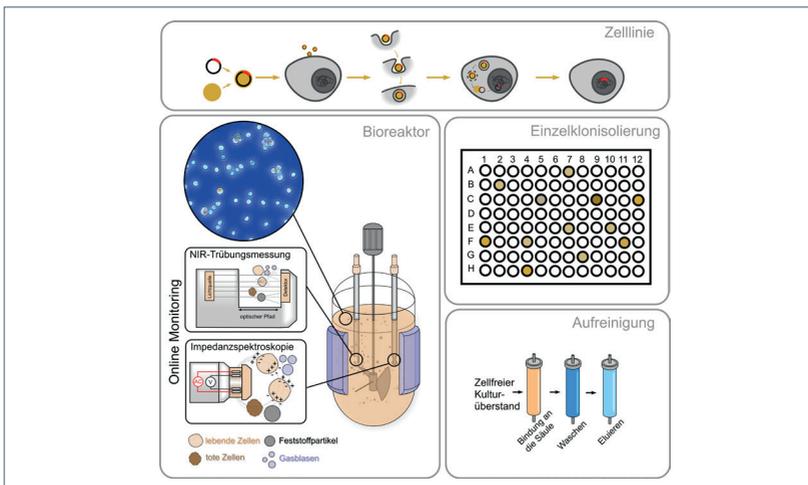


## Jan Zitzmann

# Prozessintensivierung für die Produktion von antimikrobiellen Peptiden mit stabil transfizierten *Drosophila melanogaster* S2-Zelllinien



---

Prozessintensivierung für die Produktion von  
antimikrobiellen Peptiden mit stabil transfizierten  
*Drosophila melanogaster* S2-Zelllinien

---

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium - Dr. rer. nat.

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

vorgelegt von:

**Jan Zitzmann**

geboren in Suhl

Gießen, Januar 2019

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. Jürgen Janek

**Erstgutachter:**

Prof. Dr. Peter Czermak

Technische Hochschule Mittelhessen, Fachbereich LSE, IBPT  
Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Biologie und Chemie

**Zweitgutachter:**

Dr. Martin Rühl

Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Biologie und Chemie,  
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und  
Pharmazeutische Technologie

Band 14

**Jan Zitzmann**

**Prozessintensivierung für die Produktion von  
antimikrobiellen Peptiden mit stabil transfizierten  
*Drosophila melanogaster* S2-Zelllinien**

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag  
Düren 2019

**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., 2019

Copyright Shaker Verlag 2019

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

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-6884-9

ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Telefon: 02421 / 99 0 11 - 0 • Telefax: 02421 / 99 0 11 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • E-Mail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

# Kurzfassung

Antimikrobielle Peptide (AMPs) von Insekten sind wertvolle Ressourcen für die pharmazeutische Industrie und können als Leitstrukturen für die Entwicklung neuartiger Antibiotika dienen. Um dieses Potenzial zu nutzen, ist eine effiziente rekombinante Expression erforderlich. Die Etablierung einer diesbezüglichen Herstellungsplattform umfasst sowohl die Auswahl eines geeigneten Expressionswirts als auch die Prozessoptimierung während des späteren *Scale-Ups*. Die vorliegende Arbeit beschreibt die rekombinante Herstellung von zwei AMPs, die ursprünglich aus der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* bzw. dem asiatischen Marienkäfer *Harmonia axyridis* isoliert wurden. Als Expressionswirt wurden stabil transfizierte *Drosophila melanogaster* S2-Zellen eingesetzt. Basierend auf der polyklonalen Population, die nach der Transfektion vorlag, konnten mittels *Limiting Dilution* hochproduktive Einzelzellklone isoliert werden, welche typischerweise eine zwei- bis sechsfach höhere zellspezifische Produktivität aufwiesen. Im Zuge einer weiteren Optimierung wurde ein statistisch geplantes Screening zur Bestimmung der optimalen Induktionsbedingungen durchgeführt. Während des anschließenden *Scale-Ups* in den 1 L-Bioreaktor-Maßstab ermöglichte die Online-Messung der dielektrischen Eigenschaften der Zellsuspension sowie die Messung der vorliegenden Trübung eine effiziente Prozesskontrolle. Basierend darauf wurden in ersten Batch- oder Fed-Batch-Prozessen 17 bis 30 mg der AMPs produziert. Eine weitere Prozessintensivierung erfolgte durch den Wechsel zu einem TFF-basierten Perfusionsprozess. Dadurch konnte die Proteinausbeute bereits in einem sehr kurzen Pilotversuch auf 130 mg erhöht werden. Schließlich wurden die funktionellen AMPs durch Metallionenaffinitätschromatographie aufgereinigt und hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Eigenschaften gegen *Escherichia coli* untersucht. Dabei ließ sich die erfolgreiche Produktion aktiver Peptide nachweisen.

**Schlagwörter:** Rekombinante Proteinproduktion, antimikrobielle Peptide und Proteine, stabil transfizierte *Drosophila melanogaster* S2-Zellen, Online-Monitoring, Dielektrische Spektroskopie, Trübungsmessung, Prozesskontrolle, Prozessintensivierung

# Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) from insects are valuable resources for pharmaceutical industry and can serve as leads for the development of novel antibiotics. To access this potential an effective recombinant expression process is mandatory, which includes the selection of a suitable expression host as well as process optimization during scale up. The present thesis describes the recombinant production of two AMPs derived from the greater wax moth *Galleria mellonella* or the asian ladybug *Harmonia axyridis* using stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. Based on the polyclonal population that was obtained after transfection, we isolated highly productive single cell clones by limiting dilution and achieved typically a two to sixfold increase in productivity. Further optimization on the cellular level included a statistical planned screening to determine optimal conditions for induction of the employed Metallothionein promoter. The online measurement of the cell suspensions dielectric properties and turbidity enabled an efficient process control and monitoring of the cells physiological status. Based on this information, 17-30 mg of the AMP was expressed at the 1 L bioreactor scale in batch or fed batch mode. The expression was further intensified by switching to a tangential flow filtration-based perfusion process. Using a short perfusion run at the bench scale already increased the final protein yield to 130 mg using essentially the same equipment as for batch culture. Finally, the functional AMPs were recovered by metal ion affinity chromatography and the antimicrobial properties against *Escherichia coli* were tested, indicating the successful isolation of active peptides.

**Keywords:** recombinant protein expression, antimicrobial peptides, stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells, online monitoring, dielectric spectroscopy, turbidity measurement, process control, process intensification

# Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung .....	I
Abstract .....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Vorwort .....	XII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>3</b>
<b>3 Grundlagen.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1 Antimikrobielle Peptide (AMP) .....</b>	<b>6</b>
3.1.1 AMPs als Leitstruktur für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe.....	6
3.1.2 Möglichkeiten zur Herstellung antimikrobieller Peptide .....	7
3.1.3 GmGloverin – ein AMP aus <i>Galleria mellonella</i> .....	10
3.1.4 BR021 – ein AMP aus <i>Harmonia axyridis</i> .....	12
<b>3.2 Insektenzellkultur als Basis zur rekombinanten Proteinherstellung.....</b>	<b>14</b>
3.2.1 Etablierte Insektenexpressionssysteme .....	14
3.2.2 Stabil transfizierte <i>Drosophila</i> Schneider 2-Zellen als effiziente Wirtsorganismen für die Produktion rekombinanter Proteine .....	14
3.2.3 Herstellung monoklonaler Zelllinien.....	25
<b>3.3 Bioverfahrenstechnische Anforderungen bei der Kultivierung von     Insektenzellen .....</b>	<b>29</b>
3.3.1 Anforderungen an die Kultivierungsumgebung und das Medium.....	29
3.3.2 Reaktorarten und Prozessführung.....	33
3.3.3 Auslegung des Bioreaktorsystems für die Insektenzellkultur.....	35
3.3.4 Modellierung der Kultivierung.....	51

<b>3.4</b>	<b>Online-Biomassebestimmung als Teil der guten Herstellungspraxis .....</b>	<b>52</b>
3.4.1	Ziele von PAT und verfügbare Systeme .....	52
3.4.2	Dielektrische Spektroskopie .....	54
3.4.3	Trübungsmessung im nahinfraroten Bereich.....	58
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>Übersicht des Arbeitsablaufs .....</b>	<b>60</b>
<b>4.2</b>	<b>Material .....</b>	<b>61</b>
4.2.1	Plasmide .....	61
4.2.2	Primer.....	61
4.2.3	Mikroorganismen und Zelllinien.....	62
4.2.4	Antibiotika und Induktoren .....	62
4.2.5	Puffer und Kulturmedien .....	63
4.2.6	Laborgeräte und Software .....	65
<b>4.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>66</b>
4.3.1	Übersicht der genutzten Zelllinien und Vektoren .....	66
4.3.2	Golden Gate Klonierung .....	67
4.3.3	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	69
4.3.4	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	69
4.3.5	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung.....	70
4.3.6	Verdau von Plasmid-DNA .....	70
4.3.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	70
4.3.8	Verifikation der Plasmide mittels Sanger-Sequenzierung.....	71
4.3.9	Isolation hochreiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	71
<b>4.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>71</b>
4.4.1	Kultivierung von <i>Drosophila melanogaster</i> Schneider 2 Zellen.....	71
4.4.2	Kryokonservierung <i>Drosophila</i> S2-Zellen.....	72
4.4.3	Offline-Bestimmung der Zellzahl und Vitalität .....	72
4.4.4	Transiente Transfektion von S2-Zellen .....	73
4.4.5	Herstellung stabiler polyklonaler Zelllinien .....	73
4.4.6	Selektion monoklonaler Produktionszelllinien mittels Limiting Dilution .....	74
<b>4.5</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>75</b>
4.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Extinktionsmessung.....	75
4.5.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	76
4.5.3	SDS-PAGE.....	77

---

4.5.4	Western Blot.....	78
4.5.5	Dot Blot.....	78
<b>4.6</b>	<b>Entwicklung des Upstream-Prozesses.....</b>	<b>79</b>
4.6.1	Screening und Optimierung im Milliliter-Maßstab .....	79
4.6.2	AMP-Produktion im Laborbioreaktor .....	81
4.6.3	Online-Biomasse-Analytik .....	83
4.6.4	Bestimmung des Zuckerverbrauchs und der Laktatbildung.....	84
4.6.5	Analyse von extrazellulären Aminosäuren.....	84
<b>4.7</b>	<b>Aufreinigung produzierter AMPs .....</b>	<b>85</b>
4.7.1	Metallionen-Affinitätschromatographie .....	85
4.7.2	Pufferwechsel und Aufkonzentration der AMPs.....	87
4.7.3	Thrombin-Verdau und Metallionen-Affinitätschromatographie .....	87
<b>4.8</b>	<b>Aktivitäts-Assay.....</b>	<b>88</b>
<b>4.9</b>	<b>Statistische Datenanalyse.....</b>	<b>89</b>
4.9.1	Statistisch geplante Experimente zum Medienscreening.....	89
4.9.2	Auswertung der Sensordaten mittels einfacher linearer Regressionsmodelle .....	92
4.9.3	Auswertung der Sensordaten mit linear gemischten Modellen (LME) ..	93
4.9.4	Hauptkomponentenregression (PCR).....	94
<b>4.10</b>	<b>Berechnung prozessrelevanter Kenngrößen.....</b>	<b>96</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>98</b>
<b>5.1</b>	<b>Klonierung und Zelllinienentwicklung .....</b>	<b>98</b>
5.1.1	Klonierung der Expressionsplasmide .....	98
5.1.2	Transiente Transfektion und Erstellung polyklonaler Zelllinien .....	99
5.1.3	Etablierung der Einzelklonisierung für <i>D. melanogaster</i> S2-Zellen ...	99
5.1.4	Expressionsscreening für die AMP Produktion in monoklonalen S2-Zellen .....	100
5.1.5	Generelle Überlegungen zur Notwendigkeit der Einzelklonisierung .....	104
5.1.6	Bewertung der Einzelklonisierung für die Expression von AMPs ....	105
5.1.7	Limiting Dilution im Vergleich mit alternativen Techniken .....	106
<b>5.2</b>	<b>Medienoptimierung .....</b>	<b>108</b>
5.2.1	Auswahl eines Produktionsmediums.....	108
5.2.2	Untersuchungen im Produktionsmedium .....	113

<b>5.3</b>	<b>Etablierung eines PAT-konformen Produktionsprozesses .....</b>	<b>118</b>
5.3.1	Kalibrierung der genutzten Biomassesonden .....	119
5.3.2	Optimale Abstimmung von Induktion und Ernte bei der Expression von AMPs im Batch und Fed-Batch bei Kulturen mit hoher Vitalität ..	132
5.3.3	Online-Monitoring der Vitalität zur Vermeidung der Produktdegradation .....	134
5.3.4	Bewertung der Biomasse-Sensorik für die Steuerung von Batch- und Fed-Batch-Prozessen .....	139
5.3.5	Prozessintensivierung mittels Perfusionskultur .....	142
5.3.6	Bewertung der Biomasse-Sensorik für die robuste Prozessteuerung einer Perfusionskultur .....	146
5.3.7	Zusammenfassung der AMP Produktion in den verschiedenen Prozessmodi und Vergleich mit anderen Expressionsplattformen .....	147
<b>5.4</b>	<b>Aufreinigung der AMPs und Nachweis der biologischen Aktivität.....</b>	<b>151</b>
5.4.1	Ernte und Zellabtrennung .....	151
5.4.2	Aufreinigung mittels Standard-IMAC .....	151
5.4.3	Aufreinigung mittels alternativer IMAC-Protokolle .....	152
5.4.4	Gewinnung Tag-freier AMPs.....	155
5.4.5	Antimikrobielle Aktivität gegen <i>E. coli</i> .....	157
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>161</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>165</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>186</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>191</b>
	<b>Anhänge .....</b>	<b>194</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>197</b>
	<b>Publikationen und Konferenzbeiträge .....</b>	<b>198</b>