

Yeast System as Mikrobiom

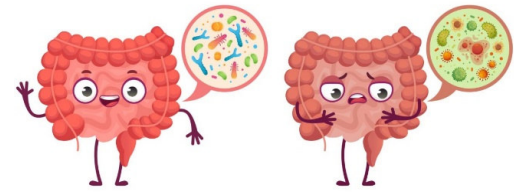


Against Porcine & Respiratory Syndrom



Dr. habil. Anna Salek, May 2024

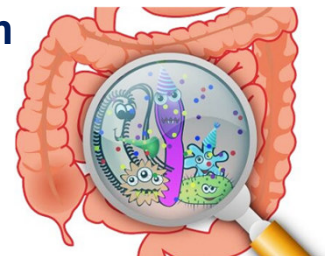
Mikrobiom

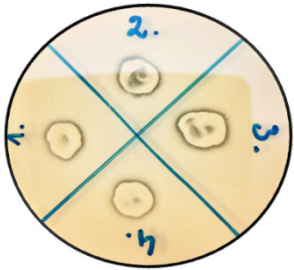


Als Mikrobiom bezeichnet man die Gesamtheit aller Mikroorganismen (Bakterien, Pilze und Protozoen), die einen Mikroorganismus (Mensch, Tier, Pflanze) besiedeln. Mikrobiome können u.a. das Immunsystem, den Stoffwechsel und das Hormonssystem ihres Wirts beeinflussen.

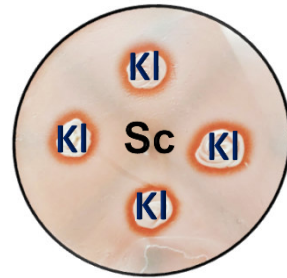
Durch ein besseres Verständnis der Rollen und Funktionalitäten dieser Mikroorganismen ist es möglich, neue Klassen von therapeutischen Präparaten wie lebende Biotherapeutika, Probiotika und Biosimilars zu entwickeln und zu produzieren, welche darauf abzielen, das Gleichgewicht des Ökosystems Mikrobiom wiederherzustellen.

Produkte, die auf lebende Mikroorganismen basieren, wirken zudem in der Regel nicht direkt, d. h. auf bestimmte Organe oder Gewebe, sondern interagieren in einem multifaktoriellen Wirkmechanismus.





Yeast System (Killer substrains)



Die Sekretion von zytotoxischen Substanzen durch Mikroorganismen ist eine Strategie um mikrobielle Konkurrenten zu bekämpfen.

In Hefe haben sich zahlreiche solcher Killer-Toxin-Systeme entwickelt, die entweder chromosomal kodiert oder mit dsRNA-Viren oder zytoplasmatischen dsDNA-Plasmiden assoziiert sind, haben sich entwickelt.

Biochemisch unterscheiden sich diese Toxine durch ihre Rezeptorspezifität, durch ihre Sekretion als Monomere oder Komplexe mit mehreren Untereinheiten sezerniert werden und ihre zytotoxische Wirkung auf die Proliferation der Zielzellen.

Die tödliche Interaktion zwischen *Kluyveromyces lactis* und *Saccharomyces cerevisiae*

ist ein Modell für ein Pathosystem, das auf **Zymocin** beruht, einem

heterotrimeren Proteintoxinkomplex, der von der Milchhefe

Kluyveromyces lactis sezerniert wird, der bei empfindlichen Hefezellen einen

irreversiblen Wachstumsstillstand verursacht. Dieses Killerphänomen wird

von einem zytoplasmatischen Paar von Killerplasmiden kodiert, pGKL1 (k1)

und pGKL2 (k2), kodiert und bewirkt letztlich einen G1-Block (Wachstumsphase) verursacht.

Kluyveromyces lactis mit linear DNA Plasmids pGKI1 & pGKI2

Kluyveromyces lactis killer cell

Susceptible yeast cell

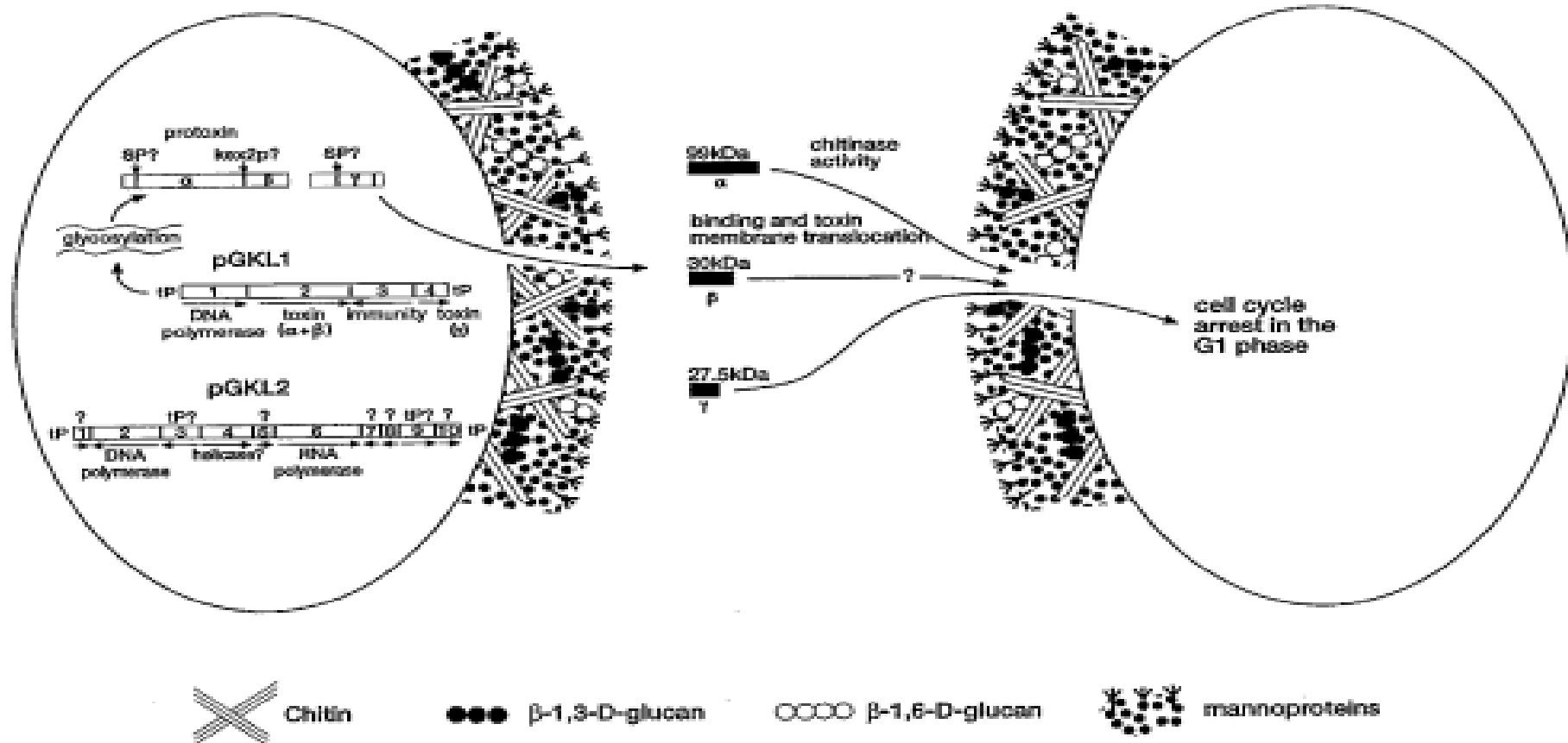
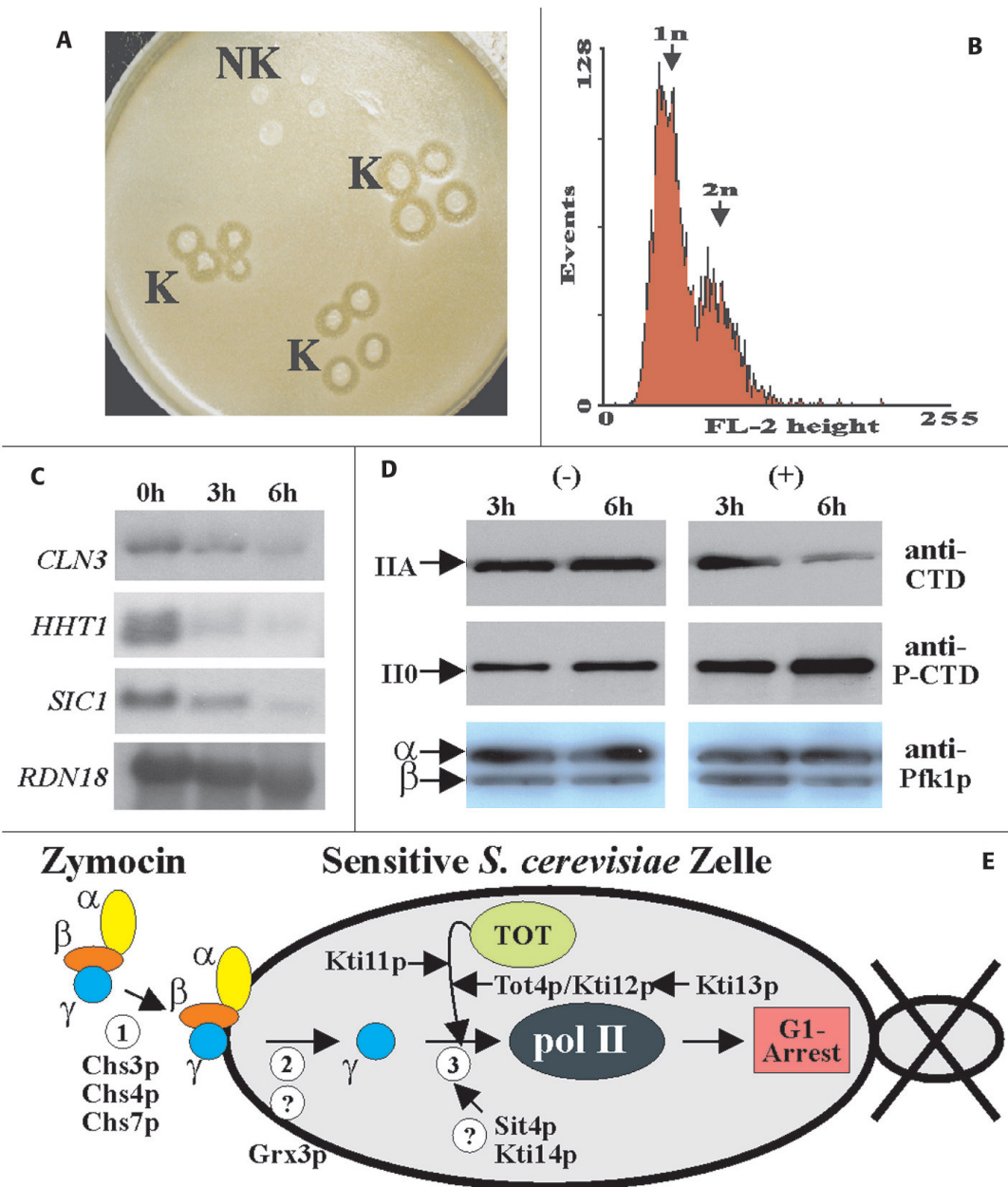


Abb. 1: Killer System in *Kluyveromyces lactis*.

Yeast Killer System

Abb. 2: Das Killersystem von *Kluyveromyces lactis*. (A) Killer- (K) und Nicht-Killerstämme (NK) wurden gegen *S. cerevisiae* inkubiert. Hemmhöfe machen die Wachstumsinhibition sichtbar. (B) FACS-Analyse. Zymocinbehandelte *S. cerevisiae*-Zellen akkumulieren in der G1-Phase des Zellzyklus mit 1n DNA-Gehalt. (C) Northern-Analysen an Zymocinunbehandelten (0h) und Zymocin-arretierten Zellen (3h bzw. 6h nach Zymocingabe). Identische Gesamt-RNA wurde auf Pol I (RDN18) und Pol II (CLN3, HHT1 und SIC1) Transkription hin untersucht. (D) Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der Pol II-Untereinheit Rbp1p. Proteinextrakte Zymocin-unbehandelter (-) und -arretierter Zellen (+) wurden mit Antikörpern, die hypo- (anti-CTD: IIA) von hyperphosphorylierter CTD (anti-P-CTD: IIO) unterscheiden, im Westernblot analysiert.

Als Ladekontrolle diente anti-Pfk1p zur Detektion der α - und β -Untereinheiten der Phosphofruktokinase. (E) Arbeitsmodell zum Zymocin-Signalweg, der in Bindung an die sensitive Zielzelle (1), γ -Toxinimport (2) und intrazelluläre Kommunikation des γ -Toxins mit TOT (3) einteilbar ist. Zu den Genprodukten (Chs3-4p, Chs7p, Grx3p, Kti11-14p & Sit4p) siehe Text.



Kluyveromyces lactis application

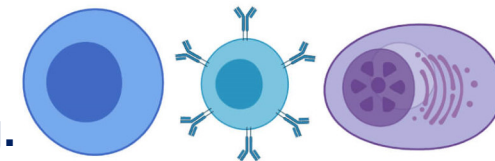
Die Schleimhäute der Atemwege und des Fortpflanzungstrakts sind der Hauptübertragungsweg für Infektionen der Atemwege.

Es wird angenommen, dass die Erzeugung einer Schleimhautimmunität mit Hilfe von Impfstoffen der beste Weg ist, um diese Infektion zu verhindern.

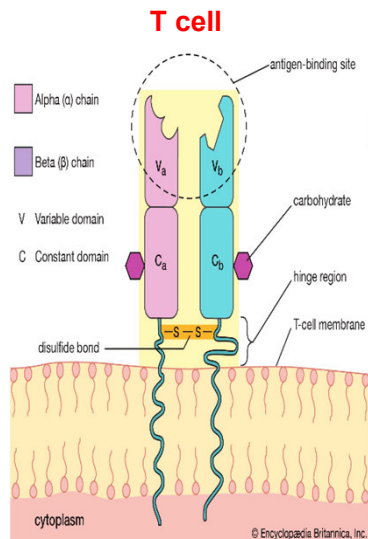
Es wurde berichtet, dass einige rekombinante Hefepilze *Kluyveromyces lactis* oral verabreicht werden können und auf diese Weise Proteine als Antigene liefern und so mukosale Immunreaktionen auslösen.

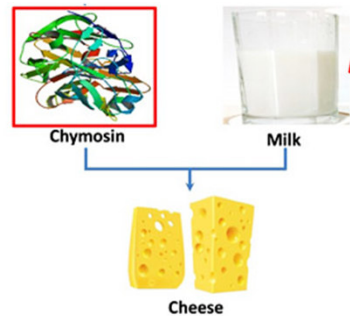
In unserer Studie haben wir natürliche *Kluyveromyces lactis* isoliert, die ein Antigen gegen das respiratorische Syndrom exprimieren,

Und haben Fähigkeit, B- und T-Zellen-vermittelte Immunantworten nach oraler nach oraler Verabreichung.



B cell, Lymphocyte





Kluyveromyces lactis application

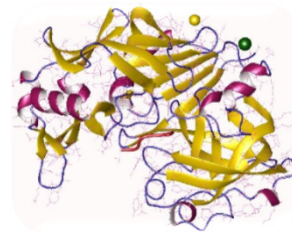
Das Hefesystem hat erwiesenermaßen Vorteile gegenüber
Herkömmlichen Systemen als Impfstoffträger.

So gilt *Kluyveromyces lactis* allgemein als sicher für Tiere und Menschen.

Kluyveromyces lactis, eine der wichtigsten Nicht-*Saccharomyces*-Hefen,
hat ähnliche Vorteile wie *Williopsis mrakii*.

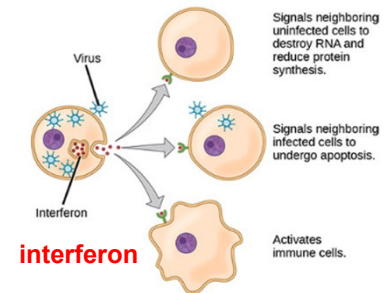
Darüber hinaus hat sich *Kluyveromyces lactis* in verschiedenen Anwendungen
in der Lebensmittelindustrie als sicher erwiesen und kann heterologe Proteine
effizient exprimieren (**Zymozin**). Außerdem sind Komponenten seiner
Zellwand, wie β -1,3-Glucan und Mannan, adjuvant Wirkungen haben.

Somit könnte *Kluyveromyces lactis* ein sicheres
und idealer Impfstoffträger sein.



Kluyveromyces lactis application

Der Erfolg von *Kluyveromyces lactis* als Wirt für die Proteinexpression in der Lebensmittelindustrie legt nahe, dass diese Hefe auch für die Produktion von therapeutischen Proteinen in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt werden könnte. Tatsächlich wurden zahlreiche Proteine von pharmazeutischer Bedeutung in *Kluyveromyces lactis* produziert worden.



Die Säugetierproteine Interleukin 1- β , Interferon α A, β -Lactoglobulin, Lysozym, Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, Serumalbumin und Insulin. *Kluyveromyces lactis* eignet sich auch für die Produktion von einkettigen Fv-Antikörpern. Außerdem produziert *Kluyveromyces lactis* kommerziell interessante native Enzyme wie Inulinase, Phospholipase B und Chitinase.

Kluyveromyces lactis application



In diesem Zusammenhang stellt *Kluyveromyces lactis* eine interessante Spezies dar. Sie ist ein attraktives Modell für biotechnologische Verfahren wie die Produktion von Pharmazeutika, Ausbeute von heterologen Proteinen.

Diese aerobe Hefe ist besonders für ihre Fähigkeit bekannt, Laktose zu assimilieren (im adaptiven Modus). *Kluyveromyces lactis* wurde als Quelle für Laktase (β -Galaktosidase) verwendet, einem Enzym, das den Milchzucker (Laktose) abbaut und für die Herstellung von laktosefreien Milchprodukten notwendig ist.

In *Kluyveromyces lactis* stützt sich der Prozess auf einem bekannten Weg, der die Gene LAC4 und LAC12 umfasst, die jeweils für eine β -Galaktosidase und Eine Laktose-Permease kodieren, sowie die Galaktose-Laktose Regulierung Gene (LAC9 und GAL80) und die Galaktose Gene (GAL1, GAL7 und GAL10).

Kluyveromyces lactis application

Kluyveromyces lactis ist am besten bekannt für seine Verwendung in der kommerziellen

Produktion des Milchgerinnenden Enzyms **Chymosin** bekannt.

Bis heute wurden über 40 heterologer Proteine mit *Kluyveromyces lactis* hergestellt, was seine

Nützlichkeit als alternatives Hefeexpressionssystem verdeutlicht.

Als Wirt für die Produktion heterologer Proteine hat *Kluyveromyces lactis* eine Reihe von

Vorteilen gegenüber anderen Hefeexpressionssystemen.

Kluyveromyces lactis ist auch sehr aktiv im Katabolismus von Peptiden

und Aminosäuren, was zur Produktion einer Vielzahl

von Aromen führt.



Kluyveromyces lactis application

Laktosehydrolysierte Milch verbessert auch die Symptome der Laktoseintoleranz bei Kindern und Erwachsenen. Ein Nebenprodukt von Laktose hydrolysiertes Milch ist eine erhöhte Süße aufgrund des

Vorhandenseins von freier Glukose. Diese erhöhte Süße kann die Akzeptanz der Milch bei Kindern erhöhen. Die Fähigkeit von

Kluyveromyces lactis, Milchbestandteile zu metabolisieren

(Laktose, Proteine und Fett) zu verstoffwechseln, sind sie sehr

wichtig für die Reifung von Käse und fermentierten Milchprodukten wie Kefir, da sie

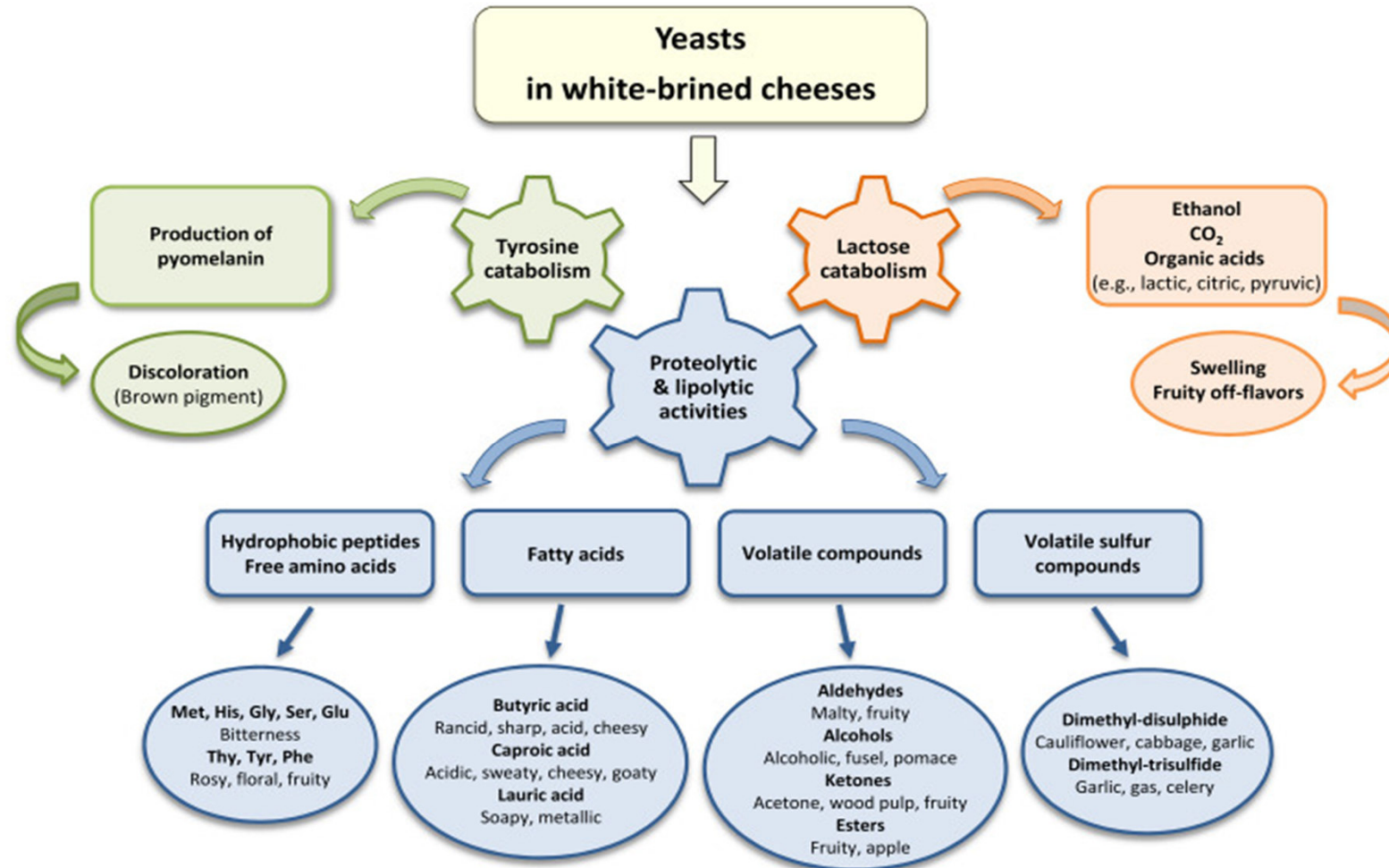
zur Reifung und Aromabildung beitragen. *Kluyveromyces lactis* ist sehr aktiv bei der

Verstoffwechslung von Peptiden und Aminosäuren (proteolytisch) sowie von Fett (lipolytisch),

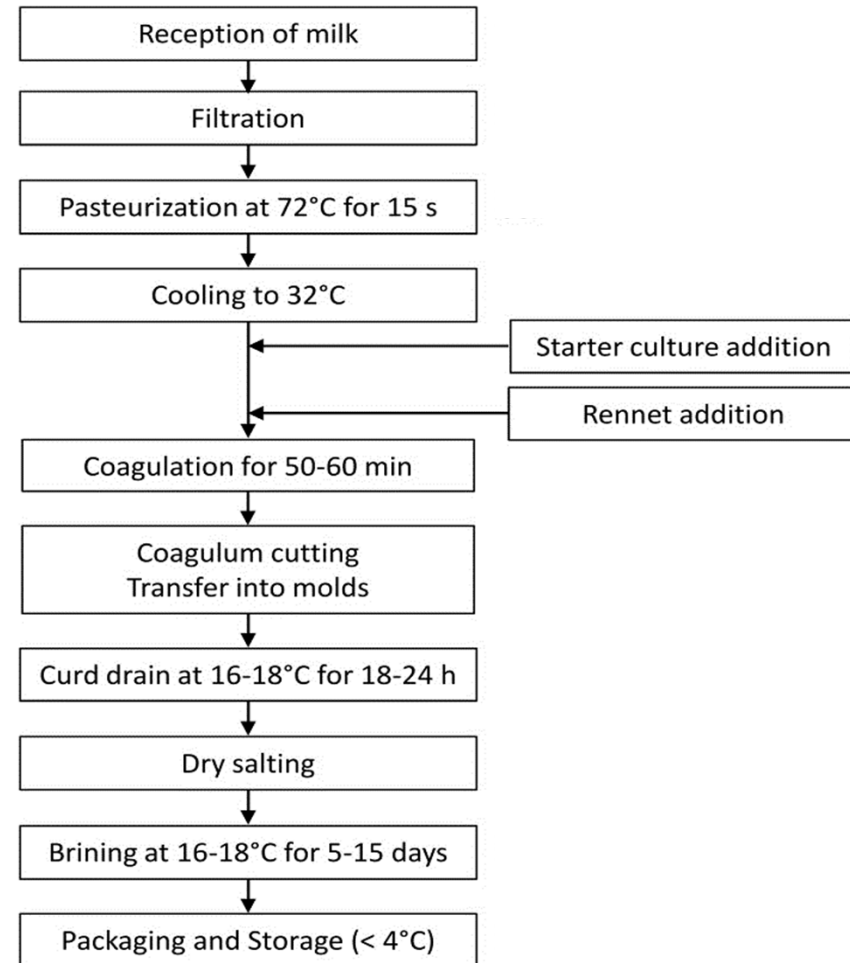
was zur Bildung einer Vielzahl von Aromastoffen führt.



Kluyveromyces lactis application



Kluyveromyces lactis application



Zusammenfassung

- “Kluy-lac” aus Milch und *Kluyveromyces lactis* ist: “A protein drinks a day”.
- Protein besteht aus Aminosäuren (kleine Eiweiß Teilchen), bekannt als „Bausteine des Lebens und Gesundheit“.
- „Kluy-lac“ Drink enthält bioaktive Peptide, Aminosäure und Metabolite mit antimikrobiologischen Eigenschaften (wie α -Glykopeptide, Zymocin, L(+)-Milchsäure und DL-racemische Milchsäure).
- Die verwendete Hefe in „Kluy-lac“ Drink hydrolisieren Laktose zu L(+) und DL(+) racemische Milchsäure, dank des Enzyms β -Galaktosidase, darum diese Drink ist Laktose-frei mit vielen positiven (inkl. antimikrobiellen) Wirkungen.
- Die Verstärkung des Immunsystems ist auf die spezifischen α -Glykoproteine zurückzuführen, die durch den Stoffwechsel der verwendeten Hefe in „Kluy-lac“ Drink entstehen.
- Ein weiterer wertvoller Wirkstoff in der „Kluy-lac Drink ist das α -Lactoalbumin. (α -LA ist eine wertvolle Quelle für essentielle Aminosäuren und stimuliert die Immunreaktion des Körpers und verbessert die Aufnahme bestimmter Mikronährstoffe.
- Die erfrischende Wirkung nach der Gärung ist in „Kluy-lac“ Drink auf das entstehende Kohlendioxid und Ethanol zurückzuführen.

Zusammenfassung

- **Therapeutische Verwendung von „Kluy-lac“ Drink werden vor allem durch seinen Gehalt an Lactoferrin, Immunglobulinen, Wachstumsfaktoren wie verzweigtkettigen Aminosäuren (d.h. Leucin, Isoleucin und Vanillin) und Mikronährstoffen (Kalium, Calcium, Eisen, Phosphat und B-Vitamine) bestimmt.**
- **Die verwendete „Kluy-lac“ Drink - Formel sorgt für eine Verbesserung der Gesundheit von Haut und Haaren dank der gebildeten Aminosäure und der Anwesenheit von B-Komplex-Vitaminen (besonders B1 und B6).**
- **„Kluy-lac“ kann sowohl als natürliches Lebensmittel oder als Nahrungsergänzungsmittel therapeutisch eingesetzt werden bei Patienten mit folgenden Problemen:**
 - **Chronische bakterielle, virale oder Pilzinfektionen**
 - **Schwächung oder Deregulierung des Immunsystems;**
 - **Beschwerden des Verdauungssystems (Durchfall, Verstopfung, Dyspepsie, Blähungen, usw.**
 - **Schwund der Muskelmasse oder Übergewicht der Fettmasse gegenüber der Muskelmasse**
 - **Störungen der Kalziumaufnahme, Kalziummangel**
 - **Osteopenie oder Osteoporose.**

Zum Wohl!

Probiotic Drinks
Kluy-lac
Lactose free

Cheers!





Nach Homogenization: 

