Spanien).

Schreiber C, Müller H, Salzig D, Czermak P (2014): A novel approach of a modular plasmid library for expression screening in *Escherichia coli*. *European Biotechnology Congress 2014*, Lecce (Italien). Abstract wurde veröffentlicht in *Journal of Biotechnology* 185:S56

Zusammenfassung

Antimikrobielle Peptide (AMPs) aus Insekten können möglicherweise als Alternativen zu Antibiotika gegen pathogene Keime und für weitere biotechnologische Anwendungen genutzt werden. Der Erfolg der heterologen Expression dieser Peptide in *E. coli* hängt maßgeblich vom verwendeten Promotor, Fusionsprotein und Expressionsstamm ab. Insekten-AMPs unterscheiden sich aufgrund der enormen Biodiversität der Klasse der Insekten stark in ihren strukturellen und biochemischen Eigenschaften. Die optimale Stamm/Plasmid-Kombination muss deshalb für jedes AMP empirisch in einem Expressionsscreening ermittelt werden.

Zur Identifizierung der Stamm/Plasmid-Kombination mit der höchsten Proteinausbeute wurde in dieser Arbeit ein Expressionsscreening für *E. coli* entwickelt. Den Kern des Screenings bildet eine modulare Plasmidbibliothek, in der die Expressionsplasmide ausgehend von einzelnen Plasmid-Modulen wie Promotor und Fusionspartner-Gen assembliert werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Golden Gate-Klonierung eine geeignete und robuste Methode zur Herstellung einer solchen modularen Plasmidbibliothek darstellt. Robust heißt dabei, dass die Klonierung unabhängig von den eingesetzten Plasmid-Modulen erfolgreich durchführbar ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden drei Insekten-AMPs, die sich stark in ihren Eigenschaften unterscheiden und schwierig zu exprimieren sind, als Modellpeptide ausgewählt und zur systematischen Untersuchung der Effizienz der Golden Gate-Klonierung und zur Durchführung des Expressionsscreenings eingesetzt. Eines der AMPs beinhaltet fünf Disulfidbrücken, eines ist toxisch gegenüber *E. coli* und das dritte weist keine Besonderheiten auf. Zur Untersuchung wurden 27 Expressionsplasmide hergestellt und für ein Expressionsscreening mit 76 Stamm/Plasmid-Kombinationen in einer 96-Well-Platte verwendet. Die Eignung der Golden Gate-Klonierung zum Aufbau der modularen Plasmidbibliothek wurde durch die erfolgreiche Assemblierung aller 27 Expressionsplasmide bestätigt. Zudem wurde die Notwendigkeit des Expressionsscreenings gezeigt, da das Screening für jedes AMP ein anderes Ergebnis lieferte: Für ein AMP wurde die höchste Ausbeute durch die Expression als Trx-AMP-Fusionsprotein erzielt (1,6 mg/g_{BFM}), für das zweite AMP als GST-AMP-Fusionsprotein (0,2 mg/g_{BFM}) und das dritte AMP (BR021) wurde in keiner getesteten Stamm/Plasmid-Kombination löslich exprimiert.

Um BR021 und weitere AMPs, die sich in *E. coli* nicht exprimieren lassen, produzieren zu können, wurden Schneider 2 (S2)-Zellen aus *Drosophila melanogaster* als alternatives Expressionssystem herangezogen. Es wurde die Hypothese überprüft, ob auch Expressionsplasmide für S2-Zellen über Golden Gate-Klonierung hergestellt werden können. Die Hypothese konnte durch die erfolgreiche Assemblierung einer Reihe von S2-Expressionsplasmiden bestätigt werden, wobei die Effizienz der Klonierung niedriger lag als bei den *E. coli*-Expressionsplasmiden. Um im S2-Expressionsscreening unerwünschte Nebeneffekte durch unterschiedliche Kopienzahlen und Integrationsorte der Expressionsplasmide zu minimieren, wurde ein Konzept zur Herstellung von monoklonalen S2-Produktionszelllinien über ein Flipase-vermitteltes Kassettenaustauschverfahren, welches bislang noch nicht in S2-Zellen eingesetzt wurde, erarbeitet. In diesem Zusammenhang wurde ein Verfahren zur Einzelklonisierung von S2-Zellen etabliert, das auf der Verwendung untransfizierter *Feeder*-Zellen basiert.

Das in dieser Arbeit entwickelte auf der Golden Gate-Klonierung basierende Expressionsscreening ist für alle Labore, die rekombinante Proteine herstellen, ein hilfreiches Werkzeug zur Identifikation der optimalen Kombination aus Expressionsplasmid und -organismus.

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) from insects are promising candidates as alternative antibiotics and for further biotechnological purposes. The success of heterologous AMP expression in *E. coli* mainly depends on the choice of promoter, fusion partner and expression strain. Because of the enormous diversity of the insect class the insect AMPs vary greatly in their structural and biochemical properties. The determination of the optimal strain/plasmid combination is therefore an empirical process.

To identify the expression strain/plasmid combination with the highest protein yield, an expression screening was developed in this work. The screening is based on a modular plasmid library, in which the expression plasmids are assembled from single plasmid modules like the promoter and fusion partner gene. It was hypothesized that Golden Gate cloning is a suitable and robust method for the generation of the modular plasmid library. Robust means that Golden Gate assembly can be carried out successfully, independent of the plasmid modules which are used. To test this hypothesis, three difficult-to-express insect AMPs with different characteristics were chosen as model peptides for a systematic analysis of Golden Gate cloning efficiency and expression screening. One of the AMPs has five disulfide bonds, one is toxic against *E. coli* and the third one has no special characteristics. For the analysis, 27 expression plasmids were generated and used for an expression screening with 76 strain/plasmid combinations in a 96 well plate. The successful assembly of all 27 expression plasmids confirmed that Golden Gate cloning is a robust technique to build up the modular expression plasmid library. Moreover, the need to carry out an expression screening was shown, because for every AMP the screening outcome was different: For one AMP, the highest protein yield was reached by expression as Trx-AMP fusion protein (1,6 mg/g), for another as GST-AMP fusion protein (0,2 mg/g) and the third one (BR021) was not expressed solubly in any of the strain/plasmid combinations.

To produce BR021 and other AMPs that cannot be expressed in *E. coli*, *Drosophila melanogaster* Schneider 2 (S2) cells were used as an alternative expression host. It was hypothesized that also expression plasmids for S2 cells can be generated by Golden Gate cloning. The hypothesis was confirmed by the successful assembly of a set of S2 expression plasmids. The cloning efficiency was lower than for the *E. coli* plasmids. To reduce the side effects in the S2 expression screening, caused by differences in the copy number and integration site of the plasmids in the genome, a concept for the generation of monoclonal S2 production cell lines by flipase-mediated cassette

exchange, which had not been reported for S2 cells before, was developed. In this context a single cell cloning method for S2 cells was established by using non-transfected feeder cells.

For all laboratories working in the field of recombinant protein production, the Golden Gate-based expression screening that was developed in this work is a powerful tool to identify the optimal combination of expression plasmid and host for the expression of newly discovered proteins.

Inhalt

Danksagung.....	I
Publikationen und Konferenzbeiträge	III
Zusammenfassung	V
Abstract.....	VII
1 Stand des Wissens.....	1
1.1 Antimikrobielle Peptide	1
1.1.1 Expression antimikrobieller Peptide	2
1.1.1.1 Toxizität	3
1.1.1.2 Disulfidbrücken.....	4
1.1.1.3 Fazit zur Expression antimikrobieller Peptide.....	5
1.1.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> im Bioreaktor	5
1.1.3 Modellpeptide.....	6
1.1.3.1 Insektenmetalloprotease-Inhibitor aus <i>Galleria mellonella</i>	6
1.1.3.2 Antifungales Peptid aus <i>Lucilia sericata</i>	8
1.1.3.3 BR021 aus <i>Harmonia axyridis</i>	9
1.2 Parameter im <i>E. coli</i>-Expressionsscreening.....	10
1.2.1 Promotoren.....	11
1.2.1.1 T7/ <i>lac</i> -Promotorsystem	12
1.2.1.2 T5/ <i>lac</i> -Promotorsystem	13
1.2.1.3 <i>araBAD</i> -Promotor	13
1.2.2 Fusionspartner	13
1.2.2.1 Thioredoxin	13
1.2.2.2 Glutathion-S-Transferase	14
1.2.3 <i>E. coli</i> -Stämme	15
1.3 Klonierung: DNA-Assemblierungsmethoden	17
1.3.1 Gateway-Klonierung.....	18
1.3.2 Ligations-unabhängige Klonierung.....	18
1.3.3 Gibson-Klonierung.....	19
1.3.4 <i>Seamless Ligation Cloning Extract</i>	20
1.3.5 <i>Circular Polymerase Extension Cloning</i>	21
1.3.6 <i>E. coli</i> GB05-dir und GB08-red.....	21
1.3.7 Restriktionsfreie Klonierung.....	22
1.3.8 BioBrick	22

1.3.9	Golden Gate-Klonierung	23
1.3.10	Gegenüberstellung der Methoden	26
1.4	Expression in Insektenzellen	27
1.4.1	Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch	28
1.4.2	Einzelklonisierung	29
1.4.3	Kultivierung von Insektenzellen im Bioreaktor	31
2	Zielsetzung der Arbeit	33
3	Material und Methoden	35
3.1	Material	35
3.1.1	Plasmide	35
3.1.2	Stämme	36
3.1.3	Primer	37
3.1.4	Puffer und Medien	38
3.1.5	Antibiotika und Induktoren	39
3.2	Molekularbiologische Methoden	39
3.2.1	Golden Gate-Klonierung	39
3.2.2	Verdau von Plasmid-DNA	40
3.2.3	Präparative PCR	40
3.2.4	Colony-PCR	41
3.2.5	Plasmid-Präparation	42
3.2.6	Reinigung von DNA-Fragmenten	43
3.2.7	DNA-Konzentrationsbestimmung	43
3.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	43
3.2.9	Sequenzierung	43
3.2.10	Southern Blot	44
3.3	Mikrobiologische Methoden	46
3.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	46
3.3.2	Herstellung von <i>E. coli</i> -Kryokulturen	46
3.3.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> NEB 10-beta	47
3.3.4	Transformation über Hitzeshock und Blau-Weiß-Screening	47
3.3.5	Homologe Rekombination mit <i>E. coli</i> GB05-dir	47
3.3.6	Vorbereitung von <i>E. coli</i> auf die Elektroporation	48
3.3.7	Transformation über Elektroporation	48
3.3.8	Expressionsscreening in <i>E. coli</i>	48
3.3.9	Expression im Schüttelkolben	49
3.3.10	Expression in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) im Bioreaktor	49

3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	50
3.4.1	Resolubilisierung der <i>Inclusion Bodies</i>	50
3.4.2	Rückfaltung über Dialyse.....	50
3.4.3	Rückfaltung über <i>Rapid Dilution</i> und Aufkonzentrierung.....	51
3.4.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	51
3.4.5	ELISA	52
3.4.6	SDS-PAGE	52
3.4.7	Western Blot.....	53
3.4.8	Thrombin-Verdau.....	54
3.4.9	Größenausschlusschromatographie	54
3.4.10	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie	55
3.4.11	IMPI-Inhibitionsassay.....	55
3.5	Zellbiologische Methoden.....	55
3.5.1	Kultivierung von S2-Zellen.....	55
3.5.2	Bestimmung der Zellzahl und -vitalität.....	56
3.5.3	Transfektion von S2-Zellen	56
3.5.4	Herstellung stabiler S2-Zelllinien über Zwei-Plasmid-System	57
3.5.5	Expression von BR021-Thr-V5-His in S2-Zellen im Bioreaktor.....	57
3.5.6	Herstellung der polyklonalen S2-GFP-Zelllinie	58
3.5.7	Einzelklonisierung mit untransfizierten <i>Feeder</i> -Zellen.....	58
3.5.8	Herstellung Gesamtzelllysats von S2-Zellen	59
3.6	Zellbasierte Assays	60
3.6.1	Dosis-Wirkungskurve von BR021 auf <i>E. coli</i>	60
3.6.2	Dosis-Wirkungskurve von BR021 auf S2-Zellen	60
3.6.3	Dosis-Wirkungskurven von Antibiotika auf S2-Zellen	60
3.7	Berechnungsgrundlagen	60
3.7.1	Wachstumsrate	60
3.7.2	Korrelation der Permittivität zur Zelldichte	61
3.8	Fehlerbetrachtung und Statistik.....	62
4	Ergebnisse und Diskussion	65
4.1	Klonierung.....	65
4.1.1	Konzept.....	65
4.1.2	<i>Proof of Principle</i>	68
4.1.3	Herstellung der <i>E. coli</i> -Expressionsplasmide	72
4.2	Expressionsscreening in <i>E. coli</i>.....	78
4.2.1	Konzept.....	78

4.2.2	Etablierung des Expressionsscreenings	79
4.2.2.1	Wachstum der Expressionsstämme in 96-Well-Platte	79
4.2.2.2	Überprüfung der Spezifität des His ₆ -ELISA	80
4.2.2.3	Übertragbarkeit der Ergebnisse des Expressionsscreenings	81
4.2.3	Ergebnisse Expressionsscreening	83
4.2.3.1	Insektenmetalloprotease-Inhibitor	84
4.2.3.2	Antifungales Peptid	86
4.2.3.3	BR021	87
4.3	Expression und Aufreinigung von His₆-Trx-BR021	90
4.3.1	Expression im Bioreaktor	90
4.3.2	Resolubilisierung der <i>Inclusion Bodies</i>	92
4.3.3	Rückfaltung	93
4.3.4	Thrombin-Verdau	97
4.4	Expression von BR021 in S2-Zellen	100
4.4.1	Plasmide	101
4.4.2	Herstellung der stabilen Zelllinien	102
4.4.3	Expression und Aufreinigung	106
4.4.4	Fazit zur Expression von BR021 in S2-Zellen	109
4.5	Screening in Insektenzellen über Kassettenaustausch	109
4.5.1	Konzept	109
4.5.2	Golden Gate-Klonierung der Insektenzell-Expressionsplasmide	112
4.5.3	Herstellung der polyklonalen Zelllinie mit <i>Tagging</i> -Kassette	114
4.5.4	Einzelklonisierung	117
4.5.5	Charakterisierung der Einzelklone	121
4.5.6	Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch	124
5	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	129
	Literaturverzeichnis	133
	Anhang	147
	Ergänzungen zum Stand des Wissens	147
	Zusätzliche Daten	148
	Herkunft der Gensequenzen	149
	Abbildungsverzeichnis	151
	Tabellenverzeichnis	153
	Abkürzungsverzeichnis	154