

Herstellung von löslichem murinem *Stem Cell Factor*
in *Escherichia coli*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Carola Bals
geboren am 11.01.1983 in Herten

2011

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: PD. Dr. Ursula Rinas
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 08. April 2011

Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen durchgeführt habe. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im Dezember 2010

Mein Dank gilt....

...Prof. Dr. Thomas Scheper-lieber Thomas, Dir als meinem Doktorvater vielen Dank, dass ich am TCI eine Promotionsstelle antreten durfte! Deine herzliche und aufgeschlossene Art machen diesen Arbeitskreis zu einem wirklichen tollen Arbeitsumfeld!

...PD Dr. Ursula Rinas-liebe Uschi, vielen Dank für die Übernahme des Korreferats sowie Deine gute Betreuung und die wertvollen Tipps für meine praktischen Arbeiten! „Was lange währt, wird endlich gut!“

...Dr. Dr. Axel Schambach-hab vielen Dank für die Bereitstellung des Plasmids und Deine Geduld bei meinen vielen Fragen!

...Dr. Johann Meyer-bei Dir bedanke ich mich für Deine Hilfe bei den Zellkultur-Versuchen! Es hat großen Spaß gemacht, in Euren Laboren arbeiten zu dürfen!

...Dr. Johanna Walter und Dr. Öznur Kökpinar-vielen, vielen Dank Euch beiden fürs Korrekturlesen! Johanna-danke für Deine genaue und kritische Korrektur und die Endnote-Hilfen! Öznur-danke Dir auch für die Layout-Tipps und die Hilfe bei den Formatierungen in Word!

...Dr. Michael Buring-lieber Mike, danke Dir für Deine Hilfe bei den Reaktor-Kultivierungen und den interessanten Diskussionen zum Stoffwechsel von *E. coli*!

...Dr. Ivo Havlik-Dir vielen Dank für die Hilfe bei meinen zahlreichen PC-Problemen!

...meinem Praktikanten Daniel Köhler und meinem Hiwi Sarah Kelber-Euch beiden vielen Dank für Eure Hilfe! Ihr wart immer konzentriert und engagiert bei der Sache und habt tolle Arbeit geleistet! Danke!

...Martina Weiss und Martin Pähler-auch an Euch danke für die Hilfe! Martina-ohne Deine Hilfe bei den Geräten hätte so manches nicht geklappt! Martin-auch ein Dank an Dich für die vielen kleinen Hilfen zwischendurch!

...dem gesamten Arbeitskreis-es war toll, mit Euch zu arbeiten, sich auszutauschen und Neues dazulernen! Ich habe mich immer sehr wohlgefühlt und eine Menge Spaß am TCI gehabt (auch außerhalb des Labors)!

...Dr. Nils Kaienburg-danke Dir für Deinen Beistand, Dein Verständnis, Deine aufmunternden Worte und Deine Unterstützung in jeglicher Hinsicht!

...meinen Eltern und insbesondere meiner lieben Mum, der ich diese Arbeit widmen möchte! Du warst mir während meiner gesamten universitären Ausbildung eine unsagbar große Stütze! Danke, dass Du immer für mich da bist!!!

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
KURZZUSAMMENFASSUNG.....	1
ABSTRACT	2
1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	3
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	5
2.1 <i>Stem Cell Factor</i>	5
2.1.1 SCF in der Hämatopoese.....	6
2.1.2 Isoformen von humanem SCF.....	7
2.1.3 Rezeptorbindung.....	10
2.1.4 Klinische Anwendungen von SCF.....	12
2.1.5 Vergleich von humanem und murinem SCF.....	13
2.1.6 Produktion von rekombinatem SCF.....	13
2.2 Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	14
2.2.1 <i>Inclusion Bodies</i>	15
2.2.2 Lösliche Proteine im Zytoplasma von <i>E. coli</i>	17
3 EXPERIMENTELLER TEIL.....	20
3.1 Konzeptvorstellung.....	20
3.2 Herstellung des Expressionssystems.....	22
3.2.1 Konstruktion des Expressionsvektors.....	22
3.2.2 Transformation von BL21(DE3).....	27
3.2.3 Fazit des Kapitels.....	30
3.3 Produktion von löslichem TRX-mSCF.....	31
3.3.1 Einfluss der Kultivierungsbedingungen	31
3.3.2 LB-Medium.....	33
3.3.3 TB-Medium.....	38
3.3.4 Definiertes Medium	38
3.3.5 Fazit des Kapitels.....	43
3.4 Aufreinigung von TRX-mSCF.....	44
3.4.1 <i>Screening</i> mit <i>Vivawell 8-Strips</i>	45
3.4.2 Durchführung der IMAC an der FPLC-Anlage	48
3.4.3 Degradation von TRX-mSCF.....	50
3.4.4 Fazit des Kapitels.....	54
3.5 Spaltung des Fusionsproteins.....	55
3.5.1 Verdau mit <i>AcTEV</i> TM -Protease	55

3.5.2	Fazit des Kapitels.....	58
3.6	Isolierung von mSCF.....	59
3.6.1	IMAC.....	59
3.6.2	Qualitative und quantitative Analyse.....	64
3.6.3	Fazit des Kapitels.....	65
3.7	Biologische Testung.....	66
3.7.1	M-07e-Zellen als Testsystem.....	66
3.7.2	Kurzzeit-Proliferations-Assay und EC ₅₀ -Bestimmung.....	67
3.7.3	Langzeit-Proliferations-Assay.....	70
3.7.4	Fazit des Kapitels.....	73
3.8	Upscaling auf den Bioreaktor.....	74
3.8.1	Reaktormessdaten.....	75
3.8.2	Produktbildung.....	78
3.8.3	Fazit des Kapitels.....	80
4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	82
5	ANHANG.....	87
5.1	Allgemeines.....	87
5.2	Herstellung des Expressionssystems.....	89
5.2.1	Herstellung des Vektors.....	89
5.2.2	Transformation.....	91
5.2.3	Anlegen von Gefrierkulturen.....	92
5.2.4	Überprüfung der Transformation.....	93
5.3	Kultivierungen im Schüttelkolben.....	95
5.4	Bestimmung der Biotrockenmasse.....	98
5.5	Zellaufschluss.....	98
5.6	SDS-PAGE.....	100
5.7	Bradford-Assay.....	102
5.8	Aufreinigung des Fusionsproteins mittels IMAC.....	103
5.8.1	Vivawell 8-Strips.....	103
5.8.2	Durchführung an der FPLC-Anlage.....	105
5.8.3	Waschfraktionen der FPLC-Aufreinigung.....	107
5.9	Western Blot.....	108
5.10	Protease-Inhibitoren.....	109
5.11	Verdau des Fusionsproteins.....	109
5.12	Densitometrie.....	110
5.13	IMAC-Aufreinigung zur Isolierung von mSCF.....	110
5.13.1	Dialyse.....	110
5.13.2	Durchführung der IMAC an der FPLC-Anlage.....	111
5.13.3	ELISA.....	112
5.13.4	Bestimmung des Endotoxingehalts.....	112

5.14	Biologische Testung von mSCF.....	113
5.14.1	Zellkultur.....	113
5.14.2	Kurzzeit-Proliferations-Assay	113
5.14.3	EC ₅₀ -Bestimmung	114
5.14.4	Langzeit-Proliferations-Assay	114
5.14.5	Morphologische Untersuchungen der M-07e-Zellen.....	115
5.15	Kultivierung im Bioreaktor	115
5.15.1	Kultivierungsbedingungen.....	115
5.15.2	HPLC-Analytik.....	116
5.15.3	Berechnung der Sauerstofftransferrate.....	117
5.16	Chemikalien/Reagenzien, Materialien, Geräte	118
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	121

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Modell der humanen SCF-Struktur (lösliche Isoform)	9
Abbildung 2.2	Schematische Darstellung des <i>c-Kit</i> Rezeptors.....	11
Abbildung 3.1	Schematischer Aufbau eines pET-Vektors.....	23
Abbildung 3.2	Vereinfachte Darstellung der Expressionsregion von pET-32b-trx-his-tev-mSCF mit den wichtigsten Elementen.....	25
Abbildung 3.3	Schematische Darstellung des Fusionsproteins TRX-mSCF mit einer berechneten Größe von 32 kDa.....	26
Abbildung 3.4	Analytischer Restriktionsverdau des Plasmids pET-32b-trx-his-tev-mSCF ..	28
Abbildung 3.5	Überprüfung der Transformation durch die Proteinsynthese	30
Abbildung 3.6	Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zellysats in LB-Medium bei 37 °C	33
Abbildung 3.7	Vergleich von totaler, löslicher und unlöslicher Fraktion eines typischen Zellysats.....	35
Abbildung 3.8	Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zellysats in LB-Medium bei 30 °C	37
Abbildung 3.9	Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zellysats in LB-Medium bei 23 °C	37
Abbildung 3.10	Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zellysats in definiertem Medium bei 37 °C	39
Abbildung 3.11	Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zellysats in definiertem Medium bei 30 °C	40
Abbildung 3.12	Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zellysats in definiertem Medium bei 23 °C	41
Abbildung 3.13	Wachstumskurven der induzierten Bakterienkulturen in definiertem Medium und LB-Medium bei 37 °C	43
Abbildung 3.14	Ergebnis der optimierten IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF im Analysenmaßstab.....	47
Abbildung 3.15	Chromatogramm der optimierten IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF im Labormaßstab.....	49
Abbildung 3.16	Ergebnis der optimierten IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF im Labormaßstab.....	50
Abbildung 3.17	Untersuchungen zur Identität des unerwarteten Proteins in den IMAC-Elutionsfraktionen	51
Abbildung 3.18	Zeitlicher Verlauf des TRX-mSCF-Abbaus in der löslichen Fraktion des Zellysats.....	52
Abbildung 3.19	Zeitlicher Verlauf der Fusionsproteinspaltung mit <i>AcTEV</i> TM -Protease bei 4 °C.	57

Abbildung 3.20	Chromatogramm der IMAC-Aufreinigung von mSCF mittels FPLC-Anlage.	60
Abbildung 3.21	Ergebnis der IMAC-Aufreinigung von mSCF mittels FPLC-Anlage.....	61
Abbildung 3.22	Schematische Darstellung der möglichen Spaltungen durch <i>AcTEV</i> TM - Protease.	62
Abbildung 3.23	Ergebnis des Kurzzeit-Proliferations-Assays zur biologischen Testung von mSCF und TRX-mSCF	68
Abbildung 3.24	EC ₅₀ -Bestimmung von mSCF und mSCF _{comm} im Rahmen einer Kurzzeit- Proliferation von M-07e-Zellen.....	69
Abbildung 3.25	Ergebnis des Langzeit-Proliferations-Assays zur biologischen Testung von mSCF.....	71
Abbildung 3.26	Zell-Morphologie der M-07e-Zellen nach der Langzeit-Proliferation.....	72
Abbildung 3.27	Reaktormessdaten der Kultivierung mit Induktion der rekombinanten Proteinproduktion (I).....	76
Abbildung 3.28	Reaktormessdaten der Kultivierung mit Induktion der rekombinanten Proteinproduktion (II).....	77
Abbildung 3.29	Reaktormessdaten der Kultivierung mit Induktion der rekombinanten Proteinproduktion (III)	78
Abbildung 3.30	Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zelllysats bei der Bioreaktorkultivierung.....	79
Abbildung 3.31	Vergleich der Wachstumskurven aus der Bioreaktorkultivierung mit und ohne Induktion.....	80
Abbildung 4.1	Übersicht der einzelnen Prozessschritte zur Herstellung von löslichem mSCF in <i>E. coli</i>	85
Abbildung 5.1	Plasmidkarte von pET-32b-trx-his-tev-mSCF	90
Abbildung 5.2	Waschfraktionen der optimierten IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF über eine Zn ²⁺ -funktionalisierte <i>Sartobind</i> TM MA IDA 75	107

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Übersicht einiger gebräuchlicher Löslichkeits- <i>Tags</i>	18
Tabelle 3.1	Vergleich der Kultivierungen in LB-Medium und in definiertem Medium bei 37 °C....	42
Tabelle 3.2	Übersicht der Ausbeute an mSCF in den verschiedenen Prozessschritten.....	64
Tabelle 3.3	Vergleich der Kultivierungen im Schüttelkolben und im Reaktor.	81
Tabelle 5.1	Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele.....	101
Tabelle 5.2	Übersicht der Puffer und Zentrifugationsbedingungen für <i>Vivawell 8-Strips</i>	104
Tabelle 5.3	Übersicht der Puffer und Volumina für die Durchführung an der FPLC.....	106
Tabelle 5.4	Übersicht der Puffer und Volumina für die Isolierung von mSCF an der FPLC.....	111

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Ala	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
AU	<i>Adsorption Units</i>
bp	<i>Base Pair</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
°C	Grad Celsius
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFC	<i>Colony-Forming Cell</i>
Cys	Cystein
d	<i>Day</i>
Da	Dalton
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPO	Erythropoetin
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
h	<i>Hour</i>
HCDC	<i>High Cell Density Culture</i>

HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IDA	<i>Iminodiacetic Acid</i>
IgG	Imunoglobulin G
IL	Interleukin
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
k	Kilo (10^3)
KL	<i>c-Kit Ligand</i>
LAL-Test	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test
L	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
Leu	Leucin
m	Milli (10^{-3})
M	Mega (10^6)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MBP	<i>Maltose-Binding Protein</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MGF	<i>Mast Cell Growth Factor</i>
min	Minute
mol	Mol ($6,023 \cdot 10^{23}$)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
OD	optische Dichte
omp	<i>Outer Membrane Protein</i>
ori	<i>Origin of Replication</i>
OTR	<i>Oxygen Transfer Rate</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PEG	Polyethylenglykol
pET	<i>Plasmid Expression by T7-RNA-Polymerase</i>

Phe	Phenylalanin
PPI	Peptidyl-Protyl- <i>cis-trans</i> -Isomerase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	<i>Revolutions per Minute</i>
s	Sekunde
S	Siemens
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SLF	<i>Steel Factor</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TPO	Thrombopoietin
TRX	Thioredoxin
TRX-mSCF	Fusionsprotein aus Thioredoxin und <i>Stem Cell Factor</i>
TSS	<i>Transformation and Storage Solution</i>
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	<i>Volume per Volume</i>
W	Watt
(w/v)	<i>Weight per Volume</i>

Kurzzusammenfassung

Proteine aus der Klasse der Zytokine erfüllen vielfältige essentielle Funktionen im Körper. Sie beeinflussen u.a. die Immunabwehr, die Wundheilung und die Hämatopoese (Blutbildung), sowie einige Abläufe in der fetalen Entwicklung. Anwendung finden Zytokine sowohl in der Therapie bestimmter Krankheiten als auch in vielen Bereichen der Forschung.

Durch seine Wirkung auf verschiedene Zellprozesse von hämatopoetischen Stammzellen und weiteren Vorläuferzellen gehört *Stem Cell Factor* zu den wichtigsten Zytokinen im Bereich der Blutbildung. Biotechnologisch wird *Stem Cell Factor* rekombinant vorrangig in *Escherichia coli* produziert, wobei bisher stets eine Renaturierung des Zytokins aus inaktiven Proteinaggregaten (*Inclusion Bodies*) erfolgen musste. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein Prozess etabliert, der die Herstellung von löslichem, murinem *Stem Cell Factor* in *Escherichia coli* unter Vermeidung von *Inclusion Bodies* ermöglicht. Kernpunkt dieses Ansatzes war die Synthese eines löslichen Fusionsproteins, wobei Thioredoxin erfolgreich als sogenannter Löslichkeits-Tag für das Zytokin eingesetzt wurde.

Im ersten Prozessschritt zur Herstellung von löslichem murinem *Stem Cell Factor* wurden die Kultivierungsbedingungen der rekombinanten Bakterien optimiert. Der Einfluss von Temperatur und Medium auf die Produktion des löslichen Fusionsproteins wurde dabei gezielt untersucht. Die Kultivierung konnte unter den für den Schüttelkolben optimierten Bedingungen erfolgreich auf einen 2 L-Bioreaktor übertragen werden.

Nach der Aufreinigung des His-getaggen Fusionsproteins mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie basierend auf Membranadsorber-Technik erfolgte die Spaltung des Proteins mit *Tobacco Etch Virus*-Protease. Der dadurch freigesetzte murine *Stem Cell Factor* konnte auch nach der Ablösung von Thioredoxin seine lösliche Form beibehalten. Die abschließende Isolierung des Zielproteins konnte durch eine weitere immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie und Membranadsorber-Technik erzielt werden. Unter Verwendung der megakaryozytischen Zelllinie M-07e wurde die biologische Aktivität des löslich in *Escherichia coli* hergestellten murinen *Stem Cell Factors* nachgewiesen.

Schlagnworte: *Stem Cell Factor*, Fusionsprotein, *Inclusion Bodies*, Thioredoxin

Abstract

Proteins belonging to the class of cytokines fulfill manifold essential functions throughout the body. They influence the immune defense, wound healing, hematopoiesis and some processes in fetal development. Cytokines are employed for the treatment of certain diseases as well as for many research purposes.

Because of its impact on several cell processes of hematopoietic stem cells and other progenitor cells, stem cell factor accounts for one of the most important hematopoietic cytokines. In the field of biotechnology, production of stem cell factor is generally performed using recombinant *Escherichia coli*. Thereby, the current strategy is based exclusively on the renaturation of inactive protein aggregates known as inclusion bodies.

Within this thesis, for the very first time, a process enabling the production of soluble murine stem cell factor in *Escherichia coli* in avoidance of inclusion bodies was established. The key issue of this approach involved the formation of a soluble fusion protein, whereby thioredoxin was successfully applied as solubility tag for the target cytokine.

As an initial step in the production process of soluble murine stem cell factor, the cultivation conditions of the recombinant bacteria were optimized. The influence of temperature and culture medium on the formation of soluble fusion protein was investigated. Applying the optimized conditions developed for the shake flask, the cultivation was successfully adapted to a 2 L-bioreactor.

After purification of the His-tagged fusion protein via immobilized metal ion affinity chromatography based on membrane adsorber technology, the fusion protein was subsequently cleaved with *Tobacco Etch Virus* protease. This cleavage thereby released the murine stem cell factor, which maintained its solubility even in the absence of thioredoxin. The final polishing of the target protein was achieved by another immobilized metal ion affinity chromatography using membrane adsorber technology. Utilizing the megakaryocytic cell line M-07e, the bioactivity of soluble murine stem cell factor produced in *Escherichia coli* was proven.

Key words: stem cell factor, fusion protein, inclusion bodies, thioredoxin

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Die Proteine aus der Superfamilie der Zytokine wirken sich regulatorisch auf das Wachstum und die Differenzierung verschiedenster Zellen aus. Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr, in der Hämatopoese (Blutbildung), bei der Wundheilung, sowie bei der Regulation der spezifischen Zelldifferenzierung während der fetalen Entwicklung. Auf Basis von strukturellen Eigenschaften, gemeinsamen Rezeptor-Typen oder ähnlichen Wirkungsbereichen werden Zytokine in mehrere Proteinklassen wie Interferone, Interleukine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren eingeteilt.

Zytokine werden sowohl direkt für therapeutische Zwecke verwendet als auch in verschiedenen Forschungsbereichen eingesetzt. Erfolgreiche Anwendung finden Zytokine bereits in der Therapie von Krebstumoren, bei der Behandlung verschiedener Anämien und Darmerkrankungen, in der Stammzelltransplantation, sowie bei der Regeneration von Blutstammzellen nach einer Chemotherapie. Im Bereich der Forschung werden Zytokine zur *in vitro*-Expansion verschiedener Zelltypen benötigt. Beispielsweise ermöglichen Zytokine im *Tissue Engineering* die Besiedelung einer dreidimensionalen Matrix mit Zellen, die im Anschluss als Knochenersatzmaterial zum Einsatz kommt.

Auf Grund ihrer vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten besteht ein großer Bedarf an Zytokinen. Dieser kann nur durch die Produktion rekombinanter Proteine gedeckt werden, was die Entwicklung geeigneter biotechnologischer Prozesse für die Herstellung der einzelnen Zytokine erforderlich macht.

Eines der wichtigsten Zytokine im Bereich der Hämatopoese stellt der zu den Wachstumsfaktoren zählende *Stem Cell Factor* (SCF) dar. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle in der Blutbildung, da es das Überleben, die Proliferation, die Mobilisation und die Adhäsion von hämatopoetischen Stammzellen und weiteren Vorläuferzellen fördert. Darüber hinaus beeinflusst SCF die Funktion und Entwicklung weiterer Zelltypen wie Melanozyten und Keimzellen. Auf Grund dieser biologischen Funktionen wird SCF daher sowohl in klinischen Bereichen wie z.B. in der Behandlung spezieller Anämien als auch in der hämatopoetischen Stammzellforschung eingesetzt.

Für die biotechnologische Herstellung von SCF bietet sich das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) als Wirtssystem an. Obwohl SCF in seiner nativen Form stark glykosyliert vorliegt, ist diese posttranslationale Modifikation für die biologische Aktivität des Zytokins nicht essentiell.

Die Produktion von rekombinantem SCF in *E. coli* wurde in der Literatur bereits beschrieben. Die Herstellung des Zytokins erfolgt dabei ausschließlich über die Renaturierung unlöslicher, inaktiver *Inclusion Bodies*. Die Bildung dieser Proteinaggregate stellt ein häufiges Problem bei der Expression bakterienfremder Gene in *E. coli* dar.

Die Aufgabenstellung im Rahmen dieser Dissertation war die Herstellung von murinem, löslichem SCF (mSCF) in *E. coli*, wobei die Bildung von *Inclusion Bodies* vermieden werden sollte. Da murines SCF eine kreuzspezifische Aktivität auf humane Zellen besitzt, ist es in einem potentiell breiteren Feld von Anwendungen einsetzbar als humanes SCF, welches nicht kreuzspezifisch aktiv ist.

Ein Ansatz zur Produktion löslicher Proteine in *E. coli* nutzt sogenannte Löslichkeits-*Tags*, um das Target zunächst als Fusionsprotein herzustellen. Nach der Abtrennung des Fusionspartners kann schließlich das lösliche Zielprotein erhalten werden. Um diesen Ansatz auf die Herstellung von mSCF zu übertragen, sollte das Zytokin als lösliches Protein in Fusion mit Thioredoxin produziert werden. Zu diesem Zweck war die Konstruktion eines geeigneten Plasmidvektors mit den erforderlichen genetischen Informationen notwendig. Die gesamten Prozessbedingungen zur Produktion von löslichem mSCF (Kultivierung der Bakterien, Spaltung des Fusionsproteins, verschiedene Aufreinigungsschritte) sollten erarbeitet und optimiert werden. Abschließend sollte die Testung der biologischen Aktivität des Zytokins erfolgen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 *Stem Cell Factor*

Zytokine sind hormonähnliche, regulatorische Proteine, die meist eine Größe von 5-100 kDa aufweisen. Die hochaktiven Polypeptide (biologisch wirksam in Konzentrationen von pg/mL bis ng/mL) werden von zahlreichen Zelltypen produziert und besitzen vielfältige Funktionen. Diese schließen die Koordination von Immunreaktionen, die Regulation der Hämatopoese (Blutbildung), die Förderung der Wundheilung sowie die Regulation der spezifischen Zelldifferenzierung während der fetalen Entwicklung ein. Ihre biologische Wirksamkeit entfalten Zytokine durch die hochaffine Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren und die dadurch eingeleiteten Signalkaskaden [1, 2].

Die Superfamilie der Zytokine wird in mehrere Proteinklassen wie Interferone, Interleukine oder Wachstumsfaktoren eingeteilt [1]. Letztere spielen besonders im Bereich der Hämatopoese eine entscheidende Rolle. Die Blutbildung ist ein lebenslanger Prozess, der die Bereitstellung von hämatopoetischen Vorläuferzellen und voll entwickelten Blutzellen aus einem Pool von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen umfasst. Die Steuerung der Abläufe erfolgt mit Hilfe einer Reihe von stimulierenden oder inhibierenden Wachstumsfaktoren, die das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen fördern [3-5]. Zu diesen Wachstumsfaktoren zählt auch *Stem Cell Factor* (SCF).

Die Entdeckung und Charakterisierung von SCF erfolgte 1990 parallel durch mehrere Forschungsgruppen [6-13]. Experimente mit Mäusen, die ähnliche Phänotypen und Defekte in der Hämatopoese, der Gametogenese und der Melanogenese aufwiesen, zeigten übereinstimmend Genmutationen auf dem *Sl*- und dem *W*-Locus. Die dort codierten Proteine wurden als SCF und dessen Rezeptor *c-Kit* identifiziert. Die Erforschung des neuen Zytokins SCF, auch *c-Kit-Ligand* (KL), *Mast Cell Growth Factor* (MGF) oder *Steel Factor* (SLF) genannt, führte zum allgemein vertieften Verständnis der Mechanismen der Hämatopoese [14]. Die verschiedenen Namen des Wachstumsfaktors werden nebeneinander verwendet und reflektieren dessen vielfältige Funktionen [15].

2.1.1 SCF in der Hämatopoese

Der hämatopoetische Wachstumsfaktor SCF beeinflusst eine fast unüberschaubare Fülle von essentiellen Funktionen in der Embryonalentwicklung und im adulten Organismus [5, 16]. So werden das Überleben [17, 18], die Proliferation [19, 20], die Aktivierung [21], die Mobilisierung [22], die Migration [23] und die Adhäsion [24, 25] von hämatopoetischen Stammzellen und weiterer Vorläuferzellen sowie zusätzlicher Zelltypen gesteuert.

Zellen der lymphatischen Linie wie Erythrozyten, Megakaryozyten, Granulozyten und insbesondere Mastzellen [26, 27], sowie auch Gameten und Melanozyten unterliegen dem Einfluss des *Stem Cell Factors* [8, 28]. Dabei wirkt dieser meist in Synergien mit anderen Zytokinen zusammen. Beispiele hierfür sind Interleukin 1, 3 oder 6 (IL-1, IL-3, IL-6) [29, 30], Interleukin 7 (IL-7) [9] und Interleukin 9 (IL-9) [31], sowie *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (G-CSF) [32], *Granulozyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) [9, 32], *Erythropoietin* (EPO) [29], *Thrombopoietin* (TPO) [33, 34] und *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) [35]. Eine optimale Mastzell-Proliferation und -Differenzierung kann beispielsweise nur durch eine Kombination von SCF mit IL-3, IL-4 oder IL-10 erfolgen [30]. Mastzellen spielen eine Rolle bei der Immunabwehr, bei der Angiogenese und in Zellreparaturmechanismen [26, 36].

SCF wirkt sich mit EPO synergetisch auf die Bildung von Erythroid-Kolonien aus und nimmt damit in sehr frühen Phasen der Hämatopoese entscheidenden Einfluss [37]. SCF allein wirkt oft nur als Faktor zum Überleben von hämatopoetischen Stammzellen, indem es die Apoptose unterdrückt [17]. Die Proliferation der Zellen wird jedoch nur schwach unterstützt [38-40].

Aufgrund der physiologischen Rolle von SCF und seinem Rezeptor *c-Kit* sind Mutationen der entsprechend codierenden Gene Ursache für die Entstehung diverser Krankheiten und Fehlfunktionen. Neben verschiedenen Anämieformen [8] wie Leukämien [41] und Mastozytose [41, 42] wurden Asthma [43], Hyperpigmentation [44], verringerte Fruchtbarkeit [14], sowie pathogene Tumore beobachtet [42]. Je nach Grad der Ausprägung der genetischen Veränderungen sterben die Embryonen bereits im Uterus oder überleben mit schweren Anämien oder anderen Defiziten [8].

Stem Cell Factor wird in vielen Bereichen des Körpers im Wesentlichen durch Fibroblasten und Endothelzellen gebildet [45, 46]. Der Wachstumsfaktor konnte z.B. in der Haut [47], im Darm [48], in den Atemwegen [49], im Thymus [50] und in den Blutgefäßen [23, 51] nachgewiesen werden. Die durchschnittliche Konzentration von SCF im Blutkreislauf ist eher gering (3,3 ng/mL im Humanserum) [52].

2.1.2 Isoformen von humanem SCF

Die genetische Codierung von humanem SCF befindet sich auf Chromosom 12q22-12q24 [53]. Die strukturelle Organisation des SCF-Gens und die Primärstruktur des Proteins wurden eingehend beschrieben [6, 7, 11, 54]. Das Gen umfasst eine Länge von über 50 kb, die in 8 Exons eingeteilt sind [55]. Alternatives Spleißen der mRNA führt zu zwei verschiedenen mRNA-Formen, die jeweils für ein Protein mit 248 (SCF²⁴⁸) bzw. 220 Aminosäuren (SCF²²⁰) codieren. Nach proteolytischer Spaltung des Proteins aus SCF²⁴⁸ an Exon 6 (nach Ala¹⁶⁵) wird die lösliche Isoform des Wachstumsfaktors mit einer Länge von 165 Aminosäuren freigesetzt [56]. Bedingt durch den Spleißvorgang an der mRNA fehlt Exon 6 bei SCF²²⁰, sodass hier folglich keine Proteolyse wie bei SCF²⁴⁸ erfolgen kann. Das Protein aus SCF²²⁰ wird als transmembrane Isoform von SCF bezeichnet und gliedert sich in eine 157 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne, eine 27 Aminosäuren lange transmembrane und eine 36 Aminosäuren umfassende zytoplasmatische Region [11, 25, 53, 55].

Das mRNA-Verhältnis von SCF²⁴⁸ zu SCF²²⁰ im adulten Organismus variiert stark zwischen 10:1 im Gehirn, 4:1 im Knochenmark und 0,4:1 im Hoden [16, 57] und lässt somit auf eine gewebespezifische Steuerung des alternativen Spleißvorgangs schließen [57]. Zudem sind die vorliegenden SCF-Konzentrationen von der jeweiligen Entwicklungsphase (embryonal oder adult) abhängig [15].

Sowohl die lösliche als auch die transmembrane Form von SCF besitzen biologische Relevanz und sind für die uneingeschränkte Erfüllung aller Funktionen essentiell [16, 54, 58]. In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass die transmembrane Form (SCF²²⁰) die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen effektiver und über einen längeren Zeitraum unterstützt als die lösliche Form von SCF [15, 57, 59, 60]. Desweiteren ist SCF²²⁰ in der Lage, die Zell-Zell-Adhäsion in bestimmten Fällen zu

steuern [57, 61]. Die lösliche Form von SCF hingegen unterstützt Zell-Migrationen [60] und induziert im Vergleich zum membrangebundenen SCF²²⁰ eine schnellere Herabregulierung der Aktivität des SCF-Rezeptors [62].

Struktur des löslichen SCF

Natives, lösliches SCF ist ein stark glykosyliertes Protein mit bis zu 30 Gewichtsprozent Zuckeranteil [63]. Das Molekulargewicht liegt, abhängig von der inhomogenen Ausprägung der möglichen O- und N-Glykosylierung, zwischen 28-40 kDa [64, 65]. Experimente mit rekombinantem SCF aus *E. coli* haben gezeigt, dass die Glykosylierung für die vollständige biologische Aktivität nicht erforderlich ist [6, 66].

Die ersten 141 der insgesamt 165 Aminosäuren umfassenden Sequenz des Wachstumsfaktors konnten als funktioneller Kern der Primärstruktur festgelegt werden. Dieser Abschnitt ist von entscheidender Bedeutung für die Bindungsfähigkeit von SCF an seinen Rezeptor *c-Kit* und damit für die Erfüllung der biologischen Funktionen des Zytokins [67, 68].

Als strukturelle Einheiten in der Sekundärstruktur konnten vier α -Helices (paarweise antiparallel ausgerichtet) und zwei β -Faltblätter gefunden werden [65, 68]. Zwischen Cys-4 und Cys-89 sowie Cys-43 und Cys-138 befinden sich zwei intramolekulare Disulfidbrücken [68], die essentiell für die bioaktive Konformation von SCF sind [69] (Abbildung 2.1).

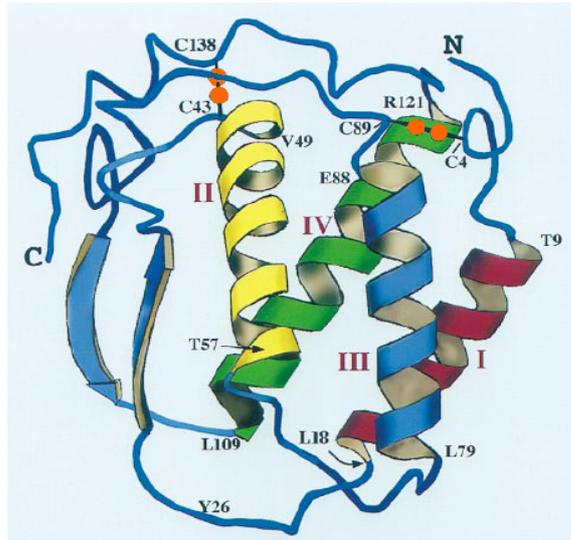


Abbildung 2.1 Modell der humanen SCF-Struktur (lösliche Isoform). Die Positionen der intramolekularen Disulfidbrücken sind in orange hervorgehoben. Die Helixgrenzen sind durch die jeweiligen Aminosäuren, abgekürzt im Einbuchstabencode, gekennzeichnet [70].

In physiologischer Umgebung existiert die lösliche Form von SCF als Homo-Dimer [65]. Die Verbrückung ist nicht kovalent, sodass es in Lösung zu spontaner Dissoziation und Reassoziierung kommt. Die große Kontaktfläche [59] zwischen den beiden SCF-Monomeren begründet sich auf elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen. Die Glykosylierung des Proteins hat keinen Einfluss auf die Dimerisierung [68, 71]. Obwohl sich durch Versuche zur Faltung und Oxidation von löslichem SCF *in vitro* disulfidverbrückte, also kovalent gebundene Dimere isolieren ließen, gibt es bisher keine Erkenntnisse, dass diese auch *in vivo* eine Rolle spielen [72].

SCF teilt trotz starker Abweichungen in den Primärstrukturen eine Reihe von Eigenschaften mit anderen Zytokinen. Ähnlichkeiten oder auch Übereinstimmungen im Bereich der Exonstrukturen, der Isoformen, der Sekundär- und Tertiärstrukturen (Dimerisierung, Lage der intramolekularen Disulfidbrücken) und der biologischen Funktionen finden sich vorrangig mit *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) [68, 73-76] und *Flt-3 Ligand* [75, 77, 78]. Besonders auffallend ist die Übereinstimmung des Rezeptor-Typs (siehe Abschnitt 2.1.3) für SCF, M-CSF und *Flt-3 Ligand*, sowie auch für *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) [60, 65], was auf eine gemeinsame evolutionäre Vergangenheit hindeutet [74, 75, 79].

2.1.3 Rezeptorbindung

Bereits vor der Entdeckung von SCF und seinem Rezeptor *c-Kit* wurde 1979 auf Grund von Untersuchungen an Mäusen postuliert, dass es sich bei den beiden Proteinen um ein Rezeptor-Ligand-Paar handeln könnte [80]. Der *c-Kit*-Rezeptor, auch als CD117 bezeichnet, gehört zur Familie der Tyrosin-Kinase Typ III-Rezeptoren [79, 81, 82].

Humaner *c-Kit*, der durch alternatives RNA-Spleißen in mehreren Isoformen existiert, ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 145-150 kDa [43]. Der Rezeptor wird auf Chromosom 4 in der Region 4q11-34 codiert und umfasst eine Länge von 976 Aminosäuren [79, 81, 83-85]. Die Expression des Rezeptors erfolgt insbesondere durch hämatopoetische Zelltypen wie Mastzellen, Megakaryozyten und Erythrozyten [5, 26]. Auch nicht hämatopoetische Zellen wie Melanozyten oder vaskuläre Endothelzellen produzieren *c-Kit* [86, 87].

Die Struktur der Tyrosin-Kinase Typ III-Rezeptoren umfasst eine extrazelluläre, eine transmembrane und eine zytoplasmatische Region (Abbildung 2.2). Bestehend aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen übernimmt die extrazelluläre Region die Funktion der Erkennung und Bindung des spezifischen Liganden. Die Zellmembran durchspannende Region, ein kurzer hydrophober Bereich aus fünf Aminosäuren, verankert den Rezeptor in der Plasmamembran. In der zytoplasmatischen Region liegt die für die Signaltransduktion wichtige Tyrosin Kinase-Aktivität begründet. Ein Kinase-Insert trennt den Bereich in eine ATP-bindende und eine Phosphotransferase-Domäne auf [55, 81, 88].

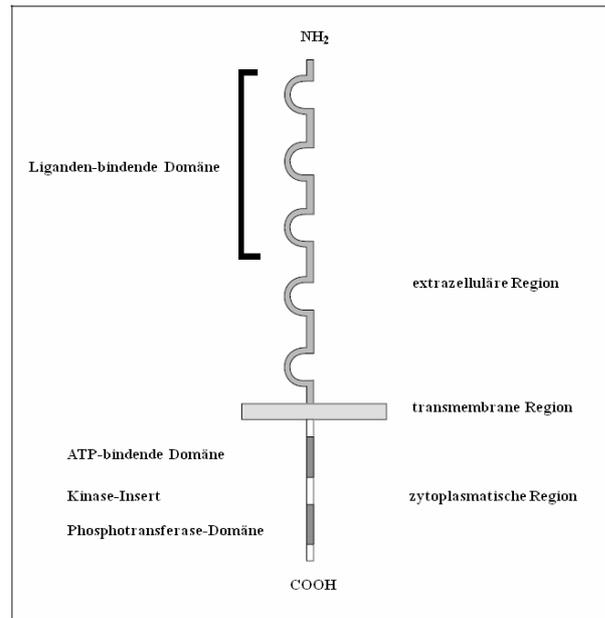


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung des *c-Kit* Rezeptors [25].

Die spezifische Bindung von SCF erfolgt an den ersten drei N-terminalen Domänen der extrazellulären Region von *c-Kit* [55, 89], wobei an dieser Komplexbildung zwei Moleküle des Rezeptors beteiligt sind [90, 91]. Diese Ligandenbindung initiiert eine Homodimerisierung des Rezeptors. Die Annahme, dass die vierte Domäne der extrazellulären Region von *c-Kit* ebenfalls für die Homodimerisierung essentiell sei [89, 92], wurde widerlegt [91]. Die funktionelle Bedeutsamkeit der fünften Domäne konnte bisher noch nicht geklärt werden [55].

Die Homodimerisierung des SCF-Rezeptors bewirkt die Aktivierung der intrinsischen Tyrosin Kinase-Aktivität in der zytoplasmatischen Region von *c-Kit*. Unter ATP-Verbrauch erfolgt die intermolekulare Autophosphorylierung mehrerer Tyrosinreste, sodass an diese Reste Proteine mit SH2-Domänen binden können. Diese Bindung führt ihrerseits zu einer Weiterleitungskaskade und zu einer Verstärkung des Signals [15, 41, 93].

Sowohl die transmembrane als auch die lösliche Form von SCF binden als Dimer an *c-Kit*, wobei die jeweilige Geschwindigkeit der nachfolgenden Abläufe durch die beiden Isoformen des Wachstumsfaktors variiert [62].

2.1.4 Klinische Anwendungen von SCF

Die Mehrzahl der potentiellen klinischen Anwendungen für SCF basiert auf dessen Wirkung auf primitive hämatopoetische Zellen. Der Wachstumsfaktor wird daher in drei großen klinischen Bereichen eingesetzt: *in vivo*- und *ex vivo*- Expansion von hämatopoetischen Stammzellen, Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen und in der Behandlung von aplastischer Anämie [55].

Durch kontinuierliche Gaben von SCF (zusätzlich zu anderen Zytokinen) konnte *in vivo* z.B. die dosisabhängige Vermehrung von verschiedenen Typen der koloniebildenden Zellen (*Colony-Forming Cells*, CFC) im Blut und im Knochenmark erreicht werden [94, 95]. *Ex vivo* expandierte hämatopoetische Stammzellen und weitere Vorläuferzellen konnten durch eine Transplantation Krebspatienten nach einer Chemotherapie effizient bei der vorläufigen Ausheilung ihrer Krankheit helfen [5, 96, 97]. Desweiteren ist SCF in der Lage, Stammzellen *in vivo* zu mobilisieren und sie damit für die Gentherapie zugänglich zu machen [98-100]. Die für den Gentransfer eingesetzten Retroviren transfizieren nur mobile Zellen und benötigen damit geeignete Zytokine zur Stimulation unbeweglicher Zellen [101].

Im Bereich der Behandlung von aplastischer Anämie liegt eine weitere klinische Anwendung von SCF. Das Zytokin ist in der Lage, die durch die Krankheit verminderte Bildung von hämatopoetischen Stammzell-Kolonien vermehrt anzuregen. Eine völlige Heilung der aplastischen Anämie ist derzeit nur durch ein Spendertransplantat möglich [102, 103].

Im Verlauf der ersten klinischen Studien (Phasen I und II) traten bei etwa 10-20 % der Patienten unter Behandlung mit SCF starke Probleme mit Anaphylaxie auf. Diese akute pathologische Reaktion des Immunsystems betrifft den gesamten Organismus und reicht von leichten Hautreaktionen über Störungen von Organfunktionen bis zum tödlichen Kreislaufversagen, dem anaphylaktischen Schock [101, 104, 105]. Diese Nebenwirkungen von SCF konnten jedoch durch eine entsprechende Dosierung des Wachstumsfaktors auf 20 µg/kg/Tag und eine Antihistamin-Prophylaxe kontrolliert werden [55, 95, 106].

Resultierend daraus, dass SCF *in vivo* meist in Synergie mit einer Fülle weiterer Zytokine seine biologischen Aufgaben erfüllt, kommt es auch in therapeutischen Anwendungen zumeist in Kombination (z.B. mit EPO, IL-3, GM-CSF) [60, 107, 108] zum Einsatz [5, 109].

2.1.5 Vergleich von humanem und murinem SCF

Das Gen für murines SCF (auf dem *Sl*-Locus des Chromosoms 10 der Maus codiert [12, 13]) zeigt 83 % Homologie zu humanem SCF [110]. Verschiedene Merkmale wie z.B. die Existenz mehrerer Isoformen, bedingt durch alternatives RNA-Spleißen [111], oder Proteinstrukturen wie die intramolekularen Disulfidbrücken [63] sind bei murinem und humanem SCF ähnlich oder sogar identisch.

Es konnte gezeigt werden, dass murines und humanes SCF gegenüber humanen Zellen eine vergleichbare Aktivität besitzen. Im umgekehrten Fall hingegen verfügt murines SCF über eine 800-fach stärkere Wirkung auf murine Zellen als das artfremde humane SCF [11]. Hinsichtlich der Anwendungsbreite macht diese kreuzspezifische Aktivität von murinem SCF die Produktion von rekombinantem murinen SCF (neben humanen SCF) für Forschungszwecke besonders interessant.

2.1.6 Produktion von rekombinantem SCF

Erste Klonierungen der cDNA von murinem und humanem SCF, gefolgt von der Produktion des rekombinanten Wachstumsfaktors in *Escherichia coli* (*E. coli*), in CHO- und COS-7-Zellen, gelangen bereits in den frühen 1990ern. Nach der Isolierung von nativem SCF aus entsprechend produzierenden Zelllinien wie Fibroblasten oder Stromazellen wurde die RNA von SCF extrahiert, in die entsprechende cDNA überführt und über die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) vervielfältigt [11, 63, 65, 66].

Sowohl das im eukaryontischen als auch im prokaryontischen System produzierte lösliche SCF wies unabhängig von der Glykosylierung die Konformation und Struktur des nativen Zytokins auf [63, 65]. Entsprechende Untersuchungen zur Stimulierung der Proliferation von humanen Megakaryozyten bestätigten die vollständige biologische Wirksamkeit der rekombinanten Proteine [63, 64].

Ein großes Problem bei der Produktion von SCF in *E. coli* stellt die Bildung sogenannter *Inclusion Bodies*, unlöslicher Proteinaggregate mit stark verminderter oder fehlender biologischer Aktivität dar [112]. Zur Gewinnung des löslichen, aktiven Proteins werden die *Inclusion Bodies* zunächst mittels harnstoffhaltigen

Puffern in Lösung gebracht, um anschließend neu gefaltet und oxidiert zu werden [11, 56, 63, 72]. Bis heute wurde die Herstellung von löslichem SCF ausschließlich über diesen Prozess beschrieben.

Diverse Forschungsgruppen haben sich bereits mit unterschiedlichen bzw. weiterführenden Fragestellungen im Bereich der Produktion von SCF in *E. coli* beschäftigt. So wurde von einer Renaturierung mit simultaner Aufreinigung von zuvor gelösten *Inclusion Bodies* berichtet [113]. Der Einfluss des pH-Wertes und der Harnstoffkonzentration auf die Solubilisierung von *Inclusion Bodies* wurde untersucht [112]. Desweiteren wurden Fusionsproteine mit humanem SCF, die ebenfalls in Form von *Inclusion Bodies* gebildet wurden, produziert (Diphtheria Toxin-SCF [114], TPO-SCF [115], TPO-SCF-Thioredoxin [116]). Die Produktion eines löslichen Fusionsproteins gelang bisher nur für die Kombination aus murinem SCF mit Thioredoxin. Die Spaltung des Fusionsproteins wurde in diesem Ansatz jedoch nicht beschrieben [117].

2.2 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Auf Grund einer Vielzahl von Vorteilen eignet sich das Bakterium *E. coli* in besonderem Maße für die Herstellung rekombinanter Proteine. Die Kultivierung von *E. coli* ist einfach, schnell, kostengünstig und ermöglicht hohe Zelldichten (*High Cell Density Culture*, HCDC) und damit hohe Ausbeuten [118, 119]. Die molekulare Genetik und Physiologie des Gram-negativen Bakteriums wurden umfassend erforscht und ermöglichen damit die Entwicklung wertvoller biotechnologischer Werkzeuge wie verschiedene Expressionssysteme und Bakterienstämme [119-122]. Die Nachteile von *E. coli* hingegen liegen in der Limitierung der Synthese von großen und komplexen Proteinen mit Disulfidbrücken oder Proteinen, die posttranslationale Modifizierungen erfordern. Bakterielle Proteasen können zudem die Stabilität von rekombinanten Proteinen durch Degradation stark herabsetzen [119]. Eines der größten technischen Probleme stellt die Bildung von unlöslichen Proteinaggregaten (*Inclusion Bodies*) dar [123, 124].

2.2.1 *Inclusion Bodies*

Bildung

Aggregate von falsch gefalteten und daher biologisch inaktiven Proteinen im Zytoplasma oder Periplasma von *E. coli* werden als *Inclusion Bodies* bezeichnet. Die Bildung dieser unlöslichen Einschlusskörper erfolgt als Konsequenz der Produktion von rekombinanten Proteinen, die ihre native Konformation nicht einnehmen können [125]. Durch den ausgeprägten metabolischen Stress, den die Überexpression fremder Gene für den bakteriellen Wirt bedeutet, wird das natürliche Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese, Proteinfaltung und Aggregationsreaktionen in *E. coli* gestört [122, 126]. Das Bakterium reagiert auf diese Situation mit einer zellulären Stressantwort und produziert vermehrt Hitzeschock-Proteine wie DnaK und DnaJ, sowie GroEL und GroES [123]. Diese zu den Chaperonen gehörenden Proteine verhindern im Wildtyp von *E. coli* die Aggregation von Proteinen oder begünstigen die Renaturierung von bereits gebildeten Aggregaten [127, 128]. Da jedoch die Verfügbarkeit dieser molekularen Chaperone begrenzt ist, kommt es besonders bei hohen Syntheseraten rekombinanter Proteine zur vermehrten Bildung von *Inclusion Bodies* [123].

Auf Grund von kinetischen Barrieren verläuft die Faltung von Proteinen über mehrere Zwischenstufen. Bei diesen Faltungsintermediaten können die bei nativen Proteinen meist im Inneren verborgenen hydrophoben Bereiche stark exponiert sein. Kommt es zu Wechselwirkungen dieser hydrophoben Regionen, akkumulieren die teilgefalteten Proteine zu *Inclusion Bodies* [126, 128, 129]. Der Beitrag ionischer Interaktionen zur Bildung der Proteinaggregate wurde ebenfalls diskutiert [130]. Anhand von Proteineigenschaften wie Größe, Struktur der Untereinheiten oder relative Hydrophobizität sind keine generellen Vorhersagen über die Ausbildung von *Inclusion Bodies* möglich, da die jeweiligen Faltungsabläufe proteinspezifisch sind. Jedoch zeigen besonders Proteine, deren Struktur Disulfidbrücken beinhaltet, die Neigung im Zytoplasma von *E. coli* zu aggregieren [119, 126]. Diese Beobachtung lässt sich durch die in diesem Zellkompartiment des Bakteriums herrschenden, stark reduzierenden Bedingungen verstehen [131, 132].

***Inclusion Bodies* in der Biotechnologie**

Wird ein Zielprotein in *E. coli* biologisch inaktiv in Form von *Inclusion Bodies* gebildet, so ergeben sich für die biotechnologische Herstellung des nativen Zielproteins zwei mögliche Herangehensweisen. Entweder werden die unlöslichen Proteinaggregate aufwändig renaturiert oder es wird versucht, das native Protein direkt in löslicher Form in *E. coli* zu produzieren, d.h. die Bildung von *Inclusion Bodies* zu vermeiden.

Der Großteil der industriell in *E. coli* hergestellten rekombinanten Proteine wird über die Aufarbeitung von *Inclusion Bodies* durchgeführt. Nur etwa 13-23 % aller heterologen Proteine werden direkt in löslicher Form produziert [118]. Zur Renaturierung von *Inclusion Bodies* werden diese zunächst in Lösung gebracht und oxidiert. Unter geeigneten Bedingungen erfolgt anschließend die neue Faltung der Proteine gemäß ihrer nativen Konformation [130]. Da die vielen Prozessschritte zur Aufarbeitung von *Inclusion Bodies* zeitintensiv sind und oft nur in geringen Ausbeuten resultieren, ist das *Downstreaming* maßgebend für die hohen Gesamtkosten der Proteinherstellung [130]. Zudem besteht die Gefahr, dass die aus *Inclusion Bodies* isolierten Proteine nicht erfolgreich in ihre native Struktur überführt oder durch die Rückfaltung beschädigt werden können [122, 130].

Die Vorteile von *Inclusion Bodies* hingegen sind die hohe Konzentration des Produkts in den Aggregaten und die einfache Isolierung der *Inclusion Bodies* über Zentrifugation. Desweiteren sind *Inclusion Bodies* sehr stabil, auch gegenüber Proteasen *in vivo*, und durch ihre biologische Inaktivität nicht toxisch für den bakteriellen Wirt [119, 126].

Zur Gewinnung löslicher Proteine in *E. coli* und damit zur Vermeidung von *Inclusion Bodies* haben sich verschiedene Methoden, die im folgenden Abschnitt näher erläutert wurden, bewährt. Alle Bedingungen, die die korrekte Faltung der rekombinanten Proteine begünstigen, wirken dabei direkt der Bildung von inaktiven Proteinaggregaten entgegen. Da es keine allgemein anwendbare Methode zur Synthese löslicher Proteine im Zytoplasma von *E. coli* gibt, muss die Herangehensweise für ein jeweiliges Zielprotein individuell ermittelt werden [122].

2.2.2 Lösliche Proteine im Zytoplasma von *E. coli*

Die korrekte Faltung eines Proteins ist essentiell für dessen uneingeschränkte biologische Aktivität, wobei die gesamte die Konformation bestimmende und die Faltung lenkende Information bereits durch die Aminosäuresequenz festgelegt ist [131]. Ein wichtiges stabilisierendes Element der Tertiärstruktur sind kovalente Disulfidbrücken, welche durch die Verknüpfung von benachbarten Cystein-SH-Gruppen der Polypeptidkette entstehen [133]. Bei der Synthese von rekombinanten Proteinen in Wildtyp-Stämmen von *E. coli* ist die Bildung von Disulfidbrücken im Zytoplasma des Bakteriums auf Grund der dort herrschenden reduzierenden Bedingungen stark beungünstigt [131, 132]. Das geringe Redoxpotential des Zytoplasmas wird durch das Thioredoxin/Thioredoxin Reduktase-System und das Glutathion/Glutaredoxin-System verursacht [134, 135]. Bakterienstämme, die für die Gene der Enzyme Thioredoxin Reduktase (*trxB*) und Glutathion Oxidoreduktase (*gor*) eine Nullmutation tragen, sorgen für die Generierung eines oxidierenden Zytoplasmas. Die nun oxidiert vorliegenden Formen der Thioredoxine und Glutaredoxine sind in der Lage, die Bildung von Disulfidbrücken in Polypeptiden aktiv zu katalysieren [121, 131].

Eine andere Strategie, die Bildung löslicher Proteine im Zytoplasma von *E. coli* zu begünstigen, beinhaltet die Co-Expression der Gene verschiedener faltungsfördernder Proteine. Anwendung finden hierbei *E. coli*-Chaperone wie das GroEL/GroES-System, das DnaK/DnaJ/GrpE-System und das Clp-System [129]. Auf Grund seiner Eigenschaft, aktiv die Bildung von Disulfidbrücken geeigneter Substratmoleküle zu unterstützen, wird auch bakterielles Thioredoxin eingesetzt [136]. Desweiteren werden die Gene von Foldasen wie der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und der Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPI) co-exprimiert, da diese Enzyme ebenfalls Teil der natürlichen Proteinfaltungsmechanismen in *E. coli* sind [129]. PDI katalysiert die korrekte Bildung von Disulfidbrücken; PPI die gegenseitige Umwandlung von *cis*- und *trans*-Isomeren von Prolin-Peptidbindungen [128].

Ferner werden verschiedene Herangehensweisen zur Reduktion der Proteinbildungsrate genutzt, um eine zu schnelle Anhäufung von Faltungsintermediaten und damit deren potentielle Aggregation zu vermeiden [129]. Zu diesen Methoden zählt insbe-

sondere die Erniedrigung der Kultivierungstemperatur [137]. Hydrophobe Wechselwirkungen, die die Bildung von *Inclusion Bodies* begünstigen, werden zudem durch geringere Temperaturen reduziert, sowie potentiell denaturierende Hitzeschock-Proteasen teilweise eliminiert [122]. Die Verwendung von schwachen Promotoren oder die partielle Induktion von starken Promotoren durch geringe Induktorkonzentrationen [126, 138], kann neben dem Einsatz von speziell ausgewählten Kulturmedien [139] ebenfalls zur Löslichkeit von zu *Inclusion Body*-Bildung neigenden Proteinen führen.

Fusionsproteine

Die erfolgreichste Methode zur Generierung löslicher Proteine in *E. coli* stellt die Verwendung von Fusionsproteinen dar [118]. Ein geeigneter Fusions-*Tag* wird hierbei mit dem Zielprotein gemeinsam produziert, um die korrekte Faltung und damit die Löslichkeit des Proteins zu unterstützen. Als Fusionspartner werden gut lösliche Proteine gewählt, die nach Austritt aus den Ribosomen von *E. coli* schnell ihre native Konformation erlangen. Das Zielprotein wird durch den *Tag* ebenfalls über die natürlichen Faltungsmechanismen von *E. coli*, die verschiedene Chaperone und Isomerasen beinhalten, in seine native Struktur gelenkt [121, 124].

Tabelle 2.1 Übersicht einiger gebräuchlicher Löslichkeits-*Tags*.

<i>Tag</i>	Protein	Herkunfts-Organismus	Referenz
MBP	<i>Maltose-Binding Protein</i>	<i>E. coli</i>	[140, 141]
NusA	N-Utilisations-Substanz	<i>E. coli</i>	[142]
GST	Glutathion-S-Transferase	<i>Schistosoma japonicum</i>	[143]
TRX	Thioredoxin	<i>E. coli</i>	[117]
BLA	AmpC-Typ- β -Lactamase	<i>Chromohalobacter</i>	[144]
SET	<i>Solubility-Enhancing Tag</i>	synthetisch	[145]
SUMO	<i>Small Ubiquitin-Modifier</i>	<i>Homo sapiens</i>	[146]
DsbC	<i>Disulfide Bond C</i>	<i>E. coli</i>	[147]
T7PK	Phage T7 Protein Kinase	<i>Bacteriophage T7</i>	[118]
ZZ	<i>Protein A IgG Repeat Domain</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	[148]

Eine Übersicht über häufig verwendete Fusions-*Tags*, die auf Grund ihrer robusten Faltungseigenschaften auch als molekulare Chaperone bezeichnet werden [117, 122], gibt Tabelle 2.1. Neben ihrer guten Löslichkeit besitzen diese Proteine z.T. weitere wertvolle Eigenschaften. Beispielsweise lässt sich ein Fusionsprotein mit MBP durch dessen Funktion als Affinitäts-*Tag* leicht aufreinigen [149]. Kleine Löslichkeits-*Tags* wie TRX (14 kDa) [150] haben gegenüber großen *Tags* wie MBP (40 kDa) [120] und NusA (54,8 kDa) [120] den Vorteil, dass ihre Synthese den Metabolismus des bakteriellen Wirts nicht so stark belastet und sie auf diese Weise zusätzlich einer Aggregation von Proteinen entgegenwirken können. Zudem weisen kleinere Fusionspartner eine geringere sterische Hinderung auf, was sich auf die Faltung des Zielproteins sowie auf die spätere Spaltung des Fusionsproteins auswirken kann [117, 122]. Die tatsächliche Eignung eines Fusions-*Tags* für ein jeweiliges Zielprotein kann jedoch nicht *a priori* vorausgesagt werden, sondern muss experimentell überprüft werden [118].

Um nach erfolgreicher Synthese eines löslichen Fusionsproteins schließlich das Zielprotein zu isolieren, müssen Fusionsproteine (im Gegensatz zu co-exprimierten Faltungshelfern [151]) wieder gespalten werden. Neben Schwierigkeiten bei der Spaltung selbst ist das wesentliche Problem hierbei das Auftreten von sogenannten „löslichen Aggregaten“. Nach der Spaltung verliert das Zielprotein hierbei seine Löslichkeit und aggregiert, da es nicht in nativer Form vorlag, sondern durch Wechselwirkungen mit dem *Tag* nur als „lösliches Aggregat“ in Lösung gehalten wurde [118, 122].

3 Experimenteller Teil

3.1 Konzeptvorstellung

Ein großes Problem bei der Herstellung von *Stem Cell Factor* (SCF) in *Escherichia coli* (*E. coli*) stellt die Bildung von *Inclusion Bodies* dar. Bisher wurde die Gewinnung von bioaktivem, löslichem SCF in der Literatur ausschließlich über die Renaturierung dieser unlöslichen Proteinaggregate beschrieben (siehe Abschnitt 2.1.6). Um die aufwändige und zeitintensive Aufarbeitung von *Inclusion Bodies* zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt, welches die direkte Produktion von löslichem, murinem SCF (mSCF) unter Vermeidung von *Inclusion Bodies* erlaubt. Der zentrale Ansatzpunkt beinhaltet dabei die Produktion eines löslichen, proteolytisch spaltbaren Fusionsproteins aus mSCF und bakteriellem Thioredoxin (TRX).

TRX begünstigt als Fusionspartner durch verschiedene Eigenschaften die Löslichkeit von eukaryontischen Proteinen im Zytoplasma von *E. coli* [132, 149]. TRX ist ein gut lösliches Protein mit ausgeprägter, stabiler Sekundär- und Tertiärstruktur [117]. Als Fusionspartner überträgt es seine robusten Faltungseigenschaften auf das Partnerprotein und agiert damit als kovalent gebundenes, molekulares Chaperon [152]. Zusätzlich besitzt TRX weitere Vorteile, die es als potenten Fusionspartner für zu *Inclusion Body*-Bildung neigenden Proteinen qualifizieren. Das Redoxprotein ist klein (14 kDa [150]), durch seine tertiäre Struktur sowohl am C- als auch am N-Terminus für Fusionen zugänglich, thermisch stabil und erreicht auch in Fusion mit anderen Proteinen hohe Expressionsraten von bis zu 40 % des totalen zellulären Proteingehalts [117]. Eine Reihe von Zytokinen konnte bereits in löslicher, bioaktiver Form in Fusion mit TRX im Zytoplasma von *E. coli* produziert werden. Dabei konnten auch heterologe Proteine, deren native Struktur Disulfidbrücken beinhaltet, bei physiologischen Temperaturen als lösliche TRX-Fusionsproteine produziert werden [117]. Diese Eigenschaft von TRX ist besonders bemerkenswert, da disulfidverbrückte Proteine durch die reduzierenden Bedingungen im Zytoplasma von *E. coli* leicht zu *Inclusion Bodies* aggregieren (siehe Abschnitt 2.2.1). Da die native Struktur der löslichen Isoform von SCF zwei intramolekulare Disulfidbrücken enthält, erschien das Konzept eines TRX-Fusionsproteins zur Gewinnung von

bioaktivem, löslichem mSCF in *E. coli* besonders vielversprechend. Zudem wurde bereits die Produktion eines löslichen Fusionsproteins aus murinem SCF und TRX in der Literatur beschrieben [117]. Das dort verwendete Expressionssystem (Typ des Plasmid-Vektors und *E. coli*-Stamm) unterscheidet sich jedoch von jenem, das in dieser Arbeit verwendet wurde. Desweiteren wurden im jeweiligen Plasmid Gene für Erkennungssequenzen verschiedener Proteasen codiert. Letztere sind für eine potentielle Spaltung der Fusionsproteine notwendig. Das in der Literatur beschriebene Fusionsprotein wurde überdies nicht weiter prozessiert, d.h. es erfolgte kein proteolytischer Verdau zur Freisetzung von mSCF.

Aus der Entscheidung heraus, die Methode der Fusionsproteine zur Gewinnung eines löslichen Proteins aus *E. coli* zu verwenden, resultieren mehrere Prozessschritte. Zunächst muss ein geeigneter Expressionsvektor konstruiert werden. Dieser muss neben den genetischen Informationen für das Target und den Fusionspartner auch die Möglichkeit zur Spaltung des Fusionsproteins durch eine geeignete Protease bieten. Nach der Synthese des Fusionsproteins mittels rekombinanter Bakterien muss das lösliche Fusionsprotein zunächst aufgereinigt werden, um dann proteolytisch gespalten zu werden. Das dadurch freigesetzte Zielprotein muss im Anschluss daran isoliert und abschließend hinsichtlich seiner biologischen Aktivität getestet werden [118].

In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Teilschritte dieses allgemeinen Konzepts auf die Herstellung von mSCF in *E. coli* übertragen. Die dabei aufgetretenen Probleme und Schwierigkeiten sowie die entwickelten Lösungsstrategien werden vorgestellt und diskutiert. Detaillierte Beschreibungen der Versuchsdurchführungen befinden sich im Anhang (siehe Kapitel 5).

3.2 Herstellung des Expressionssystems

3.2.1 Konstruktion des Expressionsvektors

pET-Expressionssysteme

Plasmide werden in der Biotechnologie häufig als Vektoren für die Übertragung und Expression fremder Gene und damit zur Synthese rekombinanter Proteine u.a. in *E. coli* eingesetzt. Breite Anwendung finden hierbei Vektoren aus dem pET-System (*Plasmid Expression by T7-RNA-Polymerase*). Die bakteriellen Plasmide dieses Systems ermöglichen die schnelle Produktion großer Mengen des gewünschten rekombinanten Proteins unter Kontrolle des starken T7-Promotors [153]. Die aus dem Bakteriophagen T7 stammende Expressionseinheit zeichnet sich durch eine sehr hohe Transkriptionseffizienz aus, da der T7-Promotor nur durch die phageneigene T7-RNA-Polymerase erkannt wird [154]. Wird eine Quelle für T7-RNA-Polymerase, z.B. über ein entsprechend kloniertes Gen in der DNA des Wirtsstammes bereitgestellt, erfolgt die Transkription der durch den T7-Promotor kontrollierten Gene (sofern der Operator des Systems nicht reprimiert ist). Über die Klonierung entsprechender Gene in den pET-Vektor an die Position stromabwärts des T7-Promotors kann schließlich mit Hilfe eines passenden Wirtsstammes die Synthese eines rekombinanten Zielproteins erreicht werden [155].

Die wesentlichen Elemente eines pET-Vektors sind der T7-Promotor, der *lac*-Operator, eine Multi-Klonierungsstelle (MCS, *Multiple Cloning Site*), der T7-Transkriptions-Terminator, das *lacI*-Gen, das Gen für eine Antibiotikum-Resistenz (Selektionsmarker) und der Replikationsursprung der DNA (*ori*, *Origin of Replication*) [156] (Abbildung 3.1). In Abwesenheit eines Induktors wird der *lac*-Operator durch das vom *lacI*-Gen codierte *lacI*-Repressor-Protein reprimiert, sodass der T7-Promotor auch in Anwesenheit von T7-RNA-Polymerase die Transkription nicht einleiten kann. Erst durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), einem Strukturanalogon der Laktose, wird der Repressor vom *lac*-Operator abgelöst und damit die Gen-Expression induziert. Auf diese Weise wird eine basale Transkription, d.h. die Transkriptionsrate der stromabwärts von einem Promotor liegenden Gene ohne Induktionsstimulus, minimiert [153, 155].

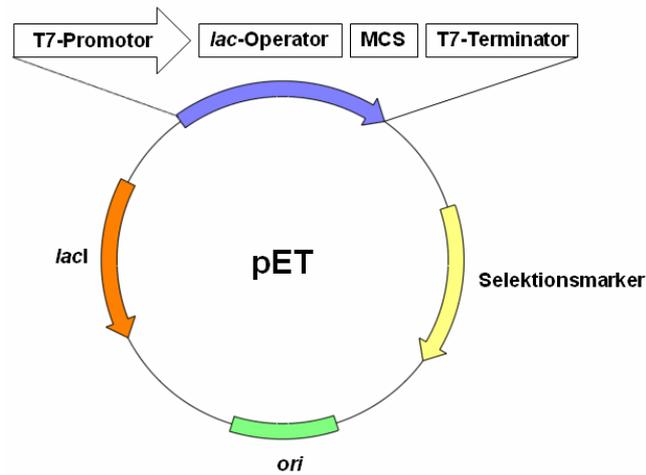


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau eines pET-Vektors. Die Kombination aus T7-Promotor und *lac*-Operator wird auch als T7*lac*-Promotor bezeichnet [156].

Zur Komplettierung eines pET-Expressionssystems wird der pET-Vektor mit einem geeigneten *E. coli*-Wirtsstamm kombiniert. Einer der gebräuchlichsten Stämme für diese Anwendung ist der *lon*- und *ompT*-Protease-defiziente Stamm BL21(DE3) [157]. Das Genom dieses lysogenen *E. coli*-Stamms enthält ein Gen für T7-RNA-Polymerase, welches in Wildtypen von *E. coli* nicht vorkommt. Dieses Gen wird vom *lacUV5*-Promotor, einer mutierten Version des *lac*-Promotors mit geringer Neigung zur Basalexpression [158] kontrolliert [153]. Analog zum pET-Vektor wird das ebenfalls im Chromosom von BL21(DE3) enthaltene *lac*-Operon durch eine Induktion mit IPTG vom seinem Repressor (codiert durch das *lacI*-Gen) getrennt und damit die Transkription von T7-RNA-Polymerase eingeleitet. IPTG erfüllt damit im pET-Expressionssystem eine wichtige Doppelfunktion. Es sorgt sowohl für die Bereitstellung von T7-RNA-Polymerase durch den Wirtsstamm, als auch für die Derepression des *lac*-Operons im pET-Vektor. Die gebildete T7-RNA-Polymerase initiiert schließlich die Expression des Zielgens durch die Erkennung des T7-Promotors im pET-Vektor. Die Synthese eines rekombinanten Zielproteins durch ein pET-Expressionssystem kann somit durch die Zugabe von IPTG eindeutig gesteuert werden [153, 158].

Konstruktion von pET-32b-trx-his-tev-mSCF

Der in dieser Arbeit verwendete Expressionsvektor zur Produktion von löslichem mSCF in rekombinanten *E. coli* wurde auf Basis eines pET-32b-Vektors konstruiert. Die zusätzlichen, zur Produktion des gewünschten Fusionsproteins benötigten Gene wurden durch Klonierung in den pET-32b-Vektor integriert.

Neben den für pET-Vektoren charakteristischen Elementen (siehe Abschnitt 4.2.1) enthält pET-32b stromabwärts des T7-Promotors, also innerhalb der MCS, ein codierendes Gen für TRX. Auf Grund dieser Eigenschaft eignet sich pET-32b in besonderem Maße als Basis für die Konstruktion eines Expressionsvektors für ein Fusionsprotein mit einem TRX-Löslichkeits-Tag. Als Selektionsmarker trägt pET-32b ein Gen für eine Ampicillin-Resistenz.

Im Rahmen der Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) wurde ein cDNA-Templat von murinem SCF benutzt, um das codierende Gen für die 165 Aminosäuren umfassende lösliche Isoform von mSCF *in vitro* zu amplifizieren. Zeitgleich wurden dabei durch die PCR-Primer Erkennungssequenzen für geeignete Restriktionsenzyme, die ebenfalls in der MCS des pET-32b-Vektors vorkommen, in das mSCF-Gen eingeführt. Im folgenden Klonierungsschritt wurde das mSCF-Gen 3' zum Gen des TRX-Tags unter Einsatz der passenden Restriktionsenzyme in den pET-32b-Vektor eingefügt.

Beim späteren *Downstreaming* muss das Fusionsprotein zunächst aufgereinigt und schließlich das Zielprotein mSCF von seinem Fusionspartner TRX durch eine proteolytische Spaltung getrennt werden. Zu diesem Zweck wurde ein zweites DNA-Fragment in das Vektorkonstrukt integriert. Dieses Insert besteht aus dem codierenden Abschnitt für einen Hexahistidin-Tag (*His-Tag*) und einem codierenden Abschnitt für eine Erkennungssequenz für *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease. Obwohl es eine Vielzahl an potenziell verwendbaren Proteasen zur Spaltung von Fusionsproteinen gibt, wird die TEV-Protease am häufigsten verwendet, da sie hochspezifisch und relativ einfach in der Herstellung ist [118, 159]. Der oftmals in der Biotechnologie eingesetzte *His-Tag* dient als effizienter Affinitäts-Tag für eine Aufreinigung des Fusionsproteins über eine immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) [160]. In analoger Vorgehensweise zur Klonierung des mSCF-Gens in die MCS des pET-32b-Vektors wurde das zweite DNA-Fragment 5' zum mSCF-Gen positioniert.

Der codierende Bereich für den *His-Tag* liegt dabei stromaufwärts zu jenem der Erkennungssequenz der TEV-Protease. Zusätzlich wurde zwischen dem Gen von mSCF und dem codierenden Bereich der TEV-Erkennungssequenz eine Codierung für einen Serin-Rest als Linker eingefügt. Die Expressionsregion des resultierenden Vektors, der pET-32b-trx-his-tev-mSCF genannt wurde, ist schematisch in Abbildung 3.2 gezeigt. Die vollständige Plasmidkarte von pET-32b-trx-his-tev-mSCF sowie die genaue Nukleotidsequenz des vollständigen Vektorinserts werden im Anhang dargestellt; siehe Abschnitt 5.2.1.

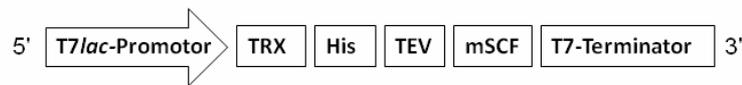


Abbildung 3.2 Vereinfachte Darstellung der Expressionsregion von pET-32b-trx-his-tev-mSCF mit den wichtigsten Elementen. His, codierender Bereich für den *His-Tag*; TEV, codierender Bereich für die Erkennungssequenz der TEV-Protease.

Die Positionen der einzelnen codierenden Abschnitte in der Expressionsregion des pET-32b-trx-his-tev-mSCF-Vektors sind von entscheidender Bedeutung, da sie den Aufbau des Fusionsproteins bestimmen. Korrespondierend zur Leserichtung von DNA und RNA vom 5'-Ende zum 3'-Ende erfolgt die Synthese des Proteins bei der Translation vom N-Terminus zum C-Terminus. Folglich wird TRX als erster Abschnitt des Fusionsproteins gebildet und ist so in der Lage, die korrekte Faltung seines C-terminalen Fusionspartners mSCF direkt bei dessen Austritt aus den Ribosomen von *E. coli* zu vermitteln. Obwohl die genaue Natur dieser Interaktion nicht bekannt ist, wird TRX als molekulares Chaperon diskutiert, welches ähnlich wie „normale“ Chaperone der Bildung von *Inclusion Bodies* entgegenwirken kann [117]. Die Lage des codierenden Gens für die TEV-Erkennungssequenz direkt 5' zum mSCF-Gen ermöglicht die definierte Spaltung des Fusionsproteins, welches auf Basis dieser Genabfolge gebildet wird. Die Spaltung führt sowohl zur Freisetzung des Zielproteins mSCF als auch zu einem Proteinfragment aus TRX und *His-Tag* (Abbildung 3.3).

His-Tags werden üblicherweise C- oder N-terminal positioniert, um bei einer Affinitätschromatographie den *His-Tag* nicht durch mögliche sterische Hinderungen in seiner Funktion einzuschränken [160]. Abweichend dazu wurde jedoch innerhalb des pET-32b-trx-his-tev-mSCF-Konstrukts eine andere Position für den *His-Tag*

gewählt. Der kommerzielle pET-32b-Vektor mit dem unmittelbar stromabwärts des T7-Promotors liegenden Gens für TRX hat sich bereits im Einsatz zur Generierung löslicher Fusionsproteine bewährt (siehe Abschnitt 3.1). Um eine potentielle Beeinträchtigung der Funktion von TRX als Löslichkeits-Tag zu vermeiden, wurde die ursprüngliche Lage des TRX-Gens im Plasmid bewusst nicht modifiziert. Eine mögliche C-terminale Positionierung des His-Tags im Fusionsprotein wurde ebenfalls nicht realisiert, um die Sequenz von mSCF und damit die biologische Aktivität des Proteins nicht zu verändern. Aus den erforderlichen Positionen von TRX, der TEV-Spaltstelle und mSCF ergab sich folglich die Lage des His-Tags innerhalb des Proteins. Der Aufbau des gesamten Fusionsproteins, welches im Folgenden als TRX-mSCF bezeichnet wird, ist schematisch in Abbildung 3.3 dargestellt.

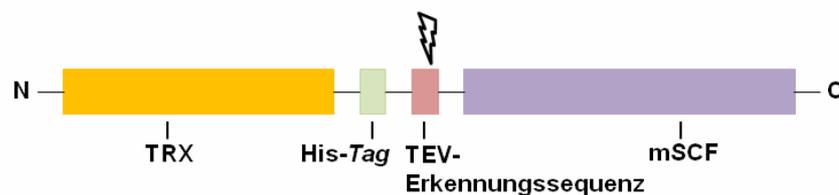


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des Fusionsproteins TRX-mSCF mit einer berechneten Größe von 32 kDa. Die Position, an der die Spaltung von TRX-mSCF durch TEV-Protease erfolgt, ist durch das Zackensymbol markiert.

Die resultierende Größe des Fusionsproteins, die mit dessen Masse korreliert, lässt sich aus der Summe der einzelnen Elemente abschätzen. Da der His-Tag (sechs Aminosäuren) und die TEV-Erkennungssequenz (sieben Aminosäuren) im Vergleich zu TRX (116 Aminosäuren) und mSCF (165 Aminosäuren) nur relativ klein sind, wird ihr Beitrag zur Gesamtmasse vernachlässigt. Folglich ergibt sich aus den Einzelmassen von TRX (14 kDa) [150] und mSCF (18,3 kDa; Berechnung über die Nukleotidsequenz¹) eine Gesamtgröße für das Fusionsprotein von 32,3 kDa.

Als abschließender Schritt der Vektorkonstruktion wurde die korrekte Nukleotidsequenz in pET-32b-trx-his-tev-mSCF durch eine Sequenzierung des Inserts (Durchführung über Eurofins MWG Operon, Ebersberg) verifiziert.

¹ Verwendung der Software *Proteomic Tools* von ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/#proteome>)

3.2.2 Transformation von BL21(DE3)

Um die genetische Information der Plasmid-DNA in ein rekombinantes Protein zu übersetzen, bedarf es der Translationsmechanismen eines geeigneten *E. coli*-Wirtsstammes. Da sich für das pET-Expressionssystem der Stamm BL21(DE3) bewährt hat (siehe Abschnitt 3.2.1), wurde dieser in der vorliegenden Arbeit verwendet. Für die Transformation der Bakterien wurden diese zunächst mittels TSS (*Transformation and Storage Solution*)-Methode chemisch kompetent gemacht (siehe Anhang, Abschnitt 5.2.2). Durch den folgenden kurzen Hitzeschock auf 42 °C wurde der pET-32b-trx-his-tev-mSCF-Vektor in die kompetenten Bakterien transformiert (siehe Anhang, Abschnitt 5.2.2).

Zur Kontrolle der Transformation wurden die Bakterien auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und inkubiert. Da das verwendete Plasmid pET-32b-trx-his-tev-mSCF ein Gen für eine Ampicillin-Resistenz trägt, wurde dieses bei der Transformation von BL21(DE3) auf die Bakterien übertragen. Das Antibiotikum wirkt damit als Selektionsmarker und führte zur ausschließlichen Besiedelung der Agarplatten mit den plasmidtragenden Bakterien.

Restriktionsverdau

Zur Überprüfung der Transformation wurde ein analytischer Restriktionsverdau des Plasmids durchgeführt (Durchführung siehe Anhang, Abschnitt 5.2.4). Dazu wurde pET-32b-trx-his-tev-mSCF zunächst isoliert, d.h. die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA des Bakteriums und den Proteinen der Zelle abgetrennt. Anhand der bekannten Nukleotidsequenz des Plasmids und der Schnittstellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *PstI* wurde ein theoretisch zu erwartendes Bandenmuster ermittelt². Bei der Prozessierung von pET-32b-trx-his-tev-mSCF mit *EcoRI* schneidet die Restriktionsendonuklease das Plasmid einmal (an Position 314 bp) und überführt die DNA damit in eine linearisierte Form. Die Größe des linearen Plasmids liegt, wie die der zirkulären DNA, bei 6268 bp. Werden die Enzyme *EcoRI* und *PstI* in Kombination eingesetzt, so ergeben sich zwei

² Verwendung der Software *Serial Cloner 2.1*

theoretische Fragmente mit einer Größe von 1458 bp und 4810 bp (*EcoRI* schneidet an Position 314 bp und *PstI* an Position 5124 bp). Abbildung 3.4 zeigt die Ergebnisse des Restriktionsverdaus von pET-32b-trx-his-tev-mSCF mit *EcoRI* bzw. mit *EcoRI* und *PstI*.

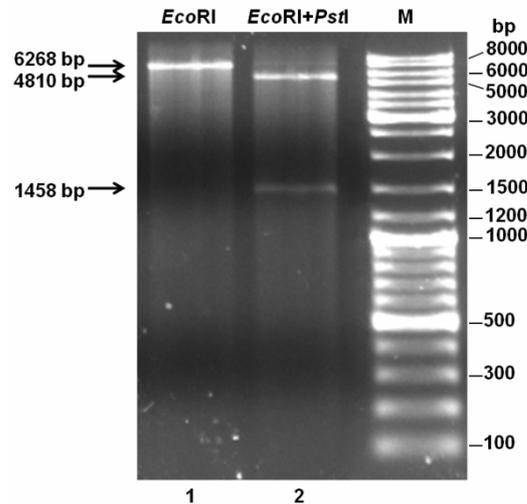


Abbildung 3.4 Analytischer Restriktionsverdaus des Plasmids pET-32b-trx-his-tev-mSCF. Gezeigt sind Proben des Einzelverdaus mit *EcoRI* (Spur 1) und des Doppelverdaus mit *EcoRI* und *PstI* (Spur 2). Die Visualisierung der Banden auf dem Agarosegel (1,5 % ig, Färbung mit Ethidiumbromid) erfolgte durch UV-Licht. M; DNA-Marker (100-10000 bp).

Die erhaltenen Fragmentmuster stimmen sowohl für den Einfachverdaus (Spur 1), als auch für den Doppelverdaus (Spur 2) in guter Näherung mit den erwarteten Größen der Nukleinsäuren überein. Im oberen Bereich des Gels liegen die Markerbanden sehr eng und erschweren damit eine exakte Zuweisung der Banden zu den Größen der korrespondierenden DNA-Fragmente. Aus diesem Grund kann die obere Bande aus Spur 2 dennoch dem größeren Fragment des Doppelverdaus (4810 bp) zugeordnet werden.

Das Ergebnis des analytischen Restriktionsverdaus stellt durch die Übereinstimmung der erwarteten und der tatsächlich detektierten DNA-Fragmente eine Bestätigung für die erfolgreich durchgeführte Transformation dar.

Produktion des Fusionsproteins

Um die Transformation auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurde der plasmidtragende Stamm im Schüttelkolben bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei einer optischen Dichte (OD) von 0,6 durch die Zugabe von 0,1 mmol/L IPTG. Die Ernte der Bakterien erfolgte drei Stunden nach der Induktion (genaue Versuchsdurchführung siehe Anhang, Abschnitt 5.2.4). Da das Zielprotein TRX-mSCF im Zytoplasma von *E. coli* gebildet und nicht ins Medium ausgeschleust wird, musste ein Aufschluss der Bakterien mittels Ultraschall erfolgen (siehe Anhang, Abschnitt 5.5). Über eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) erfolgte die Analytik der Proben (Durchführung der Elektrophorese siehe Anhang, Abschnitt 5.6). Untersucht wurden die totalen Fraktionen des Zellysats vor der Induktion und drei Stunden nach der Induktion. Als totale Fraktion wird im Folgenden eine Mischung aus den löslichen und den unlöslichen Anteilen eines Zellysats bezeichnet. In Abbildung 3.5 zeigt der Vergleich zwischen den Proben vor (Spur 1) und nach der Induktion (Spur 2) eine eindeutige Proteinsynthese. Anhand des Größenmarkers lässt sich das produzierte Protein dem Fusionsprotein TRX-mSCF zuordnen. Die erwartete Größe von TRX-mSCF von 32 kDa konnte durch dieses Experiment bestätigt werden. Weiterhin zeigte die erfolgte Produktion des rekombinanten Proteins die gelungene Transformation des Vektors pET-32b-trx-his-tev-mSCF in BL21(DE3).

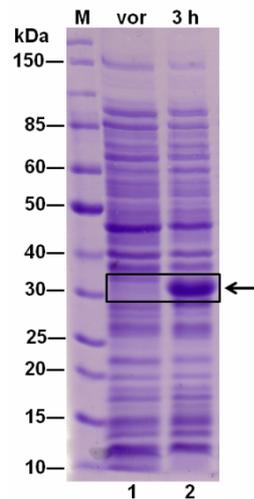


Abbildung 3.5 Überprüfung der Transformation durch die Proteinsynthese. Gezeigt sind jeweils die totalen Fraktionen des Zellysats vor (Spur 1) und 3 Stunden nach der Induktion (Spur 2). Das rekombinante Fusionsprotein TRX-mSCF (32 kDa) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; *Coomassie Blue*-Färbung). M; Proteinmarker (10-200 kDa); vor, totale Fraktion vor der Induktion; h, Stunden.

3.2.3 Fazit des Kapitels

Die Konstruktion eines Expressionsvektors zur Synthese des rekombinanten TRX-mSCF-Fusionsproteins konnte erfolgreich realisiert werden. Das resultierende Plasmid pET-32b-trx-his-tev-mSCF enthält neben den Genen für mSCF und dessen Fusionspartner TRX eine Erkennungssequenz für TEV-Protease zur Spaltung des Fusionsproteins sowie einen *His-Tag* zur Aufreinigung von TRX-mSCF.

Die Transformation von pET-32b-trx-his-tev-mSCF in chemisch kompetente BL21(DE3)-Zellen wurde durch die Proteinsynthese von TRX-mSCF sowie einem analytischen Restriktionsverdau des Plasmids überprüft. Mit dem plasmidtragenden BL21(DE3)-Stamm konnte damit ein Expressionssystem für die Herstellung von TRX-mSCF in *E. coli* zur Verfügung gestellt werden.

3.3 Produktion von löslichem TRX-mSCF

3.3.1 Einfluss der Kultivierungsbedingungen

Bei der Produktion von SCF in *E. coli* treten häufig Probleme durch die Bildung von *Inclusion Bodies* auf (siehe Abschnitt 2.1.6). Zur Vermeidung dieser Aggregate erfolgte die Synthese des Zytokins als Fusionsprotein mit TRX. Zusätzlich zu dieser Herangehensweise auf genetischer Ebene kann die korrekte Faltung eines rekombinanten Zielproteins durch geeignete Kultivierungsbedingungen unterstützt werden. Besonderen Einfluss können hierbei die Temperatur, die Medienzusammensetzung oder auch die Induktorkonzentration ausüben (siehe Abschnitt 2.2.2).

Eine weit verbreitete Methode zur Vermeidung von *Inclusion Bodies* ist die Verringerung der Kultivierungstemperatur der rekombinanten Bakterien auf unter 37 °C [122, 137]. Hydrophobe Wechselwirkungen, die Hauptursache der Bildung von *Inclusion Bodies*, zeigen eine starke Temperaturabhängigkeit und werden bei hohen Temperaturen begünstigt [161]. Eine weitere direkte Konsequenz aus einer Temperaturreduktion ist die partielle Eliminierung von Hitzeschock-Proteasen, welche in rekombinanten *E. coli* unter überexprimierenden Bedingungen induziert werden [162]. Die Anwendbarkeit der Temperatur-Methode zur Unterstützung der korrekten Faltung von Proteinen ist jedoch limitiert. Niedrige Temperaturen während der Kultivierung bewirken sowohl eine verminderte Replikation der Bakterien als auch eine Drosselung von Transkriptions- und Translationsvorgängen [163].

Die qualitative und quantitative Zusammensetzung eines Kulturmediums kann den Metabolismus von *E. coli* und damit auch die Synthese eines rekombinanten Proteins maßgeblich beeinflussen [164, 165]. Grundsätzlich können komplexe und definierte Medien unterschieden werden. Proteine, die wie SCF ebenfalls eine starke Tendenz zur Aggregation in Form von *Inclusion Bodies* zeigen, konnten bereits sowohl in komplexen [139] als auch in definierten [166] Medien erfolgreich in löslicher Form in *E. coli* produziert werden. Der Einfluss des Mediums auf die Löslichkeit eines Proteins hängt dabei von der Natur des Proteins selbst ab, sodass eine experimentelle Evaluierung für jedes Protein individuell notwendig ist.

Eine weitere Einflussgröße, die die Bildung von *Inclusion Bodies* reduzieren kann, ist die Induktorkonzentration. Liegt ein starker Promotor, wie der in pET-

Expressionssystemen verwendete T7-Promotor vor, so wirken sich geringe Konzentrationen an IPTG positiv auf die Löslichkeit rekombinant produzierter Proteine aus [138]. Grund für diese Beobachtung ist die geringere Produktbildungsrate, die die reguläre Prozessierung der Proteinfaltung in *E. coli* begünstigt und damit einer Aggregation der Proteine entgegenwirkt.

Auf Grund dieser Kenntnisse zur externen Beeinflussung der Faltungsvorgänge wurde im folgenden Kapitel die Bildung von löslichem TRX-mSCF in Abhängigkeit unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen untersucht. Neben einem definierten Medium wurden zwei komplexe Medien, LB-Medium und TB-Medium, getestet. Die Kultivierungen wurden für jedes Medium bei drei verschiedenen Temperaturen (37 °C, 30 °C und 23 °C) durchgeführt. Die Induktion erfolgte im Bereich der exponentiellen Wachstumsphase der BL21(DE3)-Bakterien. Für das LB-Medium und das definierte Medium wurde bei einer OD von 0,6 induziert; in TB-Medium erfolgte die Induktion bei einer OD von 1,0. Die IPTG-Konzentration wurde nicht variiert, sondern mit einem niedrigen Wert von 0,1 mmol/L konstant gehalten (genaue Versuchsdurchführungen und Medienzusammensetzungen siehe Anhang, Abschnitt 5.3). Die Produktbildung wurde innerhalb der ersten zehn Stunden nach der Induktion verfolgt. Dafür wurden die Proben nach erfolgtem Ultraschall-Aufschluss (siehe Anhang, Abschnitt 5.5) mittels SDS-PAGE analysiert. Um die jeweiligen Proben auf dem Polyacrylamid-Gel direkt miteinander vergleichen zu können, wurde bei der Probenpräparation eine Normierung auf einen gemeinsamen OD-Wert vorgenommen. Für den Zellaufschluss der Bakterien wurde durch entsprechende Volumenwahl für die Resuspension der Zellen stets der gleiche OD-Wert eingestellt (siehe Anhang, Abschnitt 5.5).

Ziel dieser Untersuchung sollte es sein, geeignete Kultivierungsparameter für eine maximale Ausbeute an löslichem TRX-mSCF unter den gegebenen Bedingungen zu finden. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte im Schüttelkolben, da sich dieses einfache System zum *Screening* verschiedener Bedingungen besonders eignet.

Detektion von löslichem TRX-mSCF

Im Rahmen der Transformationsüberprüfung (siehe Abschnitt 3.2.2) konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression des rekombinanten Gens für TRX-mSCF

induziert werden konnte. Untersucht wurden dabei jedoch nur die totalen Fraktionen des Zelllysats. Um Aussagen zur Löslichkeit des Fusionsproteins treffen zu können, muss eine Trennung der löslichen und der unlöslichen Bestandteile des Lysats sowie deren separate Analytik erfolgen. Diese Auftrennung des Zelllysats wurde durch einen einfachen Zentrifugationsschritt erreicht (siehe Anhang, Abschnitt 5.5).

3.3.2 LB-Medium

Kultivierung bei 37 °C

In Abbildung 3.6 lässt sich der zeitliche Verlauf der Bildung von löslichem TRX-mSCF in LB-Medium bei 37 °C beobachten.

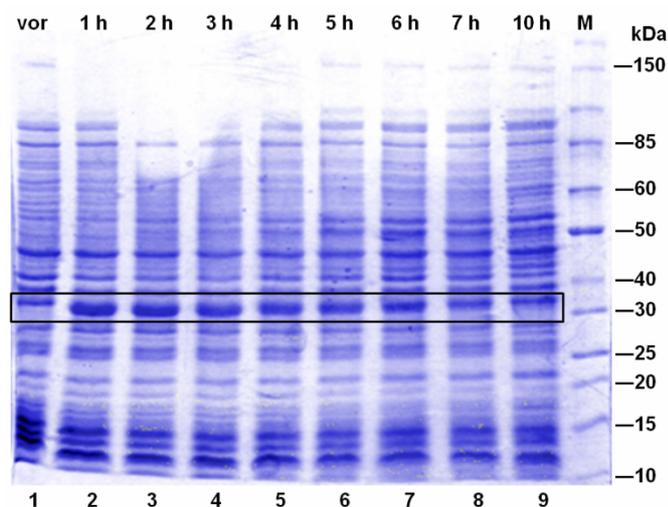


Abbildung 3.6 Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zelllysats in LB-Medium bei 37 °C. Gezeigt sind jeweils Proben vor der Induktion (Spur 1) sowie 1-7 Stunden (Spuren 2-8) und 10 Stunden (Spur 9) nach der Induktion. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; *Coomassie Blue*-Färbung). M; Proteinmarker (10-200 kDa); vor, lösliche Fraktion vor der Induktion; h, Stunde(n).

Der direkte Vergleich zwischen der Probe vor der Induktion (Spur 1) und den Proben nach der Induktion (Spuren 2-9) zeigt deutlich die Produktion von löslichem TRX-mSCF. Bereits eine Stunde nach der Induktion ist eine prägnante Bande zu erkennen, die dem Fusionsprotein mit einer Größe von etwa 32 kDa zuzuordnen ist. Die

Bandenintensität nimmt jedoch ungefähr sieben Stunden nach der Induktion (Spur 8) kontinuierlich wieder ab. Die intensivsten Banden und damit die höchsten relativen Konzentrationen an löslichem Zielprotein liegen etwa in den ersten drei Stunden nach der Induktion (Spuren 2-4) vor.

Die Produktion von rekombinanten Proteinen stellt für den Metabolismus von *E. coli* eine große Belastung dar. Rekombinante Proteine, die naturgemäß nicht zum Stoffwechsel des bakteriellen Wirts gehören, können ebenso wie unzweckmäßige Polypeptide (fehlerhaft gefaltete oder unvollständige Proteine) durch *E. coli*-Proteasen wieder abgebaut werden [167]. Durch Zugabe von IPTG wird am viralen T7-Promotor eines pET-Vektors eine ausgeprägte Transkriptionsaktivität induziert (siehe Abschnitt 3.2.1), sodass das rekombinante Protein zur stärksten Proteinfraction akkumuliert [153] (Abbildung 3.6). Obwohl mit BL21(DE3) ein Stamm vorliegt, der eine Deletion bezüglich einiger Proteasen besitzt (siehe Abschnitt 3.2.1), ist dennoch ein Abbau von TRX-mSCF zu beobachten. Ein möglicher Verdünnungseffekt durch das Überwachsen der produzierenden Bakterien mit nicht produzierenden Bakterien kann ausgeschlossen werden, da keine deutliche Erhöhung der OD-Werte in zeitlicher Korrelation zum beobachteten Rückgang der Bandenintensitäten von TRX-mSCF zu messen war (Daten nicht gezeigt).

Zur Bestimmung des relativen Anteils von löslichem TRX-mSCF am gesamt gebildeten TRX-mSCF wurden alle Fraktionen der jeweiligen Zelllysate über eine SDS-PAGE untersucht. Durch die Probenvorbereitung wurden alle Proteine denaturiert und dadurch in Lösung gebracht. Exemplarisch sind in Abbildung 3.7 die totale, die lösliche und die unlösliche Fraktion eines typischen Zelllysats gezeigt.

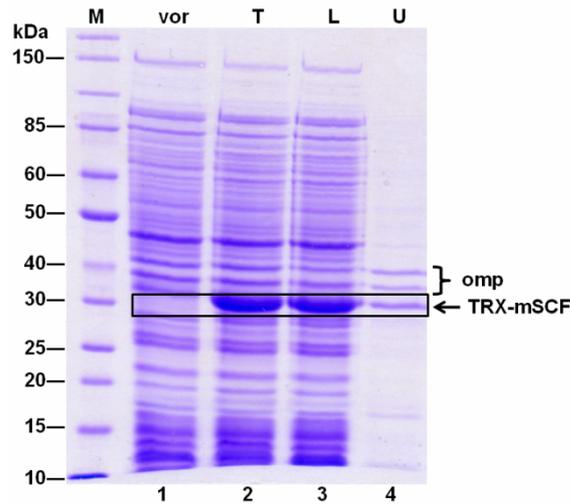


Abbildung 3.7 Vergleich von totaler, löslicher und unlöslicher Fraktion eines typischen Zelllysats. Gezeigt sind jeweils Proben der totalen Fraktion vor der Induktion (Spur 1), sowie der totalen Fraktion (Spur 2), der löslichen Fraktion (Spur 3) und der unlöslichen Fraktion (Spur 4) 3 Stunden nach der Induktion (LB-Medium, 37 °C). Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; *Coomassie Blue*-Färbung). M, Protein-Marker (10-200 kDa); vor, totale Fraktion vor der Induktion; T, total; L, löslich; U, unlöslich; omp, Proteine der äußeren Membran (*Outer Membrane Protein*).

Wird das Zielprotein TRX-mSCF wie gewünscht in löslicher Form gebildet, befindet es sich neben den bakterieneigenen Proteinen nach der Zentrifugation zur Zellfraktionierung im Überstand (der löslichen Fraktion des Zelllysats). Die unlösliche Fraktion kann neben Zelltrümmern, Zellkernen und Proteinen der äußeren *E. coli*-Membran (omp, *Outer Membrane Protein*) auch aggregierte Proteine wie *Inclusion Bodies* beinhalten [168]. Tritt eine solche Aggregation des Fusionsproteins auf, kann dies durch die Untersuchung der verschiedenen Fraktionen des Zelllysats detektiert werden. Der Vergleich mit der totalen Fraktion, die noch lösliche und unlösliche Bestandteile enthält, erlaubt eine Aussage über die Anteile von löslichem TRX-mSCF und unlöslichem TRX-mSCF am gesamt gebildeten Fusionsprotein. Demzufolge lässt sich in Abbildung 3.7 erkennen, dass das Zielprotein hier fast ausschließlich in löslicher Form (Spur 3) gebildet wurde. Der Anteil an *Inclusion Bodies* (Spur 4) an der Gesamtmenge des gebildeten Fusionsproteins (Spur 2) hingegen ist nur sehr gering. Da die Synthese von SCF in *E. coli* ohne gentechnische Hilfsmittel wie z.B. Fusions-*Tags* mit der Bildung unlöslicher Proteinaggregate einher geht (siehe Abschnitt 2.1.6), ist die Löslichkeit des Fusionsproteins hier eindeutig auf die Anwesenheit des Fusionspartners TRX zurückzuführen. Auch die

Bildung von löslichem TRX-mSCF bei einer relativ hohen Temperatur von 37 °C, die die Bildung von *Inclusion Bodies* begünstigen sollte, zeigt die Eignung von TRX als Löslichkeits-Tag für mSCF (Abbildung 3.6).

Die in Abbildung 3.7 gezeigten Ergebnisse sind, sofern nicht gesondert vermerkt, repräsentativ für alle Proben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Sowohl die Verteilung an gebildetem TRX-mSCF auf die Fraktionen des Zellysats sowie die gute Qualität der Aufschlüsse haben sich wiederkehrend beobachten lassen. Charakteristisch für eine effektive Lyse sind die fast gänzlich übereinstimmenden Banden von totaler und löslicher Fraktion (Spuren 2 und 3). Ein weiteres Gütezeichen für einen vollständigen Zellaufschluss und die Separation der verschiedenen Fraktionen des Zellysats ist das Fehlen weiterer Banden (neben Proteinen der äußeren Membran von *E. coli* (um 40 kDa) und etwaig in *Inclusion Bodies* gebildetem TRX-mSCF) in der unlöslichen Fraktion (Spur 4).

Kultivierungen bei 30 °C und 23 °C

Die zeitabhängige Bildung von löslichem TRX-mSCF in LB-Medium bei 30 °C und bei 23 °C sind in Abbildung 3.8 und in Abbildung 3.9 dargestellt. Im Wesentlichen zeigen sich für beide Temperaturen analoge Ergebnisse wie bei der Kultivierung in LB-Medium bei 37 °C (Abbildung 3.6). Der Beginn der Proteinsynthese sowie der weitere Verlauf der Produktbildung sind dabei als Folge der geringeren Temperaturen zeitlich nach hinten verschoben. Eine Verringerung der Bandenintensitäten von TRX-mSCF ist bei 30 °C etwa zehn Stunden nach der Induktion (Abbildung 3.8, Spur 8) zu sehen. Für 23 °C kann dies im untersuchten Zeitfenster nicht beobachtet werden (Abbildung 3.9).

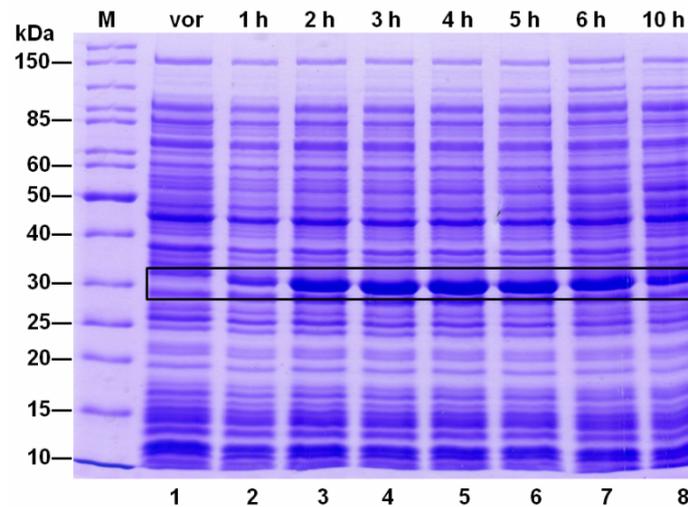


Abbildung 3.8 Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zelllysats in LB-Medium bei 30 °C. Gezeigt sind jeweils Proben vor der Induktion (Spur 1) sowie 1-6 Stunden (Spuren 2-7) und 10 Stunden (Spur 8) nach der Induktion. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; *Coomassie Blue*-Färbung). M; Proteinmarker (10-200 kDa); vor, lösliche Fraktion vor der Induktion; h, Stunde(n).

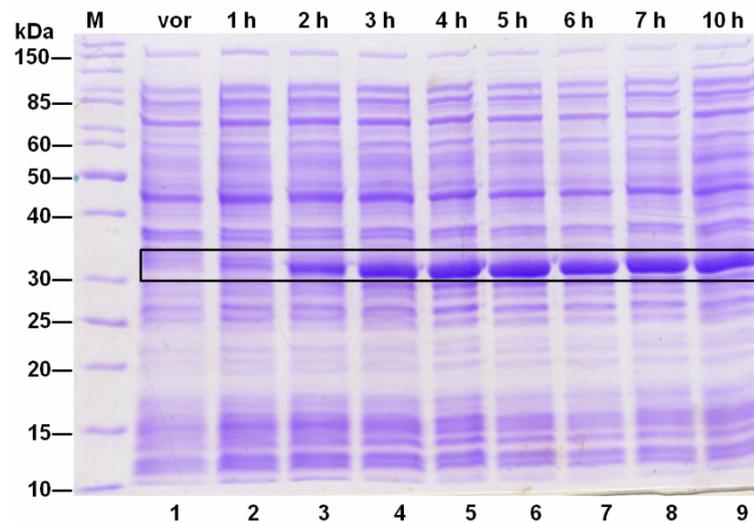


Abbildung 3.9 Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zelllysats in LB-Medium bei 23 °C. Gezeigt sind jeweils Proben vor der Induktion (Spur 1) sowie 1-7 Stunden (Spuren 2-8) und 10 Stunden (Spur 9) nach der Induktion. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; *Coomassie Blue*-Färbung). M; Proteinmarker (10-200 kDa); vor, lösliche Fraktion vor der Induktion; h, Stunde(n).

Vergleich der Ergebnisse für alle Temperaturen in LB-Medium

Die Bildung von löslichem TRX-mSCF in LB-Medium konnte bei allen drei untersuchten Temperaturen beobachtet werden. Der Beginn der Proteinsynthese wurde dabei korrelierend zum verlangsamten Bakterienwachstum durch die sinkenden Temperaturen zeitlich nach hinten verschoben. Durch die Analyse der OD-normierten Proben mittels SDS-PAGE lassen sich die relativen Mengen an gebildetem Fusionsprotein in guter Näherung miteinander vergleichen. Entgegen der Erwartung hat die Kultivierungstemperatur keinen Einfluss auf die Bildung von löslichem TRX-mSCF gezeigt. Vermutlich ist die fördernde Wirkung des Fusionspartners TRX auf die Löslichkeit des gesamten Fusionsproteins so ausgeprägt, dass sich ein potentieller Temperatureinfluss nicht zeigte.

3.3.3 TB-Medium

Als zweites komplexes Medium wurde TB-Medium zur Ermittlung des Einflusses der Kultivierungsbedingungen auf die Bildung von löslichem TRX-mSCF verwendet. Als Kohlenhydratquelle wurde Glycerin verwendet; die genaue Zusammensetzung des Nährmediums ist im Anhang beschrieben (siehe Abschnitt 5.3). Überraschenderweise wurde für dieses Medium bei allen Temperaturen das Fusionsprotein ausschließlich in Form von *Inclusion Bodies* produziert (Daten nicht gezeigt). TB-Medium ist ein extrem reichhaltiges Medium, welches zu hohen Zellzahlen führt [169]. Der gesamte Metabolismus von *E. coli* wird stark angeregt und alle Prozesse in der Zelle auf Grund der guten Nährstoffversorgung beschleunigt. Durch hohe Proteinbildungsrate kann es daher verstärkt zur Bildung von *Inclusion Bodies* kommen (siehe Abschnitt 2.2.2).

3.3.4 Definiertes Medium

Im Bereich der definierten (oder auch als synthetisch bezeichneten) Medien gibt es eine Vielzahl an verschiedenen Zusammensetzungen, die je nach Zielsetzung einer

Kultivierung variieren können. Durch den Einsatz definierter Medien kann ein kontrolliertes Wachstum der Bakterien und damit verbundener Prozesse erzielt werden. Vor dem Hintergrund der *Inclusion Body*-Bildung ist diese Medieneigenschaft besonders erstrebenswert.

Für diese Arbeit wurde ein Glukose/Mineralsalz-Medium gewählt, das sich bereits im Bereich der Hochzelldichte-Kultivierungen (HCDC, *High Cell Density Culture*) von *E. coli* für verschiedene rekombinante Proteine bewährt hat [166, 170-172]. Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist dem Anhang zu entnehmen (siehe Abschnitt 5.3).

Kultivierung bei 37 °C

In Abbildung 3.10 ist der zeitliche Verlauf der Bildung von löslichem TRX-mSCF in definiertem Medium bei 37 °C gezeigt. Die Produktion des löslichen Zielproteins ist am deutlichsten zwischen drei und acht Stunden nach der Induktion (Spuren 4-9) zu beobachten. Der anschließende Abbau von TRX-mSCF setzte ab etwa neun Stunden nach der Induktion (Spur 10) ein.

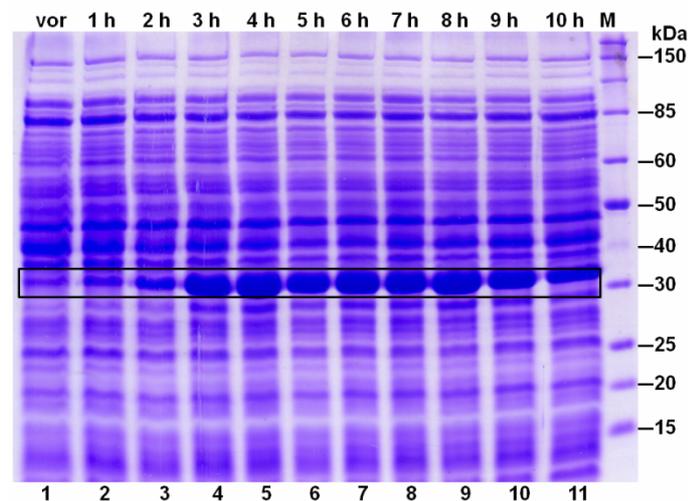


Abbildung 3.10 Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zelllysats in definiertem Medium bei 37 °C. Gezeigt sind jeweils Proben vor der Induktion (Spur 1) sowie 1-10 Stunden (Spuren 2-11) nach der Induktion. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; *Coomassie Blue*-Färbung). M; Proteinmarker (10-200 kDa); vor, lösliche Fraktion vor der Induktion; h, Stunde(n).

Kultivierungen bei 30 °C und 23 °C

Die zeitabhängige Bildung von löslichem TRX-mSCF in definiertem Medium bei 30 °C und 23 °C ist in Abbildung 3.11 und in Abbildung 3.12 zu verfolgen. Bei 30 °C wurde das lösliche Fusionsprotein vermehrt ab vier Stunden nach der Induktion gebildet (Abbildung 3.11, Spur 5). Eine leichte Abnahme der Bandenintensität ist nach neun Stunden nach der IPTG-Zugabe zu erkennen (Abbildung 3.11, Spur 10).

Auf Grund der niedrigen Temperatur verlief die Bildung des rekombinanten Zielproteins bei 23 °C (Abbildung 3.12) insgesamt deutlich langsamer als bei den beiden höheren Temperaturen (Abbildung 3.10 und Abbildung 3.11). Die maximal beobachteten Bandenintensitäten, die in guter Näherung mit den relativen Proteinkonzentrationen korrelieren, sind daher bei 23 °C geringer als bei 37 °C und 30 °C. Ein Abbau von TRX-mSCF konnte im untersuchten Zeitraum bei 23 °C nicht detektiert werden.

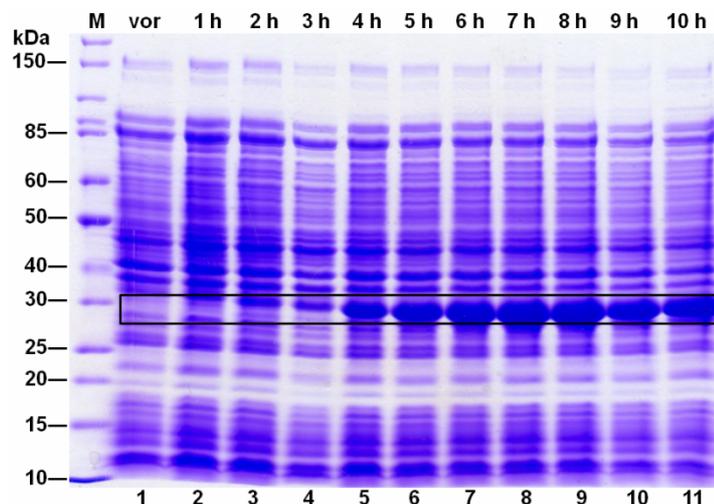


Abbildung 3.11 Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zelllysats in definiertem Medium bei 30 °C. Gezeigt sind jeweils Proben vor der Induktion (Spur 1) sowie 1-10 Stunden (Spuren 2-11) nach der Induktion. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; *Coomassie Blue*-Färbung). M; Proteinmarker (10-200 kDa); vor, lösliche Fraktion vor der Induktion; h, Stunde(n).

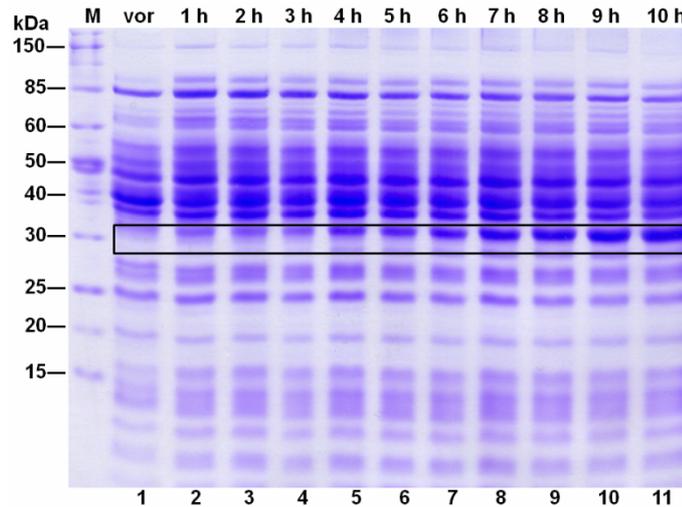


Abbildung 3.12 Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zelllysats in definiertem Medium bei 23 °C. Gezeigt sind jeweils Proben vor der Induktion (Spur 1) sowie 1-10 Stunden (Spuren 2-11) nach der Induktion. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; *Coomassie Blue*-Färbung). M; Proteinmarker (10-200 kDa); vor, lösliche Fraktion vor der Induktion; h, Stunde(n).

Vergleich der Ergebnisse für definiertes Medium und LB-Medium

Im Wesentlichen stimmen die für das definierte Medium bestimmten Produktbildungsverläufe mit den Ergebnissen der Kultivierungen in LB-Medium überein (siehe Abschnitt 3.3.2). Die Synthese des löslichen Fusionsproteins setzte in definiertem Medium jedoch zeitlich versetzt ein, wohingegen im Laufe der Kultivierung auch höhere Produktmengen gebildet wurden. Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht für die erreichten Proteinmengen für die Kultivierungen bei 37°C für beide Medien. Der optimale Erntezeitpunkt wurde als jener Zeitpunkt definiert, bei dem bei möglichst hoher Biotrockenmasse (BTM) die größten Mengen an löslichem TRX-mSCF erreicht wurden (Bestimmung der BTM siehe Anhang, Abschnitt 5.4). Der Gesamtproteingehalt wurde über das Bradford-Assay ermittelt (siehe Anhang, Abschnitt 5.7); die Konzentrationsbestimmung von TRX-mSCF in der löslichen Fraktion des Zelllysats erfolgte über eine densitometrische Auswertung (siehe Anhang, Abschnitt 5.12). Dafür wurde ein mit *Coomassie Blue* gefärbtes Polyacrylamid-Gel einer SDS-PAGE über eine geeignete Software³ analysiert. Die

³ Verwendung der Software *Gel-Pro Analyzer 6.0*

Konzentration des gebildeten Fusionsproteins konnte basierend auf einer Kalibration mit einem Standard anhand der zugehörigen Bandenintensität auf dem Gel berechnet werden.

Tabelle 3.1 Vergleich der Kultivierungen in LB-Medium und in definiertem Medium bei 37 °C. Analysiert wurden jeweils die löslichen Fraktionen des Zellysats.

	LB- Medium	Definiertes Medium
Optimaler Erntezeitpunkt nach der Induktion [h]	3	8
Menge lösliches Gesamtprotein [mg/L]	98	175
Menge lösliches TRX-mSCF [mg/L]	26	63
Anteil lösliches TRX-mSCF am Gesamtproteingehalt [%]	27	36
OD-Wert beim optimalen Erntezeitpunkt	1,8	4,8
BTM beim optimalen Erntezeitpunkt [g/L]	0,8	1,8
Menge lösliches TRX-mSCF in Relation zur BTM [mg/g]	33	35

Der Anteil an löslichem TRX-mSCF am löslichen Gesamtprotein liegt für das definierte Medium mit 36 % höher als beim LB-Medium mit 27 %. Die gebildeten Mengen an löslichem Fusionsprotein anteilig an der BTM sind für beide Medien ähnlich (33 mg/g für LB-Medium und 35 mg/g für das definierte Medium). Obwohl beim Vergleich dieser Daten die Fehleranfälligkeit der verwendeten Messmethoden (s.o.) berücksichtigt werden muss, sind die erhaltenen Werte als relative Größen in guter Näherung miteinander vergleichbar.

Abbildung 3.13 zeigt exemplarisch den Verlauf der Wachstumskurven der induzierten Bakterienkulturen in definiertem Medium und in LB-Medium bei 37 °C. Das Wachstum der Bakterien in definiertem Medium verlief deutlich langsamer und damit kontrollierter als in dem reichhaltigerem Komplexmedium. Damit verbunden wurden für das definierte Medium auch höhere Produktmengen an löslichem Fusionsprotein erhalten (siehe Abbildung 3.6 und Abbildung 3.10, sowie Tabelle 3.1) [172]. Eine vermehrte Bildung von *Inclusion Bodies* erfolgte bei beiden Medien

trotz der ausgeprägten Produktion an rekombinanten Fusionsprotein nicht (Daten nicht gezeigt), was dem Einfluss von TRX als Fusionspartner zugeschrieben werden kann. Die beschriebenen Beobachtungen für die Produktbildung und der Verlauf der Wachstumskurven können ebenso wie die höheren, maximal erreichten Zelldichten in definiertem Medium [173] durch die verschiedenen Zusammensetzungen der beiden Nährmedien erklärt werden.

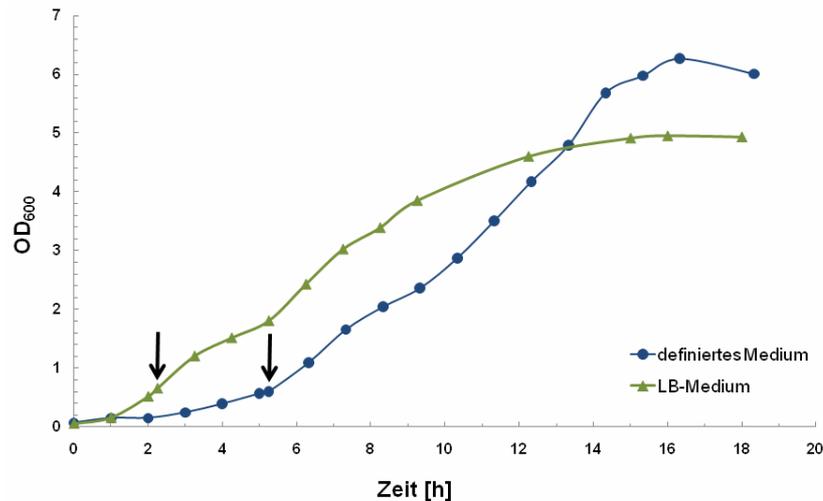


Abbildung 3.13 Wachstumskurven der induzierten Bakterienkulturen in definiertem Medium und LB-Medium bei 37 °C. Die Induktion bei einer OD von 0,6 ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.3.5 Fazit des Kapitels

Die Untersuchung von Medium- und Temperatureinfluss auf die Bildung des Fusionsproteins TRX-mSCF in der löslichen Form zeigte mehrere wiederkehrende Ergebnisse. Das rekombinante Zielprotein konnte, abhängig von Temperatur und Medium, in einem gewissen Zeitfenster nach der Induktion detektiert werden. Der zu beobachtende Abbau von TRX-mSCF kann der Aktivität von *E. coli*-Proteasen im Zytoplasma des Bakteriums zugeschrieben werden. Eine mögliche Verdünnung des Fusionsproteins in den OD-normierten Proben der SDS-PAGE-Analyse durch ein vermehrtes Wachstum nicht produzierender Bakterien kann ausgeschlossen werden. Lösliches TRX-mSCF wurde nur in LB- und definiertem Medium, nicht aber in TB-Medium erhalten. Basierend auf den Daten für die jeweiligen Anteile von gebildetem

löslichem Fusionsprotein an der Gesamtmenge löslicher Proteine lässt sich ableiten, dass unter den gegebenen Bedingungen eine Kultivierung der Bakterien in definiertem Medium die größte Menge an löslichem Fusionsprotein liefert.

Ein Einfluss der Kultivierungstemperatur auf die Produktion von löslichem Zielprotein war für keines der untersuchten Medien zu verzeichnen. Bedingt durch die allgemein gedrosselte Wachstumsrate von *E. coli* bei niedrigeren Temperaturen verschob sich die stattfindende Bildung von TRX-mSCF mit sinkenden Temperaturen lediglich zeitlich nach hinten.

Vor dem Hintergrund einer kurzen Prozessdauer ist daher eine Kultivierung der Bakterien bei 37 °C in definiertem Medium für eine maximale Ausbeute an löslichem TRX-mSCF zielführend. Unter diesen Rahmenbedingungen sollte für hohe Biomassenerträge die Ernte der Bakterien erst nach acht Stunden nach der Induktion angestrebt werden. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine BTM von etwa 1,8 g/L erreicht. Der Anteil des löslichen Fusionsproteins am Gesamtproteingehalt beträgt dabei etwa 36 %.

3.4 Aufreinigung von TRX-mSCF

In der weiteren Prozessierung von TRX-mSCF zur Herstellung des Zielproteins mSCF musste das Fusionsprotein zunächst aufgereinigt werden. Zur Isolierung des rekombinanten Proteins aus der komplexen Mischung des Zelllysats musste eine effektive Separation von den Kontaminanten (bakterieneigene Proteine von BL21(DE3)) erfolgen. Eine potentiell dafür geeignete und für solche Anwendungen zunehmend in der Biotechnologie verwendete Methode ist die immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*). Auf einer Matrix kovalent gebundene Chelatbildner (organische Substanzen mit Lewis-Base-Charakter) immobilisieren Metallionen, welche als Affinitätsliganden für His-getaggte Proteine dienen. Das dadurch selektiv gebundene Target-Protein kann unter milden Elutionsbedingungen wieder von der Affinitätsmatrix gelöst und somit schließlich in einem Reinheitsgrad von meist über 90 % isoliert werden [160].

Anstelle von konventionell gepackten Chromatographiesäulen wurden in dieser Arbeit Membranadsorber als Matrix verwendet. Die mikroporöse Struktur von

Membranadsorbern erlaubt hohe Flussraten ohne Verursachung eines starken Gegendrucks, da kaum Diffusionshemmung auftritt. Empfindliche Proteinstrukturen werden daher keinem Scherstress ausgesetzt, sodass die native Konformation des Proteins konserviert werden kann. Die Membranadsorber-Technik bietet folglich im Rahmen einer IMAC eine schnelle und schonende Möglichkeit des *Downstreamings* für rekombinante Proteine mit einem *His-Tag* [174].

Für die Aufreinigung des His-getaggen Fusionsproteins TRX-mSCF wurden Membranadsorber eingesetzt, deren Zellulose-basierte *Sartobind*TM-Matrix eine Porengröße von 45 µm besitzt mit dem dreizähligen Liganden Iminodiessigsäure (IDA, *Iminodiacetic Acid*) funktionalisiert ist⁴.

Im Folgenden wurde die Erarbeitung eines Protokolls für die Aufreinigung von TRX-mSCF mittels IMAC und Membranadsorber-Technik beschrieben. Zunächst wurde ein *Screening* geeigneter Bedingungen im Analysenmaßstab durchgeführt. Die dafür eingesetzten *Vivawell 8-Strips* sind mit 4,8 cm² Membranoberfläche auf den Analysenmaßstab angepasst⁴. Die Durchführung der *Screening*-Experimente konnte mit Hilfe einer Zentrifuge erfolgen. Dafür wurden die acht nebeneinander angeordneten Einheiten der *Vivawell 8-Strips* mit einem Lochrahmen sowie einer 96-well-Platte kombiniert.

Zur Aufreinigung des Fusionsproteins im Labormaßstab wurde die Affinitätschromatographie mit einer *Sartobind*TM MA IDA 75-Einheit (75 cm² Membranoberfläche, 15 Membranlagen)⁴ realisiert. Zu diesem Zweck wurde der Membranadsorber an eine FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*)-Anlage angeschlossen. Das für die *Vivawell 8-Strips* erstellte Protokoll wurde für das *Upscaling* an der FPLC-Anlage adaptiert und an erforderlicher Stelle überarbeitet. Die Analyse der jeweiligen Fraktionen der Chromatographie erfolgte mittels SDS-PAGE.

3.4.1 *Screening mit Vivawell 8-Strips*

Die Durchführung aller IMAC-Experimente folgte stets dem gleichen Schema und gliedert sich in mehrere Schritte. Zunächst wurde der Membranadsorber mit Metallionen beladen und die Probe aufgebracht. Nach mehreren Waschschr

⁴ Herstellerangaben (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)

Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurde das His-getaggte Zielprotein durch kompetitive Verdrängung mit Imidazol von der Membran eluiert. Um die optimalen Bedingungen für eine effiziente Aufreinigung von TRX-mSCF zu finden, wurde auf Grundlage eines Basisprotokolls für die *Vivawell 8-Strips* [175] eine geeignete Vorschrift entwickelt.

Verschiedene divalente Übergangsmetallionen (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+}) wurden hinsichtlich ihrer Eignung zur Bindung von TRX-mSCF getestet (Daten nicht gezeigt). Die besten Ergebnisse wurden mit Co^{2+} und Zn^{2+} erreicht, wobei im weiteren Verlauf auf Grund der toxischen Eigenschaften von Co^{2+} mit Zn^{2+} gearbeitet wurde.

Um eine möglichst vollständige Bindung von TRX-mSCF an die Membran zu erreichen, wurden diverse Parameter eruiert. Eine Variation der Probenauftragskonzentration (Verdünnung der löslichen Fraktion des Zelllysats von 1:2 bis 1:10), sowie der Zentrifugalkraft (300-1500 g) in Kombination mit verschiedenen langen Zentrifugationszyklen (3 min-8 min) zeigte keinen Einfluss (Daten nicht gezeigt). Desweiteren wurde der Probendurchlauf wiederholte Male erneut auf die Membran aufgegeben (ein bis zwei Wiederholungen), jedoch ebenfalls ohne Verbesserung der Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Für die Ablösung unspezifisch gebundener Proteine von der Affinitätsmatrix wurde die Membran zunächst mit Probenpuffer (PBS, erste Waschfraktion) und anschließend mit dem Basis-Elutionspuffer ohne Imidazol (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 100 mmol/L NaCl, zweite Waschfraktion) gewaschen. Dieser Puffer wurde verwendet, um die Membran auf das Puffersystem bei der Elution zu equilibrieren.

Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte in drei Fraktionen über zwei verschiedene Imidazolkonzentrationen (100 mmol/L und 250 mmol/L) im Basis-Elutionspuffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 100 mmol/L NaCl). Die erste Elution wurde mit 100 mmol/L Imidazol erreicht; für die zweite und dritte Elution wurden jeweils 250 mmol/L Imidazol verwendet. Der Basis-Elutionspuffer wurde bereits im Hinblick auf den nächsten Prozessschritt zur Herstellung von mSCF gewählt. Der für die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins durch *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease zu verwendende Puffer war durch den Hersteller der Protease⁵ empfohlen. Um einen Dialyseschritt nach der Isolierung von TRX-mSCF zu vermeiden, wurden

⁵ Herstellerangaben (Invitrogen, Darmstadt)

daher die gleichen Pufferbedingungen bereits für die Elution von TRX-mSCF im IMAC-Aufreinigungsschritt gewählt.

Das Ergebnis für die optimierten Bedingungen zur Aufreinigung von TRX-mSCF aus der löslichen Fraktion des Zelllysats über *Vivawell 8-Strips* ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Die mit Zn^{2+} -funktionalisierte Membran wurde mit der 1:2 verdünnten löslichen Fraktion des Zelllysats beladen. Die verwendeten Waschpuffer sowie die Elutionsbedingungen wurden bereits weiter oben beschrieben. Eine detaillierte Versuchsdurchführung befindet sich im Anhang (siehe Abschnitt 5.8.1).

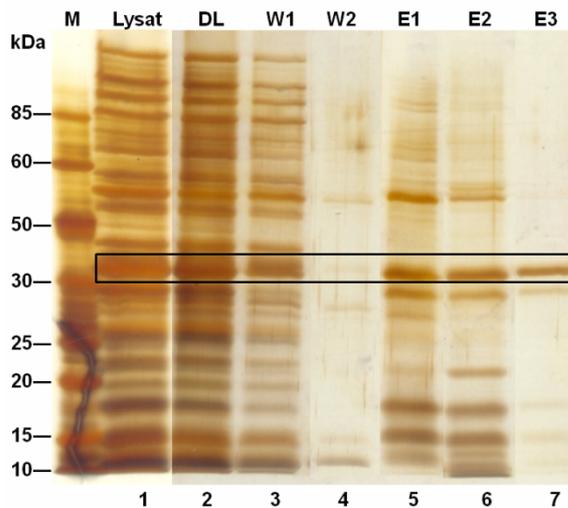


Abbildung 3.14 Ergebnis der optimierten IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF im Analysenmaßstab. Gezeigt sind eine Probe vor der Aufreinigung (Spur 1) sowie Proben aus den jeweiligen Fraktionen der verschiedenen Schritte der Chromatographie (Spuren 2-7). Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; Silberfärbung). M, Protein-Marker (10-200 kDa); Lysat, lösliche Fraktion des Zelllysats vor der Aufreinigung (Ausgangssprobe); DL, Durchlauf; W1, erste Waschfraktion; W2, zweite Waschfraktion; E1, erste Elution; E2, zweite Elution; E3, dritte Elution.

Die mit den *Vivawell 8-Strips* durchgeführte IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF führte zur nahezu vollständigen Separation des Fusionsproteins (Abbildung 3.14, Spur 7). Die Kontaminanten aus der Ausgangs-Proteinmischung konnten zu einem großen Teil bereits über verschiedene Waschschrte (Spuren 3-4) entfernt werden. Eine weitere Optimierung der Elutionsbedingungen wurde im Rahmen der Durchführung der IMAC im Labormaßstab erreicht (siehe Abschnitt 3.4.2). Die mit den *Vivawell 8-Strips* zu erkennende unvollständige Bindung des His-getaggen

Zielproteins an die Affinitätsmembran (Spur 2) konnte im größeren Maßstab ebenfalls deutlich verbessert werden (siehe Abschnitt 3.4.2).

3.4.2 Durchführung der IMAC an der FPLC-Anlage

Auf Grundlage der für den Analysenmaßstab entwickelten Vorschrift wurde die IMAC mit einem *Sartobind*TM MA IDA 75-Modul und einer FPLC-Anlage durchgeführt. Verschiedene Pufferzusammensetzungen für die einzelnen Schritte wurden eingehend untersucht, sowie geeignete Elutionsbedingungen entwickelt.

Zur Entfernung unspezifisch an die Membran gebundener Proteine wurden verschiedene Pufferzusammensetzungen getestet. Auf Grundlage eines Basis-Waschpuffers (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0) wurden unterschiedliche Mengen an Imidazol (0 mmol/L-100 mmol/L) und an NaCl (0 mmol/L-500 mmol/L) getestet (Daten nicht gezeigt). Die besten Ergebnisse wurden durch den Einsatz von vier verschiedenen Waschpuffern erzielt. Zunächst erfolgte der Zusatz geringer Mengen Imidazol (20 mmol/L bzw. 40 mmol/L); gefolgt von einer Erhöhung der Ionenstärke (500 mmol/L NaCl) in Kombination mit Imidazol (100 mmol/L). Diese Waschschritte führten zur Elution jener Proteine, die auf Grund von schwachen Wechselwirkungen mit der *Sartobind*TM-Membran an diese gebunden wurden (SDS-PAGE-Analyse siehe Anhang, Abschnitt 5.8.3). Solche unspezifischen Interaktionen können ionischer Natur sein (Elution mit erhöhter Ionenstärke) oder auch durch Wechselwirkungen der natürlich in Proteinen vorkommenden Histidin-Reste mit dem immobilisierten Metall (Elution mit geringen Imidazolkonzentrationen) hervorgerufen werden. Der vierte Waschpuffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 100 mmol/L Imidazol, 100 mmol/L NaCl) diente zur Equilibrierung der Membran auf die in der Elution verwendete Ionenstärke.

Eine gezielte Elution des His-getaggten Fusionsproteins in Kombination mit hohen Produktkonzentrationen in den Fraktionen konnte durch die Untersuchung verschiedener Elutionsbedingungen erreicht werden. Sowohl die Imidazolkonzentration (100 mmol/L-400 mmol/L) im Basis-Elutionspuffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 100 mmol/L NaCl), als auch die Elutionsstrategie (isokratisch oder Gradient) und das Elutionsvolumen (16 mL-25 mL) wurden variiert (Daten nicht gezeigt). Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurden folgende

optimierte Bedingungen gefunden: linearer Gradient von 150 mmol/L auf 175 mmol/L Imidazol über 6 mL; isokratische Elution mit 400 mmol/L Imidazol über 12 mL. Die Ergebnisse der optimierten Aufreinigung von TRX-mSCF im Labormaßstab sind in Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16 dargestellt. Das genaue Versuchsprotokoll für die Aufreinigung ist im Anhang, siehe Abschnitt 5.8.2 beschrieben.

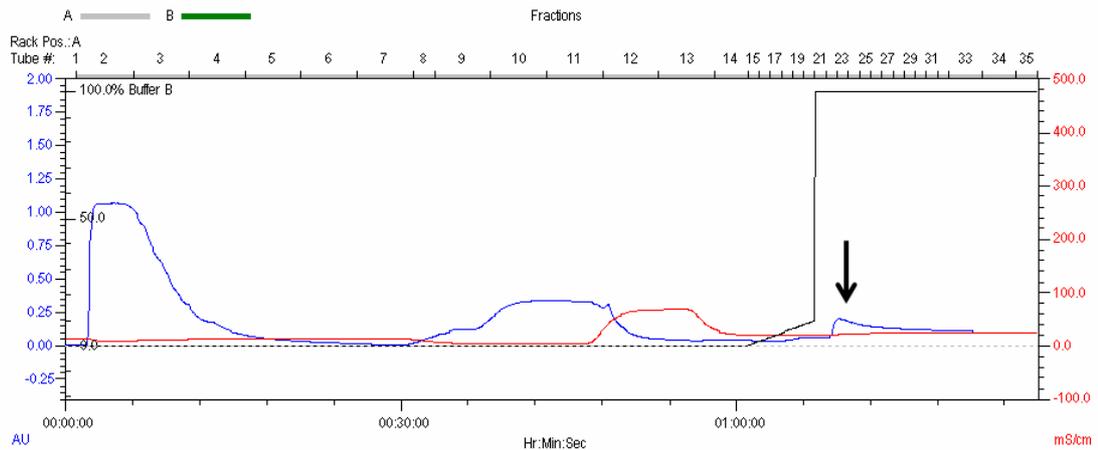


Abbildung 3.15 Chromatogramm der optimierten IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF im Labormaßstab. Gezeigt sind die Verläufe der Leitfähigkeit [mS/cm] und der UV-Absorption bei 280 nm [AU]. Der Pfeil kennzeichnet den Elutionspeak von TRX-mSCF; die schwarze Linie deutet die Elutionsstrategie an (Gradientenelution gefolgt von isokratischer Elution).

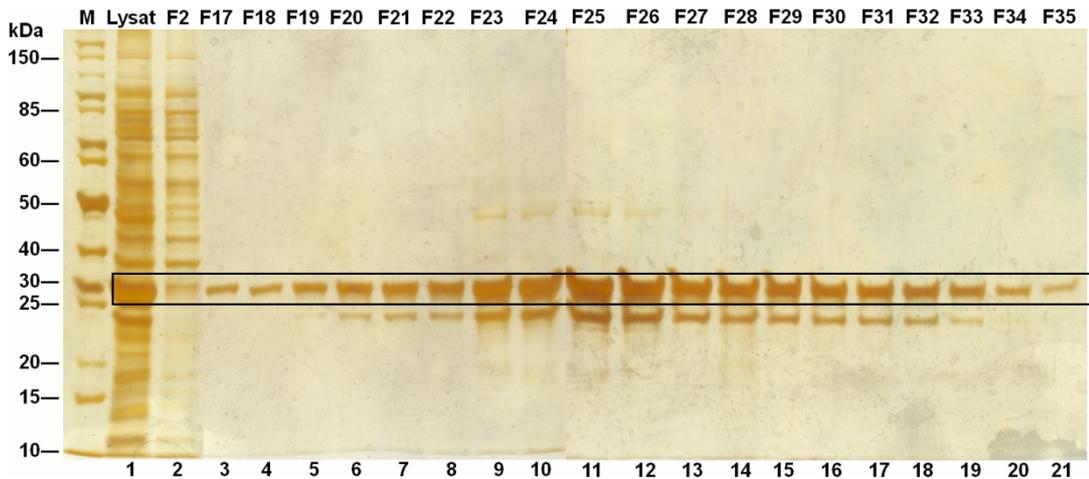


Abbildung 3.16 Ergebnis der optimierten IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF im Labormaßstab. Das *Sartobind™ MA IDA 75*-Modul wurde mit Zn^{2+} funktionalisiert und anschließend mit der Proteinmischung (lösliche Fraktion des Zelllysats 1:2 verdünnt) beladen. Gezeigt sind eine Probe vor der Aufreinigung (Spur 1) sowie eine Probe des Durchlaufs (Spur 2) und Proben aller Elutionsfraktionen (Spuren 3-21). Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; Silberfärbung). M, Protein-Marker (10-200 kDa); Lysat, lösliche Fraktion des Zelllysats vor der Aufreinigung (Ausgangssprobe); F, Fraktion. Die Nummern der Fraktionen beziehen sich auf jene des zugehörigen Chromatogramms aus Abbildung 3.15.

Im Gegensatz zu den *Vivawell 8-Strips* (Abbildung 3.14, Spur 2) ist in der Durchlaufraction an der FPLC-Anlage nur eine schwache Bande von TRX-mSCF zu erkennen (Abbildung 3.16, Spur 2). Diese Beobachtung belegt die nahezu vollständige Bindung des His-getaggten Fusionsproteins an die Zn^{2+} -funktionalisierte Membran der *Sartobind™ MA IDA 75*-Einheit. Für die verwendete Probenauftragskonzentration wurde die lösliche Fraktion des Zelllysats 1:2 verdünnt.

3.4.3 Degradation von TRX-mSCF

Bei der Betrachtung der Elutionsfraktionen von TRX-mSCF fällt auf, dass in nahezu allen Fraktionen eine zweite Bande, zusätzlich zum erwarteten Signal des Fusionsproteins bei 32 kDa, zu erkennen ist (Abbildung 3.16, Spuren 6-19). Diese Bande zeigte sich durchgängig in allen Versuchen zur IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF (siehe auch Ergebnisse der *Vivawell 8-Strips*, Abbildung 3.14, Spuren 5-7). Ein genauer Vergleich der Proteinbanden in den löslichen Fraktionen des Zelllysats vor

und nach der Induktion zeigt in der SDS-PAGE-Analyse, dass dieses zusätzliche Protein ebenfalls erst nach der Induktion auftritt (Abbildung 3.17 A). Die Bande dieses etwa 29 kDa großen Proteins (Abbildung 3.17 A, Spur 2) liegt direkt über der Bande eines bakterieneigenen Proteins mit einer Größe von etwa 27-28 kDa (Abbildung 3.17 A, Spur 1). In der Probe nach der Induktion erscheinen die beiden beschriebenen Proteine folglich als zwei direkt übereinander liegende Banden (Abbildung 3.17 A, Spur 2).

Überdies wurde zur Untersuchung der Identität des unerwarteten Proteins in den IMAC-Elutionen ein Western Blot durchgeführt (Versuchsprotokoll siehe Anhang, Abschnitt 5.9). Mittels *His-Tag*-spezifischem Antikörper konnte der immunologische Nachweis eines *His-Tags* für beide Proteine der Elutionsfraktionen (TRX-mSCF und 29 kDa-Protein) erfolgen (Abbildung 3.17 B).

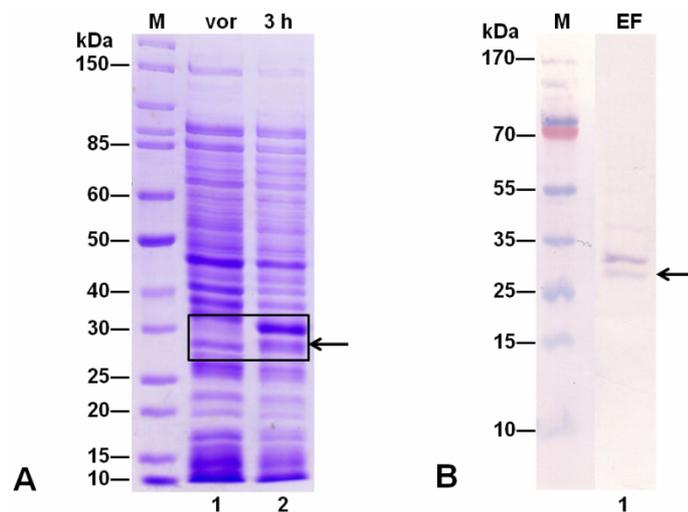


Abbildung 3.17 Untersuchungen zur Identität des unerwarteten Proteins in den IMAC-Elutionsfraktionen. Die Bande, die dem etwa 29 kDa großen Protein zugeordnet werden kann, ist jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet. (A) SDS-PAGE-Analytik (12 % iges Gel; *Coomassie Blue*- Färbung) der löslichen Fraktionen des Zelllysats vor (Spur 1) und 3 Stunden nach der Induktion (Spur 2). M, Protein-Marker (10-200 kDa); vor, lösliche Fraktion vor der Induktion; h, Stunde. (B) Western Blot-Analytik einer Elutionsfraktion aus der IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF mittels *His-Tag*-spezifischem Antikörper (Spur 1). Als Probe wurde Fraktion 31 aus der in 3.4.2 dokumentierten Aufreinigung verwendet (Abbildung 3.16, Spur 17). M, Proteinmarker (10-170 kDa); EF, Elutionsfraktion.

Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 3.17 A) deuten unter Berücksichtigung des Western Blots (Abbildung 3.17 B) darauf hin, dass das in den

Elutionsfraktionen der IMAC aufgetretene zweite Protein ein Teilfragment von TRX-mSCF ist. Dieses Fragment trägt wie TRX-mSCF einen His-Tag, was die gleichermaßen affine Bindung beider Proteine an die Affinitätsmembran erklärt. Zur gezielten Untersuchung der Fragmentierung von TRX-mSCF wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. In Abhängigkeit von der Zeit und der Temperatur wurde die Veränderung der Zusammensetzung der löslichen Fraktion eines frischen Zelllysats über eine SDS-PAGE-Analyse verfolgt (Abbildung 3.18). Dieses Experiment erlaubt Aussagen zur Stabilität von löslichem TRX-mSCF im unaufgereinigten Zelllysats.

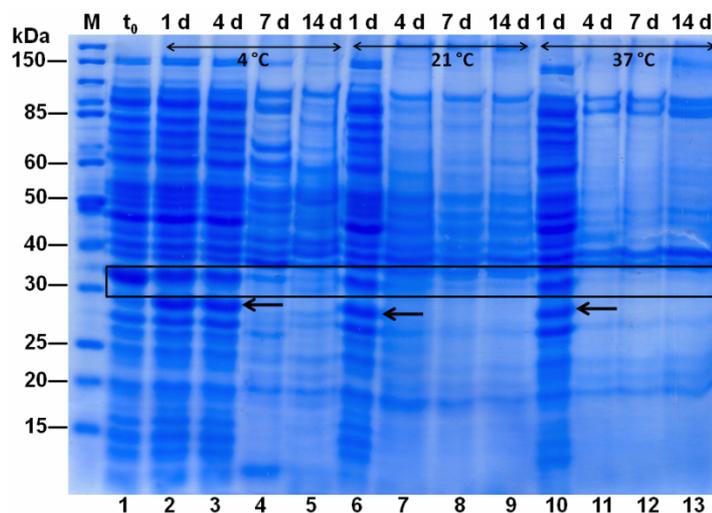


Abbildung 3.18 Zeitlicher Verlauf des TRX-mSCF-Abbaus in der löslichen Fraktion des Zelllysats. Untersucht wurden eine Probe unmittelbar nach dem Zellaufschluss (Spur 1), sowie Proben bei 4 °C (Spuren 2-5), 21 °C (Spuren 6-9) und 37 °C (Spuren 10-13) über einen Zeitraum von 14 Tagen. Das Proteolyse-Fragment von TRX-mSCF (etwa 29 kDa) ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; *Coomassie Blue*-Färbung). M, Protein-Marker (10-200 kDa); t_0 , lösliche Fraktion des Zelllysats unmittelbar nach dem Aufschluss; d, Tag(e).

Abbildung 3.18 zeigt für alle untersuchten Temperaturen (4 °C, 21 °C, 37 °C) den vollständigen, zeitabhängigen Abbau von TRX-mSCF in der löslichen Fraktion des Zelllysats. Der Abbau des Fusionsproteins erfolgte umso schneller, je höher die Umgebungstemperaturen der Proben waren. So sind bei 21 °C und 37 °C bereits nach einem Tag (Spuren 6 und 10) deutlich schwächere Proteinbanden für TRX-mSCF (32 kDa) im Vergleich zur Ausgangsprobe (Spur 1) zu erkennen. Für die Proben nach vier Tagen kann bei beiden Temperaturen kein Fusionsprotein mehr auf

dem Gel detektiert werden (Spuren 7 und 11). Bei 4 °C sind ähnliche, jedoch auf Grund der geringeren Temperatur zeitlich verzögere Entwicklungen zu beobachten (Spuren 2-5). Besonders prägnant zeigt sich bei diesen Proben nach einem Tag (Spur 2) und nach vier Tagen (Spur 3) im Vergleich zur Ausgangsprobe (Spur 1), dass mit abnehmender Intensität der TRX-mSCF-Bande die leicht darunter liegende Bande (etwa 29 kDa) an Intensität gewinnt. Als Interpretation dieser Ergebnisse lässt sich ein Abbau des Fusionsproteins durch bakterieneigene Proteasen von BL21(DE3) im unaufgereinigten Zelllysate vermuten. Diese These wird auch durch die Stabilität des Fusionsproteins in den Elutionsfraktionen der IMAC-Aufreinigung (Abbildung 3.16) bestätigt. Über einen Zeitraum von zwei Wochen wurde bei der Lagerung des Gemisches aus TRX-mSCF und seinem etwa 29 kDa großen Teilfragment bei 4 °C keine Veränderung der Zusammensetzung festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Zur Vermeidung der Proteolyse von TRX-mSCF wurden drei verschiedene kommerzielle Gemische von Protease-Inhibitoren für *E. coli*-Lysate eingesetzt (siehe Anhang, Abschnitt 5.10). Dafür wurde die Bakteriensuspension vor dem Aufschluss in separaten Experimenten mit den jeweiligen Mengen⁶ der Protease-Inhibitoren versetzt. Untersucht wurden Inhibitoren mit und ohne Zusatz von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, *Ethylendiaminetetraacetic Acid*); letztere auf Grund ihrer speziellen Eignung für His-getaggte Proteine [176]. Die jeweiligen Protein-Mischungen inhibieren ein breites Spektrum an Serin-, Cystein-, Metallo- und Aspartatproteasen⁶.

Eine Überprüfung der Ergebnisse erfolgte durch eine SDS-PAGE-Analyse der löslichen Fraktionen der Zelllysate direkt nach der Lyse bzw. nach einer IMAC-Aufreinigung via *Vivawell 8-Strips* (Daten nicht gezeigt). Da jedoch keines der untersuchten Protease-Inhibitoren-Gemische die Proteolyse von TRX-mSCF verhindern konnte, wurde auf den Einsatz von Protease-Inhibitoren verzichtet. Zur Minimierung des zeitabhängigen Abbaus von TRX-mSCF im Zelllysate wurde das Fusionsprotein daher stets unmittelbar nach der Lyse der Bakterien aufgereinigt.

⁶ Herstellerangaben (Sigma Aldrich, Steinheim bzw. Roche, Mannheim)

3.4.4 Fazit des Kapitels

Die Aufreinigung von TRX-mSCF aus der löslichen Fraktion des Zellysats konnte erfolgreich mit Hilfe einer IMAC realisiert werden. Die dabei eingesetzten Membranadsorber-Einheiten ermöglichten eine nahezu vollständige Isolierung des rekombinanten Fusionsproteins in nur einem Aufreinigungsschritt. Zunächst wurde im Analysenmaßstab (*Vivawell 8-Strips*) eine geeignete Vorschrift entwickelt und dann auf den Labormaßstab an einer FPLC-Anlage (*Sartobind™ MA IDA 75*) übertragen und optimiert.

Für den Aufreinigungserfolg von TRX-mSCF über eine IMAC erwies sich die unkonventionelle Positionierung des *His-Tags* innerhalb des Fusionsproteins (siehe Abschnitt 3.2.1) nicht als hinderlich. Obwohl der *His-Tag* zwischen den beiden sterisch anspruchsvollen Proteinteilen TRX und mSCF liegt, konnte das Fusionsprotein aus der komplexen Proteinmischung des Zellysats erfolgreich abgetrennt werden. Entscheidend für den Erfolg einer IMAC ist die räumliche Zugänglichkeit des *His-Tags* [160]. Diese kann auf Grund der spezifischen Faltung eines Proteins sowohl für terminal als auch für nicht-terminal positionierte *His-Tags* innerhalb eines rekombinanten Proteins gegeben sein.

Die Untersuchung der Elutionsfraktionen aus der IMAC-Aufreinigung zeigte, dass neben dem Zielprotein TRX-mSCF ein weiteres Protein mit vergleichbarer Affinität an die Zn^{2+} -funktionalisierte Membran gebunden wurde. Auf Grund zusätzlicher Analysen konnte dieses Protein als Zwischenprodukt einer TRX-mSCF-Proteolyse identifiziert werden. Das etwa 29 kDa große Protein-Fragment ist nur etwas kleiner als TRX-mSCF (32 kDa) und umfasst daher den intakten *His-Tag* des Fusionsproteins (siehe Abschnitt 3.2.1). Verschiedene kommerzielle Gemische von Protease-Inhibitoren wurden zur Vermeidung der Proteolyse von TRX-mSCF im Zellysat getestet. Der Abbau des Fusionsproteins konnte jedoch auf diesem Weg nicht verhindert werden. Auf Basis dieser Ergebnisse können Serin-, Cystein-, Metallo- und Aspartatproteasen als Ursache für den beobachteten Abbau ausgeschlossen werden. Ebenfalls auszuschließen sind auf Grund des verwendeten *E. coli*-Stamms BL21(DE3) die Proteasen *lon*- und *ompT* (siehe Abschnitt 3.2.1).

Da das His-getaggte Proteinfragment von dem Fusionsprotein über eine IMAC-Aufreinigung nicht getrennt werden konnte, wurde in der weiteren Prozessierung von TRX-mSCF das Gemisch der beiden Proteine verwendet.

3.5 Spaltung des Fusionsproteins

3.5.1 Verdau mit *AcTEV*TM-Protease

Zur Freisetzung des Zielproteins mSCF wurde im nächsten Prozessschritt das aufgereinigte Fusionsprotein gespalten. Dabei sollten sowohl der Löslichkeits-*Tag* TRX als auch der His-*Tag* in einem gemeinsamen Fragment, im Folgenden als TRX-His bezeichnet, von mSCF getrennt werden (siehe Abschnitt 3.2.1).

Die definierte Spaltung von TRX-mSCF erfolgte mit Hilfe von TEV-Protease. Dieses zu den Cystein-Proteinasen gehörende Enzym spaltet ein geeignetes Substrat hochspezifisch und wird daher häufig in der Prozessierung von Fusionsproteinen eingesetzt [118, 177]. Die Erkennungssequenz der TEV-Protease innerhalb des Fusionsproteins TRX-mSCF umfasst eine Abfolge aus sieben Aminosäuren (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly), die N-terminal zur Aminosäuresequenz von mSCF liegt. Die Spaltung erfolgt zwischen dem Glutamin- und dem Glycin-Rest, sodass durch die Hydrolyse dieser Peptidbindung ein zusätzlicher neutraler Glycin-Rest am N-Terminus von mSCF verbleibt [159].

TEV-Protease ist in einem breiten Bereich chemischer Bedingungen stabil und aktiv, sodass das Enzym u.a. mit verschiedenen Puffern und Ionenstärken verwendet werden kann [178, 179]. pH-Werte zwischen pH = 6,0 und pH = 8,5 werden ebenso wie zahlreiche Protease-Inhibitoren toleriert [179, 180]. Das Enzym zeigt seine spezifische Aktivität bei Temperaturen zwischen 4 °C und 34 °C, wobei die optimale Temperatur bei 30 °C liegt [178]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die rekombinante *AcTEV*TM-Protease eingesetzt. *AcTEV*TM-Protease ist hochaktiv, stabiler als natürliche TEV-Protease und für Aufreinigungszwecke mit einem His-*Tag* ausgestattet⁷.

⁷ Herstellerangaben (Invitrogen, Darmstadt)

Zur Spaltung des Fusionsproteins mit *AcTEV*TM-Protease wurde der Verdau auf Basis des Herstellerprotokolls⁸ durchgeführt. Abweichend zu dieser Vorschrift wurde jedoch auf den empfohlenen Zusatz von Dithiothreitol (DTT) verzichtet, um die Reduktion der essentiellen, intramolekularen Disulfidbrücken von mSCF zu vermeiden (siehe Abschnitt 2.1.2). Als Substrat wurden die vereinigten Elutionsfraktionen der IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF eingesetzt (siehe Abschnitt 3.4.2). Für die Berechnung der benötigten Enzymmenge wurde die Konzentration von TRX-mSCF densitometrisch bestimmt (siehe Anhang, Abschnitt 5.12).

Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für den Verdau des Fusionsproteins mit *AcTEV*TM-Protease wurden Parameter wie die Temperatur und das Enzym/Substratverhältnis variiert. Für die Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Spaltung wurde das Experiment bei 4 °C, bei 21 °C und bei 30 °C durchgeführt. Eine Beschleunigung des Reaktionsablaufs auf Grund erhöhter Proteaseaktivität bei steigenden Temperaturen konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Vielmehr stellte sich mit höheren Temperaturen eine beschleunigte Degradation sämtlicher Proteine ein. Der Verdau des Fusionsproteins bei 4 °C lieferte daher die besten Ergebnisse.

Zur Ermittlung der benötigten Menge an *AcTEV*TM-Protease für den Verdau von TRX-mSCF wurden ausgehend von den Herstellerangaben⁸ verschiedene Verhältnisse von Fusionsprotein zu Enzym getestet. Der Einsatz von überschüssiger Protease (zweifache bzw. dreifache Menge bezüglich der Herstellerangaben) zeigte keine Verbesserung im Vergleich zur empfohlenen, einfachen Menge an *AcTEV*TM-Protease (Daten nicht gezeigt). Hingegen konnte durch Verwendung einer, auf die Herstellerangaben bezogenen halbierten Menge ein vergleichbares Ergebnis wie bei der empfohlenen Konzentration erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Zur Senkung der Prozesskosten kann daher mit der geringeren Menge an *AcTEV*TM-Protease gearbeitet werden.

Das Ergebnis der optimierten Bedingungen ist in Abbildung 3.19 dargestellt; das genaue Versuchsprotokoll ist im Anhang beschrieben (siehe Abschnitt 5.11). Der zeitabhängige Verlauf der Spaltung von TRX-mSCF wurde über eine SDS-PAGE-Analyse überwacht; besonders engmaschig wurden die Proben zu Beginn der Reaktion untersucht.

⁸ Herstellerangaben (Invitrogen, Darmstadt)

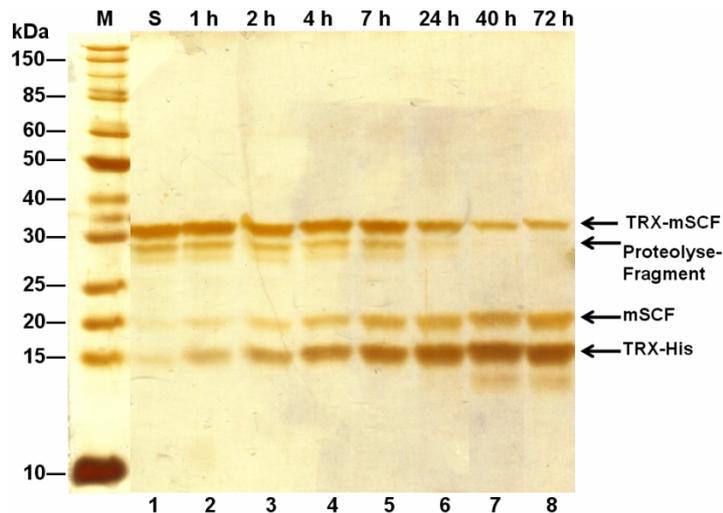


Abbildung 3.19 Zeitlicher Verlauf der Fusionsproteinspaltung mit *AcTEV*TM-Protease bei 4 °C. Untersucht wurden eine Probe vor dem Verdau (Spur 1), sowie Proben 1, 2, 4, 7, 24, 40 und 72 Stunden nach Zugabe der *AcTEV*TM-Protease (Spuren 2-8). Als Substrat wurde TRX-mSCF im Gemisch mit dessen Proteolyse-Fragment (etwa 29 kDa) eingesetzt. Die verwendete Menge an *AcTEV*TM-Protease entsprach dem halben Wert der Herstellerempfehlung. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; Silberfärbung). M, Protein-Marker (10-200 kDa); S, Substrat; h, Stunde(n).

In Abbildung 3.19 kann die mit der Zeit fortschreitende Umsetzung des Substrats gut verfolgt werden. Die Intensität der Fusionsproteinbande der Ausgangsprobe (Spur 1) nimmt im Verlauf des Experiments deutlich ab. Korrelierend zu der zunehmend schwächer erscheinenden Bande des Substrats nimmt die Intensität der beiden neuen Proteinbanden, die erst nach Zugabe der *AcTEV*TM-Protease zu erkennen sind, zu (ab Spur 2). Die Größe der zugehörigen Proteine entspricht denen der erwarteten Produkte aus der Spaltung von TRX-mSCF (siehe Abschnitt 3.2.1). Folglich kann die Bande bei 18 kDa dem Zielprotein mSCF zugeordnet werden. Das Fragment aus TRX und His-Tag (TRX-His) besitzt eine Größe von etwa 14 kDa und kann ebenfalls an passender Position auf dem Gel lokalisiert werden. Die *AcTEV*TM-Protease (29 kDa) [182] konnte auf Grund ihrer geringen Konzentration trotz der hohen Empfindlichkeit der Silberfärbung nicht über die durchgeführte SDS-PAGE-Analyse detektiert werden.

Der zeitliche Verlauf der Reaktion zeigt, dass die Spaltung des Substrats (Spur 1) nicht vollständig ablief, sondern nach etwa 40 Stunden zum Erliegen kam (Spuren 7-8). Diese Beobachtung wurde auch durch eine Verlängerung der Reaktionszeit auf

bis zu sechs Tage bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die anfänglich hohe Reaktionsgeschwindigkeit (Spuren 2-5) sank vermutlich auf Grund der reduzierten Substratkonzentration im Verlauf des Experiments ab, bis nach 40 Stunden kein Reaktionsfortschritt mehr detektiert werden konnte (Spuren 7-8).

Bei Betrachtung der zeitabhängigen Veränderung der Substratbanden fällt auf, dass sowohl die Menge des Fusionsproteins (32 kDa) als auch die des Proteolyse-Fragments von TRX-mSCF (etwa 29 kDa) mit fortschreitender Reaktionsdauer abnimmt. Im Gegensatz zum Fusionsprotein ist dessen Proteolyse-Fragment nach 24 Stunden (Spur 6) nicht mehr zu detektieren gewesen. Da dieses etwa 29 kDa große Protein auf Grund seiner Größe die vollständige TEV-Erkennungssequenz beinhaltet (siehe Abschnitt 3.2.1), wurde es ebenfalls von der *AcTEV*TM-Protease gespalten. Die in Spuren 7 und 8 schwach zu erkennende Bande kann einem aus diesem Verdau resultierenden Protein mit einer Größe von etwa 12-13 kDa zugeordnet werden (siehe dazu auch Diskussion in Abschnitt 3.6).

3.5.2 Fazit des Kapitels

Der Verdau des Fusionsproteins mit *AcTEV*TM-Protease führte zur gewünschten Spaltung von TRX-mSCF und damit zur Freisetzung des Zielproteins mSCF. Als Substrat für die enzymatische Reaktion wurden die Elutionsfraktionen der vorangegangenen IMAC-Aufreinigung, die sowohl das Fusionsprotein als auch dessen Proteolyse-Fragment enthielten, verwendet.

Ein vollständiger Verdau des Fusionsproteins konnte mit den untersuchten Bedingungen nicht erreicht werden. Da die Reaktion nach etwa 40 Stunden zum Erliegen kam, wurden die besten Ergebnisse nach dieser Reaktionszeit erzielt. Sowohl eine Verlängerung der Reaktionsdauer als auch der Einsatz erhöhter Mengen an *AcTEV*TM-Protease führten nicht zu einem vollständigen Verdau.

Infolge der Elutionsbedingungen der IMAC wurde das Substrat für den Verdau in einem imidazolhaltigen Puffer (siehe Abschnitt 3.4.2) eingesetzt. Da TEV-Protease allgemein eine hohe Toleranz gegenüber verschiedenen Pufferbedingungen einschließlich Imidazol zeigt [179], scheint eine Beeinflussung des Reaktionsverlaufs auf Grund der gegebenen Pufferzusammensetzung daher unwahrscheinlich.

Die Abspaltung des Löslichkeits-*Tags* ist oft der kritische Schritt in der Aufarbeitung von Fusionsproteinen (siehe Abschnitt 2.2.2). Die Löslichkeit des Zielproteins mSCF blieb jedoch auch nach der Abspaltung von TRX erhalten. Diese essentielle Beobachtung ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Herstellung von löslichem, bioaktivem mSCF in *E. coli*.

3.6 Isolierung von mSCF

3.6.1 IMAC

Zur Isolierung des Zielproteins mSCF musste eine Aufarbeitung aus dem Gemisch des proteolytischen Verdau (siehe Abschnitt 3.5) erfolgen. Dieser Prozessschritt wurde ebenfalls mit Hilfe einer IMAC realisiert. Durch den Verdau von TRX-mSCF wurde das Fusionsprotein in ein TRX-Fragment und mSCF gespalten; der His-*Tag* von TRX-mSCF befindet sich nach dieser Reaktion am TRX-Fragment (TRX-His). Letzteres sollte daher, ebenso wie die His-getaggte *AcTEV*TM-Protease und das unverdaute Substrat aus dem Protease-Verdau (Abbildung 3.19, Spur 8) bei einer IMAC an die Affinitätsmatrix binden. Das Target mSCF besitzt als einziges Protein des Gemisches keinen His-*Tag* und sollte daher bei einer IMAC-Aufreinigung keine spezifischen Wechselwirkungen mit dem immobilisierten Metall eingehen können.

Auf Grund der Pufferzusammensetzung des Proteingemisches aus dem Verdau musste vor der Durchführung einer erneuten IMAC ein Pufferaustausch stattfinden. Sowohl Imidazol, das aus der Elution der ersten IMAC zur Aufreinigung von TRX-mSCF stammt (siehe Abschnitt 3.4), als auch EDTA, welches im Puffer der *AcTEV*TM-Protease enthalten ist⁹, mussten entfernt werden. EDTA ist ein chelatisierendes Agens und wird, wie auch Imidazol, zur Elution His-getaggtter Proteine im Rahmen einer IMAC eingesetzt [176]. Folglich würden sich beide genannten Substanzen im Puffer des aufzutrennenden Gemisches nachteilig auf die gewünschte Proteinseparation auswirken. Der erforderliche Pufferwechsel wurde mittels Dialyse gegen PBS-Puffer durchgeführt (siehe Anhang, Abschnitt 5.13.1).

⁹ Herstellerangaben (Invitrogen, Darmstadt)

Wie bereits in Kapitel 3.4 vorgestellt, wurden Membranadsorber-Einheiten (*Vivawell 8-Strips* und *Sartobind™ MA IDA 75*) zur Durchführung der IMAC verwendet. Analog zur Entwicklung des Protokolls der IMAC-Aufreinigung des Fusionsproteins TRX-mSCF wurden zunächst im Analysenmaßstab (*Vivawell 8-Strips*) geeignete Bedingungen zur Separation des Zielproteins mSCF getestet (Daten nicht gezeigt). Die Funktionalisierung der *Sartobind™*-Membran erfolgte mit Zn^{2+} ; die grundsätzlichen Schritte zur Realisierung der Affinitätschromatographie wurden bereits in Abschnitt 3.4 beschrieben.

Da sich die für die *Vivawell 8-Strips* ermittelten Bedingungen ohne Änderung der Ergebnisse direkt auf den Labormaßstab (*Sartobind™ MA IDA 75*) an der FPLC-Anlage übertragen ließen, wurden im Folgenden nur die Ergebnisse der Aufreinigung von mSCF mittels FPLC vorgestellt und diskutiert. Die Analyse der jeweiligen Fraktionen der IMAC-Aufreinigung erfolgte durch eine SDS-PAGE.

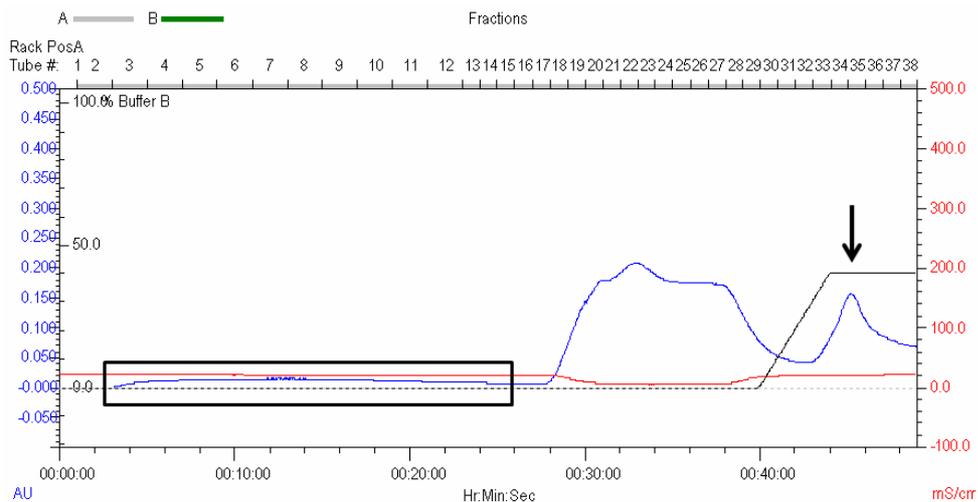


Abbildung 3.20 Chromatogramm der IMAC-Aufreinigung von mSCF mittels FPLC-Anlage. Gezeigt sind die Verläufe der Leitfähigkeit [mS/cm] und der UV-Absorption bei 280 nm [AU]. Das Signal von mSCF im Durchlauf ist durch eine Kastenumrandung hervorgehoben. Der Pfeil kennzeichnet den Elutionspeak des His-getaggten TRX-Fragments; die schwarze Linie deutet die Elutionsstrategie an (Gradientenelution gefolgt von isokratischer Elution). Die SDS-PAGE-Analyse der Waschfraktionen (Fraktionen 18-31) zeigte trotz der hohen UV-Absorption nur geringe Mengen an detektierbaren Proteinen (exemplarisch: Fraktionen 20 und 27 siehe Abbildung 3.21).

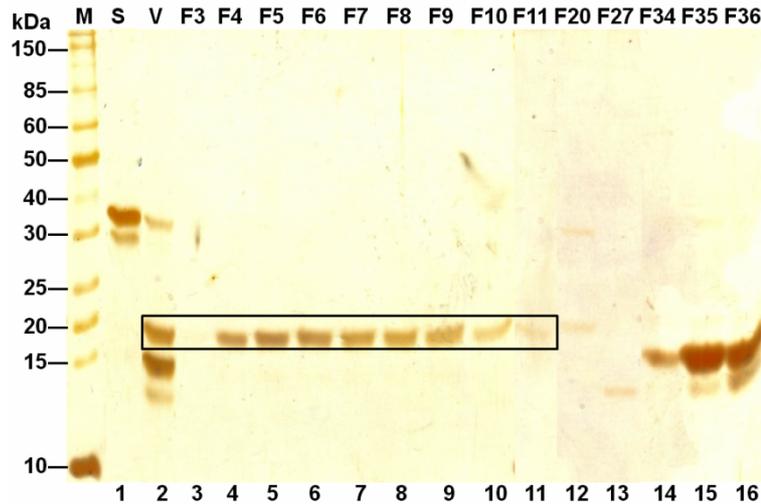


Abbildung 3.21 Ergebnis der IMAC-Aufreinigung von mSCF mittels FPLC-Anlage. Gezeigt sind Proben des Substrats für den Verdau des Fusionsproteins (Spur 1), die Proteinmischung nach 40-stündigem Verdau (Spur 2), die Durchlaufaktionen (Spuren 3-11), sowie die Waschaktionen (Spuren 12-13) und die Elutionsaktionen (Spuren 14-16) der IMAC-Aufreinigung. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; Silberfärbung). M, Protein-Marker (10-200 kDa); S, Substrat; V, Verdau (Ausgangssprobe für IMAC); F, Fraktion. Die Nummern der Fraktionen beziehen sich auf jene des zugehörigen Chromatogramms aus Abbildung 3.20.

In Abbildung 3.20 ist das Chromatogramm und in Abbildung 3.21 die zugehörige SDS-PAGE-Analyse der IMAC-Aufreinigung von mSCF dargestellt. Wie erwartet wurde mSCF (18 kDa) auf Grund des fehlenden His-Tags als einziges Protein des Ausgangsgemisches nicht an die Affinitätsmembran gebunden. Obwohl sich das Target-Protein mSCF im Durchlauf befand (Abbildung 3.21, Spuren 4-10), wurde zur Wiederfindung der übrigen Proteine des Ausgangsgemisches eine Elution durchgeführt. Diese erfolgte durch verschiedene Konzentrationen an Imidazol in einem Basis-Elutionspuffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 100 mmol/L NaCl). Nach einem Waschschrift (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, 40 mmol/L Imidazol; Abbildung 3.21, Spuren 12-13) erfolgte eine Elution bei erhöhter Imidazolkonzentration im Basis-Elutionspuffer (linearer Gradient von 150 mmol/L auf 250 mmol/L Imidazol; isokratische Elution mit 250 mmol/L Imidazol; Abbildung 3.21, Spuren 14-16). Das genaue Versuchsprotokoll zur Durchführung dieser IMAC-Aufreinigung ist im Anhang beschrieben (siehe Abschnitt 5.13.2).

Die His-getaggtten Proteine konnten an die *Sartobind*TM-Membran gebunden und durch geeignete Bedingungen wieder eluiert werden (Abbildung 3.21, Spuren 12-16). Spur 12 zeigt eine schwache Proteinbande des ungespaltenen TRX-mSCFs (32 kDa) aus dem *AcTEV*TM-Verdau; Spuren 14-16 Banden des TRX-His-Proteins (etwa 14 kDa). Zusätzlich ist in den Spuren 13, 15 und 16 die Elution eines weiteren Proteins aus der Ausgangsprobe für die IMAC-Aufreinigung (Spur 2) zu sehen. Wie schon in Abschnitt 3.5 postuliert, wird dieses Protein einem Spaltprodukt aus dem Verdau des etwa 29 kDa großen Proteolyse-Fragments des Fusionsproteins TRX-mSCF zugeordnet.

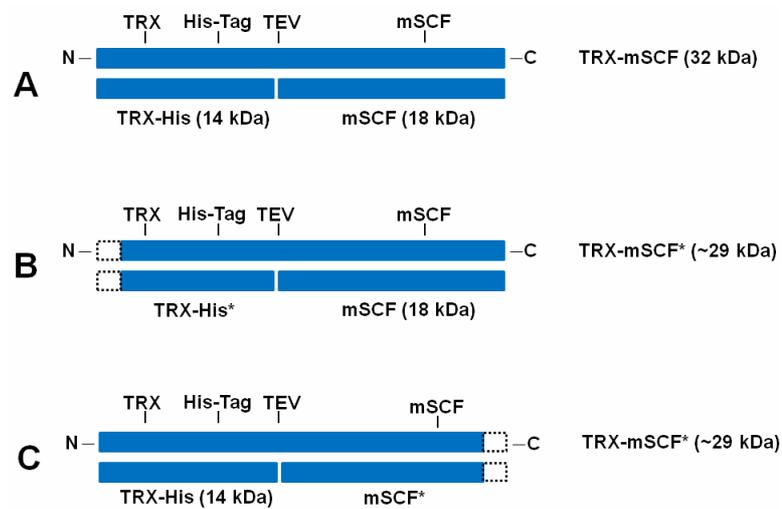


Abbildung 3.22 Schematische Darstellung der möglichen Spaltungen durch *AcTEV*TM-Protease. (A) Spaltung des intakten Fusionsproteins TRX-mSCF. (B) Spaltung des etwa 29 kDa großen Proteolyse-Fragments von TRX-mSCF (TRX-mSCF*), das am N-Terminus beschädigt ist. (C) Spaltung des etwa 29 kDa großen Proteolyse-Fragments von TRX-mSCF (TRX-mSCF*), das am C-Terminus beschädigt ist. Die jeweiligen beschädigten und dadurch verkürzten Proteine wurden in ihrer Bezeichnung durch einen Stern (*) markiert. Die fehlenden Proteinteile sind durch einen gestrichelten Kasten angedeutet. TEV, Erkennungssequenz der TEV-Protease.

In Abbildung 3.22 sind die beiden möglichen Varianten zur Spaltung des Proteolyse-Fragments von TRX-mSCF durch *AcTEV*TM-Protease schematisch dargestellt. Bei einer Beschädigung am TRX-Teil des Fusionsproteins (N-Terminus), verursacht durch dessen proteolytischen Abbau im Zellysate (siehe Abschnitt 3.4.3), würde der Verdau zu einem intakten mSCF und einem His-getaggtten Fragment von TRX-His, im Folgenden als TRX-His* bezeichnet, führen (Abbildung 3.22 B). Aus

einer möglichen Beschädigung des Fusionsproteins am mSCF-Teil (C-Terminus) würden hingegen ein unbeschädigtes TRX-His-Protein und eine verkürzte Version von mSCF (mSCF*) resultieren (Abbildung 3.22 C). Experimentell konnte beim Verdau des Proteolyse-Fragments von TRX-mSCF stets ein etwa 12-13 kDa großes Protein detektiert werden, wie auch in Abbildung 3.19, Spuren 7-8 und Abbildung 3.21, Spur 2 zu erkennen ist. Auf Grund der Ergebnisse der IMAC-Aufreinigung (Abbildung 3.21) kann dieses Protein dem His-getaggen TRX-His* zugeordnet werden. In Analogie zum unbeschädigten TRX-His konnte TRX-His* ebenfalls mittels IMAC-Aufreinigung von mSCF abgetrennt werden (Abbildung 3.21, Spuren 13, 15 und 16). Als zweites Spaltprodukt aus dem Verdau des Proteolyse-Fragments von TRX-mSCF (Abbildung 3.22 B) geht das Zielprotein mSCF hervor. Die Freisetzung des Zytokins erfolgte folglich sowohl durch den Verdau des unbeschädigten Fusionsproteins, als auch durch den Verdau des Proteolyse-Fragments von TRX-mSCF (Abbildung 3.21, Spuren 4-10). Dementsprechend erfolgte durch die nicht zu vermeidende Proteolyse des Fusionsproteins (siehe Abschnitt 3.4.3) letztlich kein Verlust an mSCF.

Die mögliche Spaltung des Proteolyse-Fragments von TRX-mSCF, die in Abbildung 3.22 C dargestellt ist, erscheint vor dem Hintergrund der vorliegenden Daten unwahrscheinlich. In diesem Fall hätte kein zusätzliches, sich bei der IMAC-Aufreinigung analog zu TRX-His verhaltendes Protein detektiert werden können.

Wie bereits in Abschnitt 3.5 angesprochen, konnte die *AcTEV*TM-Protease aus dem Verdau des Fusionsproteins trotz der hohen Sensitivität der Silber-Färbung nicht über eine SDS-PAGE detektiert werden. Da die Protease ebenfalls einen His-Tag besitzt¹⁰, wird jedoch angenommen, dass das Protein wie auch die anderen His-getaggen Proteine mittels der durchgeführten IMAC von mSCF abgetrennt werden konnte.

¹⁰ Herstellerangaben (Invitrogen, Darmstadt)

3.6.2 Qualitative und quantitative Analyse

Das durch die IMAC in hoher Reinheit isolierte Protein (Abbildung 3.21, Spuren 4-10) wurde mittels eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) analysiert. Durch die Verwendung eines mSCF-spezifischen Antikörpers konnte die Identität des Analyten eindeutig bestätigt werden. Über eine Kalibration des im ELISA-Kit enthaltenen Standards für murines SCF wurde die Konzentration des Zytokins in den vereinigten Durchlaufaktionen der IMAC-Aufreinigung (Abbildung 3.21, Spuren 4-10) bestimmt.

Zur weiteren Charakterisierung von mSCF wurde der Gehalt an Endotoxinen mittels LAL-Test zu einem Wert $<14 \text{ EU}/\mu\text{g}$ bestimmt. Endotoxine sind Lipopolysaccharide, die u.a. in der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien wie *E. coli* vorkommen und bei Überschreitung zellspezifischer Konzentrationen toxisch auf eukaryontische Zellen wirken können [181].

Tabelle 3.2 Übersicht der Ausbeute an mSCF in den verschiedenen Prozessschritten. Für die Produktion und die 1.Aufreinigung sind jeweils die Anteile von mSCF am Fusionsprotein angegeben (56 %).

Prozessschritt	(Anteil) lösliches mSCF [mg]	Ausbeute (%)
Produktion	35	100
1.Aufreinigung	10	29
2.Aufreinigung	2,5	7

Die Ausbeute an mSCF aus dem Gesamtprozess konnte über die ELISA-Daten zu 2,5 mg pro Liter bakterieller Kulturbrühe ermittelt werden. Für die Zwischenschritte des Prozesses wurden 63 mg lösliches TRX-mSCF im Zellysate sowie 18 mg TRX-mSCF nach der Aufreinigung des Fusionsproteins (1.IMAC) berechnet. Die Angaben beziehen sich ebenfalls auf einen Liter Kulturbrühe. Zur Bestimmung der jeweiligen Konzentrationen von TRX-mSCF wurden densitometrische Analysen durchgeführt (siehe Anhang, Abschnitt 5.12). Bei den Ausbeuteberechnungen muss jedoch beachtet werden, dass sich die Masse des Fusionsproteins aus den Einzelmassen von TRX (14 kDa) und mSCF (18 kDa) zusammensetzt. Damit ergibt sich ein mSCF-Anteil von etwa 56 % an der Gesamtmasse von TRX-mSCF. Folglich können aus

63 mg Fusionsprotein theoretisch maximal 35 mg mSCF gewonnen werden; bei 18 mg TRX-mSCF sind es entsprechend 10 mg. Desweiteren müssen beim Vergleich der berechneten Ausbeuten an TRX-mSCF und der Endausbeute von mSCF die verschiedenen Analysemethoden berücksichtigt werden. Die Ergebnisse densitometrischer Auswertungen sind auf Grund der deutlich unspezifischeren Messmethode mit potentiell größeren Fehlern behaftet als Ergebnisse, die auf Basis eines ELISAs gewonnen wurden.

3.6.3 Fazit des Kapitels

In einem abschließenden Aufreinigungsschritt (*Polishing*) konnte das Zielprotein mSCF erfolgreich mit Hilfe einer IMAC separiert werden. Zur Vorbereitung wurde dafür zunächst eine Dialyse für den erforderlichen Pufferaustausch durchgeführt. Die eingesetzten Membranadsorber-Einheiten ermöglichten im Rahmen der IMAC eine vollständige Abtrennung der His-getaggten Kontaminanten aus dem vorangegangenen *AcTEV*TM-Protease-Verdau. Die zunächst im Analysenmaßstab (*Vivawell 8-Strips*) durchgeführte IMAC konnte direkt auf den Labormaßstab an einer FPLC-Anlage (*Sartobind*TM MA IDA 75) übertragen werden. Wie erwartet wurde mSCF als einziges Protein in den Durchlauf-Fractionen der IMAC detektiert. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse der IMAC-Aufreinigung konnte gezeigt werden, dass aus dem Verdau des Proteolyse-Fragments von TRX-mSCF ein weiteres His-getaggtes Protein hervorgegangen ist. Das Zielprotein mSCF wurde folglich als zweites Spaltprodukt dieses Verdau freigesetzt. Die Proteolyse des Fusionsproteins TRX-mSCF, die mit den untersuchten Bedingungen nicht verhindert werden konnte, führte somit letztlich zu keinem Verlust von mSCF.

Die Reinheit des isolierten Zytokins wurde mittels SDS-PAGE-Analyse und Silberfärbung gezeigt. Eine qualitative und quantitative Analyse erfolgte durch einen für mSCF spezifischen ELISA und führte damit zur eindeutigen Identifikation des Zytokins. Die Gesamtausbeute an mSCF aus dem Gesamtprozess wurde zu 2,5 mg pro Liter bakterieller Kulturbrühe (Schüttelkolben-Kultivierung) bestimmt.

3.7 Biologische Testung

3.7.1 M-07e-Zellen als Testsystem

Zur Beurteilung der biologischen Aktivität des in *E. coli* löslich produzierten mSCF wurde das Zytokin mit Hilfe eines geeigneten biologischen Systems untersucht. Auf Grund der Kenntnisse der physiologischen Funktionen von SCF *in vivo* (siehe Abschnitt 2.1.1) sind neben einer Reihe weiterer potentieller Zelltypen auch megakaryozytische Zellen als *in vitro*-Test-System zweckmäßig. Megakaryozyten werden aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet und sind die Vorläufer von Thrombozyten [182].

Die humane megakaryozytische Zelllinie M-07e hat sich bereits in der Testung der biologischen Aktivität von SCF bewährt [115, 183-185]. Die Proliferation von M-07e-Zellen steht in starker Abhängigkeit von bestimmten Zytokinen. Sowohl das Zusammenspiel verschiedener Zytokin-Cocktails [184] als auch die Gegenwart einzelner Zytokine, einschließlich SCF [185], bewirken die Proliferation dieser Megakaryozyten. Die Signaltransduktion erfolgt dabei durch die Bindung der Wachstumsfaktoren an ihre entsprechenden Rezeptoren [115]; im Fall von SCF erfolgt die Bindung an *c-Kit* (siehe Abschnitt 2.1.3).

Da murines SCF eine kreuzspezifische Aktivität besitzt (siehe Abschnitt 2.1.5), ist die humane M-07e-Zelllinie sowohl zur Testung von humanem als auch von murinem SCF geeignet. Zur Überprüfung der biologischen Aktivität des produzierten mSCF aus *E. coli* wurden daher M-07e-Zellen als Test-System eingesetzt. Das Zytokin wurde zunächst über einen Kurzzeit-Proliferations-Assay untersucht und der EC₅₀-Wert bestimmt. Nachfolgend wurde in einem weiteren Experiment die Langzeit-Proliferation der M-07e-Zellen in Gegenwart von mSCF eruiert.

3.7.2 Kurzzeit-Proliferations-Assay und EC₅₀-Bestimmung

Kurzzeit-Proliferation

Im ersten Experiment zur Überprüfung der biologischen Aktivität von mSCF wurde die Kurzzeit-Proliferation der M-07e-Zellen in Gegenwart des Zytokins untersucht. Als Zell-Proliferationsassay wurde der *CellTiter96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* verwendet. Dieser Assay basiert auf einer kolorimetrischen Methode zur Detektion metabolisch aktiver Zellen. Im Gegensatz zum MTT-Assay [186] ist der entstehende farbige Komplex löslich¹¹, sodass *CellTiter96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* auch für Suspensionszellen wie M-07e eingesetzt werden kann (siehe Anhang, Abschnitt 5.14.2).

Als Standard wurde kommerziell erhältliches murines SCF, im Folgenden als mSCF_{comm} bezeichnet, verwendet. Das Zytokin wurde ebenfalls aus rekombinanten *E. coli* gewonnen und ist folglich nicht glykosyliert¹². Parallel zur Testung von mSCF wurde auch das ungespaltene Fusionsprotein TRX-mSCF (im Gemisch mit dessen Proteolyse-Fragment, siehe Abschnitt 3.4.3) auf seine biologische Aktivität untersucht. Die Durchführung des Kurzzeit-Proliferations-Assays erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll¹¹, wobei die M-07e-Zellen mit identischen Konzentrationen der jeweiligen Zytokine (mSCF, TRX-mSCF und mSCF_{comm}) über einen Zeitraum von 36 Stunden inkubiert wurden (genaues Versuchsprotokoll siehe Anhang, Abschnitt 5.14.2).

Die Konzentrationsbestimmung der Zytokin-Stammlösungen, auf dessen Basis die Berechnung der einzusetzenden Mengen für diesen Assay erfolgte, wurde über unterschiedliche Methoden erreicht. mSCF und mSCF_{comm} wurden parallel in einem für murines SCF spezifischen ELISA (siehe Anhang, Abschnitt 5.13.3) untersucht. Die quantitative Analyse des Fusionsproteins musste über eine weniger sensitive Methode erfolgen, da kein geeigneter ELISA für TRX-mSCF verfügbar ist. Um die Konzentration des Fusionsproteins selektiv aus dem Gemisch mit dessen Proteolyse-Fragment zu bestimmen, wurde ein mit *Coomassie Blue* gefärbtes Polyacrylamid-Gel eine SDS-PAGE densitometrisch ausgewertet (siehe Anhang, Abschnitt 5.12).

¹¹ Herstellerangaben (Promega, Mannheim)

¹² Herstellerangaben (PeproTech, Hamburg)

Die Ergebnisse der Kurzzeit-Proliferation der M-07e-Zellen unter Verwendung von *CellTiter96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Als Maß für die Anzahl der metabolisch aktiven, vitalen Zellen und damit der Proliferation ist die gemessene Absorption der verschiedenen Proben gezeigt.

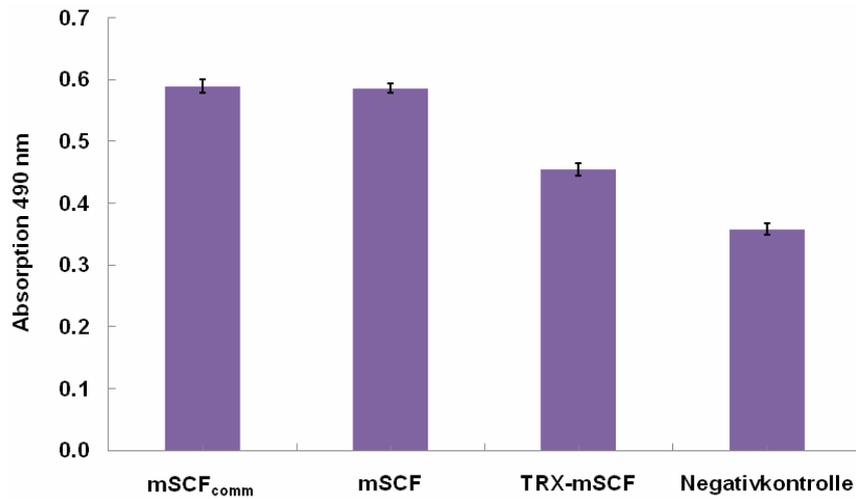


Abbildung 3.23 Ergebnis des Kurzzeit-Proliferations-Assays zur biologischen Testung von mSCF und TRX-mSCF. Die Proliferation der M-07e-Zellen wurde sowohl in Gegenwart der Zytokine als auch in einer Negativkontrolle ohne Zytokine untersucht.

Abbildung 3.23 zeigt durch den Vergleich mit der Negativkontrolle, dass alle getesteten Zytokine eine gesteigerte Proliferation der M-07e-Zellen bewirken konnten. Die Ergebnisse von mSCF und mSCF_{comm} belegen eine vergleichbare biologische Aktivität des löslich in *E. coli* hergestellten Zytokins in Relation zur kommerziellen Kontrolle. Obwohl auf Grundlage der erreichten Absorptionen nur etwa halb so aktiv wie mSCF, zeigte das Fusionsprotein TRX-mSCF dennoch eine bemerkenswerte Auswirkung auf die Proliferation der megakaryozytischen Zellen. Beim Vergleich von mSCF und TRX-mSCF ist jedoch auf die verschiedenen Methoden zur Konzentrationsbestimmung der beiden Proteine (s.o.) und den daraus möglicherweise resultierenden Fehlern bei der Berechnung der benötigten Zytokinmengen für diesen Assay hinzuweisen. Der potentielle Einfluss des Proteolyse-Fragments von TRX-mSCF auf die Zellproliferation konnte nicht evaluiert werden, da eine Separation dieses Proteins von TRX-mSCF nicht erreicht werden konnte (siehe Abschnitt 3.4.3).

Eine Wiederholung des Kurzzeit-Proliferations-Assays für mSCF und mSCF_{comm} nach einer dreimonatigen Lagerung des hergestellten Zytokins (42 µg/mL in PBS-Puffer, -20 °C, siehe Anhang, Abschnitt 5.13.2) ergab eine Reproduktion der in Abbildung 3.23 gezeigten Ergebnisse. Damit konnte die Stabilität von löslich in *E. coli* hergestelltem mSCF für einen Zeitraum von mindestens drei Monaten nach der Herstellung bestätigt werden.

EC₅₀-Bestimmung

Als Maß für die biologische Aktivität des in *E. coli* löslich produzierten mSCF wurde der EC₅₀-Wert des Zytokins im Vergleich zu mSCF_{comm} bestimmt. Der EC₅₀-Wert ist eine spezifische Größe, die jene Dosis einer Substanz beschreibt, mit der eine halbmaximale Wirkung auf ein geeignetes Testsystem erzielt werden kann. Untersucht wurde in diesem Fall die Proliferation von M-07e-Zellen in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an mSCF bzw. mSCF_{comm}. Die Durchführung des Experiments erfolgte in Analogie zum Kurzzeit-Proliferations-Assay unter Verwendung von CellTiter96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (siehe Anhang, Abschnitt 5.14.3). Beide Zytokine, mSCF und mSCF_{comm}, wurden in Konzentrationen im Bereich von 20 ng/mL-1000 ng/mL eingesetzt. Die Berechnung der dafür benötigten Volumina an Zytokin-Stammlösung erfolgte auf Basis der ELISA-Ergebnisse (siehe Anhang, Abschnitt 5.13.3).

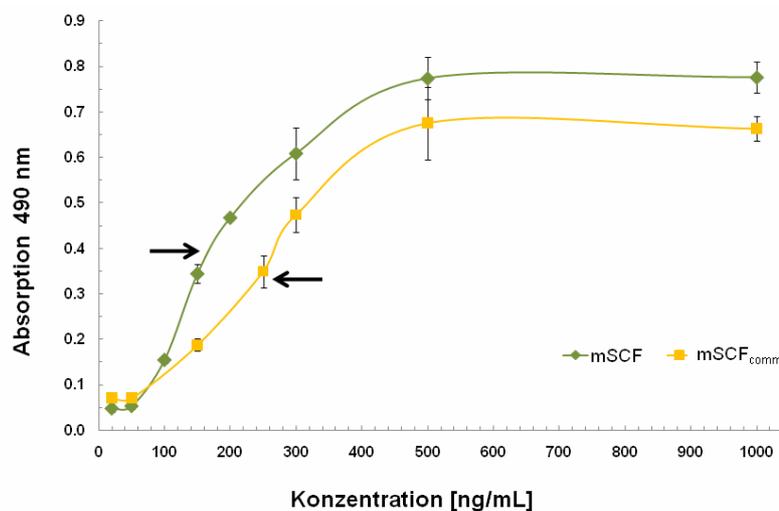


Abbildung 3.24 EC₅₀-Bestimmung von mSCF und mSCF_{comm} im Rahmen einer Kurzzeit-Proliferation von M-07e-Zellen. Die jeweiligen EC₅₀-Werte sind durch Pfeile markiert.

Abbildung 3.24 zeigt für beide Zytokine den typischen sigmoiden Verlauf einer sogenannten Dosis-Antwortkurve. Werden identische Konzentrationen von mSCF und mSCF_{comm} miteinander verglichen, so fällt auf, dass für mSCF eine stärkere Proliferation der Zellen (entspricht höheren Absorptionwerten) als für mSCF_{comm} erreicht werden konnte. Diese Beobachtung wurde auch durch die auf Basis der Messdaten berechneten EC₅₀-Werte bestätigt (siehe Anhang, Abschnitt 5.14.3). Das löslich in *E. coli* hergestellte mSCF besitzt mit einem EC₅₀-Wert von 168 ng/mL folglich eine höhere biologische Aktivität auf die M-07e-Zellen als mSCF_{comm} mit einem EC₅₀-Wert von 241 ng/mL.

3.7.3 Langzeit-Proliferations-Assay

Zellzahl-Bestimmung

Um die biologische Aktivität von mSCF im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle mSCF_{comm} weiter zu charakterisieren, wurde ein Langzeit-Proliferations-Assay durchgeführt. Über einen Zeitraum von 30 Tagen wurde die Proliferation der M-07e-Zellen in Gegenwart von mSCF bzw. mSCF_{comm} beobachtet. Beide Zytokine wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und mit einer Negativkontrolle ohne Zytokine verglichen. Die Proliferation der Zellen in den jeweiligen Kulturen wurde alle zwei bis drei Tage mittels Zellzählungen am Mikroskop überwacht.

mSCF wurde in Konzentrationen von 417 ng/mL, 84 ng/mL und 42 ng/mL eingesetzt; für mSCF_{comm} wurden 520 ng/mL und 260 ng/mL verwendet. Die Berechnung der dafür jeweilig benötigten Mengen an Zytokin-Stammlösung erfolgte auf Basis der Konzentrationsbestimmungen via ELISA (siehe Anhang, Abschnitt 5.13.3). Auf Grund der geringen Halbwertszeit der Zytokine unter Zellkultur-Bedingungen (37 °C) wurden mSCF und mSCF_{comm} alle zwei bis drei Tage in den oben definierten Konzentrationen erneut zugegeben. Die Umsetzung der Kulturen in frisches Medium erfolgte in Abhängigkeit von den jeweilig erreichten Zelldichten ebenfalls alle zwei bis drei Tage, wobei die Neu-Ausplattierung der Zellen immer mit der gleichen Zelldichte erfolgte. Das Versuchsprotokoll ist im Anhang, siehe 5.14.4 beschrieben. Die Ergebnisse des Langzeit-Proliferations-Assays sind in Abbildung 3.25 gezeigt.

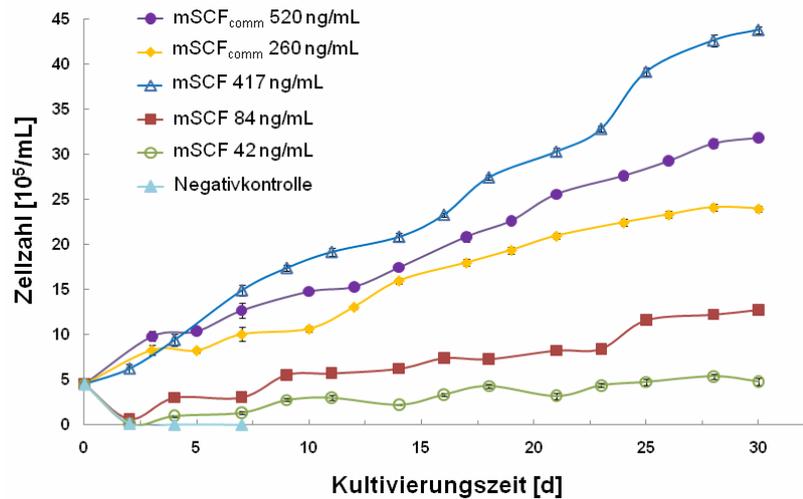


Abbildung 3.25 Ergebnis des Langzeit-Proliferations-Assays zur biologischen Testung von mSCF. Die Proliferation der M-07e-Zellen in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an mSCF bzw. mSCF_{comm} wurde anhand von Zellzahlbestimmungen überwacht. d, Tag(e).

Wie in Abbildung 3.25 zu erkennen ist, zeigten nach einer kurzen Adaptionsphase alle Kulturen mit Zytokin-Zusatz ein kontinuierliches Wachstum. Die starke Abhängigkeit der M-07e-Zellen vom untersuchten Wachstumsfaktor wird anhand der Negativkontrolle deutlich. Bereits nach zwei bis drei Tagen ohne Zytokin-Zusatz konnten in dieser Kultur nahezu keine lebenden Zellen mehr detektiert werden.

Am stärksten proliferierten die M-07e-Zellen bei einer Konzentration von 417 ng/mL des in *E. coli* löslich produzierten mSCF. Die Zellzahlen der Kultur mit 520 ng/mL mSCF_{comm} lagen trotz der höheren Konzentration an eingesetztem Zytokin darunter. Diese Beobachtung zeigt deutlich die höhere biologische Aktivität von mSCF im Vergleich zur kommerziellen Kontrolle. Bestätigt wurde dieses Ergebnis auch durch die bereits im Rahmen einer Kurzzeit-Proliferation bestimmten EC₅₀-Werte (siehe Abschnitt 3.7.2).

Alle weiteren Proliferations-Verläufe, die unter Verwendung beider Zytokine in den Kulturen erhalten wurden, zeigten die entsprechend erwarteten Ergebnisse. Je geringer der Gehalt des Zytokins im Medium war, desto schwächer wurde die Proliferation der M-07e-Zellen gefördert. Infolgedessen zeigten über den gesamten Verlauf des Experiments die Kulturen mit 84 ng/mL und 42 ng/mL mSCF den geringsten Zellzahlzuwachs.

Morphologie der M-07e-Zellen

Als weiteres Kriterium zur Beurteilung der biologischen Aktivität des löslich in *E. coli* hergestellten mSCF wurde die Zell-Morphologie der M-07e-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden nach 30 Tagen Zellen aus allen Kulturen des Langzeit-Proliferations-Assays entnommen. Die M-07e-Zellen wurden mittels Zytospin-Zentrifugation auf einem Objektträger immobilisiert und gemäß der Pappenheim-Methode (siehe Anhang, Abschnitt 5.14.5) angefärbt, um eine Kontrasterhöhung zu erzielen. Zellkerne erscheinen bei dieser Färbemethode bläulich-violett; das Zytoplasma wird blau angefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte durch ein hochauflösendes Mikroskop; eine Auswahl der erhaltenen Bilder ist in Abbildung 3.26 gezeigt.

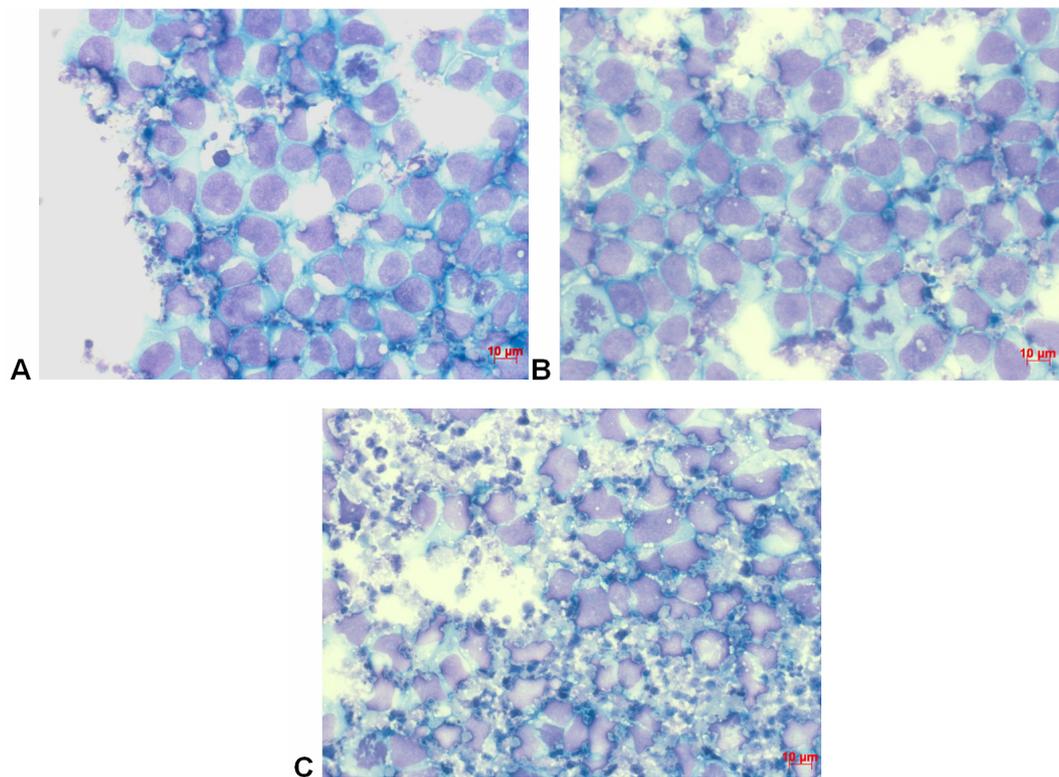


Abbildung 3.26 Zell-Morphologie der M-07e-Zellen nach der Langzeit-Proliferation. Die Zellen wurden mittels Pappenheim-Methode angefärbt. (A) 520 ng/mL mSCF_{comm}, (B) 417 ng/mL mSCF, (C) 42 ng/mL mSCF.

Die Morphologie der M-07e-Zellen nach der mehrwöchigen Kultivierung unter 417 ng/mL mSCF (Abbildung 3.26, B) entsprach der Morphologie jener Zellen, die

unter 520 ng/mL mSCF_{comm} (Abbildung 3.26, A) bzw. 260 ng/mL mSCF_{comm} (Daten nicht gezeigt) kultiviert wurden. Die Zellen besaßen eine reguläre Form mit intakter Zellmembran und zeigten verschiedene Mitosestadien. Diese Beobachtungen lassen auf vitale, proliferierende Zellen schließen.

Die in der Gegenwart deutlich geringer Zytokin-Konzentrationen kultivierten Megakaryozyten wiesen eine abweichende Morphologie auf (42 ng/mL mSCF: Abbildung 3.26 C; 84 ng/mL mSCF: Daten nicht gezeigt). Die Zellen zeigten eine unregelmäßige Form und Größe; zudem waren viele Zellbruchstücke zu erkennen. Im Gegensatz zu den in Abbildung 3.26 A und B gezeigten vitalen Zellpopulationen konnten nur vereinzelt Zellen im Mitosevorgang beobachtet werden. Wie sich bereits durch die geringen Zellzahlen im Langzeit-Proliferations-Assay (Abbildung 3.25) vermuten ließ, liegt bei 42 ng/mL mSCF und 84 ng/mL mSCF ein Zytokin-Mangel vor. Die Zellen konnten zwar überleben, nicht aber optimal wachsen und proliferieren.

3.7.4 Fazit des Kapitels

Die biologische Aktivität des löslich in *E. coli* hergestellten mSCF konnte durch eine Reihe verschiedener Experimente eindeutig belegt werden. Als Test-System wurde die stark zytokinabhängige megakaryozytische M-07e-Zelllinie gewählt. Die Proliferation der M-07e-Zellen in Gegenwart von mSCF konnte über verschiedene Zeiträume erfolgreich gezeigt werden. Im Vergleich mit dem kommerziellen Standard mSCF_{comm} zeigte mSCF sowohl durch Bestimmung der EC₅₀-Werte als auch über die Ergebnisse der Langzeit-Proliferation eine stärkere biologische Aktivität.

Für das Fusionsprotein TRX-mSCF konnte im Rahmen des Kurzzeit-Proliferations-Assays ebenfalls, wenn auch deutlich schwächer als für mSCF, eine biologische Aktivität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass mSCF innerhalb des Fusionsproteins zumindest eingeschränkt räumlich zugänglich ist und damit vom Rezeptor gebunden werden kann.

Durch die Ergebnisse der biologischen Testung konnte indirekt die korrekte, native Konformation von mSCF nachgewiesen werden. Der Fusionsansatz mit TRX führte folglich nicht nur zur Produktion eines löslichen, sondern auch biologisch wirksamen Zytokins. Trotz der reduzierenden Umgebung im Zytoplasma von *E. coli* (siehe Abschnitt 2.2.2) konnte mSCF durch die Fusionierung mit dem Löslichkeits-Tag in löslicher Form hergestellt werden. Die native, Disulfidbrücken beinhaltende räumliche Struktur des Zytokins (siehe Abschnitt 2.1.2) konnte mit großer Wahrscheinlichkeit jedoch erst während der Aufarbeitung eingenommen werden. Der Löslichkeits-Tag TRX hat vermutlich in Analogie zu „echten“ Chaperonen innerhalb der Zelle, also im Zytoplasma von *E. coli* dafür gesorgt, dass ungefaltete Intermediate von mSCF nicht zu *Inclusion Bodies* aggregieren.

Die beiden zusätzlichen nicht-nativen, neutralen Aminosäuren am N-Terminus von mSCF haben keinen Einfluss auf die biologische Aktivität des Zytokins gezeigt. Neben dem als Linker eingefügten Serin-Rests zwischen mSCF und der TEV-Erkennungssequenz (siehe Abschnitt 3.2.1) ist durch Spaltung des Fusionsproteins mit *AcTEV*TM-Protease zusätzlich ein Glycin-Rest am N-Terminus von mSCF verblieben (siehe Abschnitt 3.5).

3.8 *Upscaling* auf den Bioreaktor

In der Biotechnologie werden zur Herstellung rekombinanter Proteine im technischen Maßstab Bioreaktoren eingesetzt. Wichtige Größen wie die Sauerstoffzufuhr, die Temperatur, der pH-Wert und die Zusammensetzung des Nährmediums können *online* überwacht und geregelt werden. Auf Grund dieser kontrollierbaren Bedingungen führen Kultivierungen im Bioreaktor in der Regel zu deutlichen höheren OD-Werten und damit auch zu höheren Biomassen als im Schüttelkolben. Infolgedessen werden höhere Produktausbeuten sowie eine gleichbleibende Produktqualität erzielt.

Die Kultivierungsbedingungen zur Produktion des löslichen Fusionsproteins TRX-mSCF wurden bereits im Schüttelkolben optimiert; die besten Ergebnisse, auch im Hinblick auf eine kurze Prozessdauer, wurden für definiertes Medium und 37 °C erhalten (siehe Abschnitt 3.3). Für ein *Upscaling* wurde die Kultivierung der plasmidtragenden Bakterien in einem 2 L-Bioreaktor durchgeführt. Es sollte geprüft

werden, ob die für den Schüttelkolben etablierten Bedingungen zur Gewinnung des Zielproteins auf den Bioreaktor übertragbar sind. Die Prozessführung erfolgte dabei im *Batch*-Ansatz, d.h. alle für das Bakterienwachstum benötigten Nährstoffe wurden zu Beginn der Kultivierung einmalig zugegeben.

Die Zusammensetzung des definierten Mediums wurde analog zu den Versuchen im Schüttelkolben gewählt (siehe Anhang, Abschnitt 5.3). Um einer vorzeitigen Wachstumslimitierung der Bakterien im Reaktor durch zu geringe Glukosemengen entgegenzuwirken, wurde die Anfangskonzentration der Glukose abweichend zum Schüttelkolben von 10 g/L auf 20 g/L erhöht. Der pH-Wert wurde während der gesamten Kultivierung konstant auf pH = 6,9 gehalten. Zur Begasung des Systems wurde Druckluft verwendet, wobei die Sauerstoffsättigung des Mediums über eine Koppelung an die Rührgeschwindigkeit auf 80 % der maximalen Sauerstoffsättigung geregelt wurde. Die Temperatur während der Kultivierung wurde durch einen Regler konstant auf 37 °C gehalten.

Neben diesen genannten Prozessgrößen wurde, ebenfalls über eine *online*-Analytik, der Gehalt von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid im Abgas des Reaktors gemessen. Die *offline* bestimmten Größen waren der OD-Wert und die Biotrockenmasse (BTM), sowie die Acetat- und Glukosekonzentrationen.

Zur Bestimmung eines geeigneten Induktionszeitpunkts wurde zunächst das Wachstumsverhalten der Bakterien im Reaktor ohne Induktion untersucht (siehe Abschnitt 3.8.2, Abbildung 3.31). Auf Basis dieser Wachstumskurve konnte ein passender Induktionszeitpunkt innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase gewählt werden. Die Induktion erfolgte analog zum Schüttelkolben durch die Zugabe von 0,1 mmol/L IPTG; die Produktbildung wurde anhand einer SDS-PAGE-Analyse verfolgt. Die genaue Versuchsdurchführung der Reaktorkultivierungen ist im Anhang, siehe Abschnitt 5.15, beschrieben.

3.8.1 Reaktormessdaten

In Abbildung 3.27, Abbildung 3.28 und Abbildung 3.29 sind die gemessenen Daten der Reaktorkultivierung mit Induktion der rekombinanten Proteinproduktion dargestellt. Die Verläufe der Reaktormessdaten für die Kultivierung mit Induktion

entsprachen dabei im Wesentlichen denen, die für die Kultivierung ohne Induktion aufgenommen wurden (Daten nicht gezeigt).

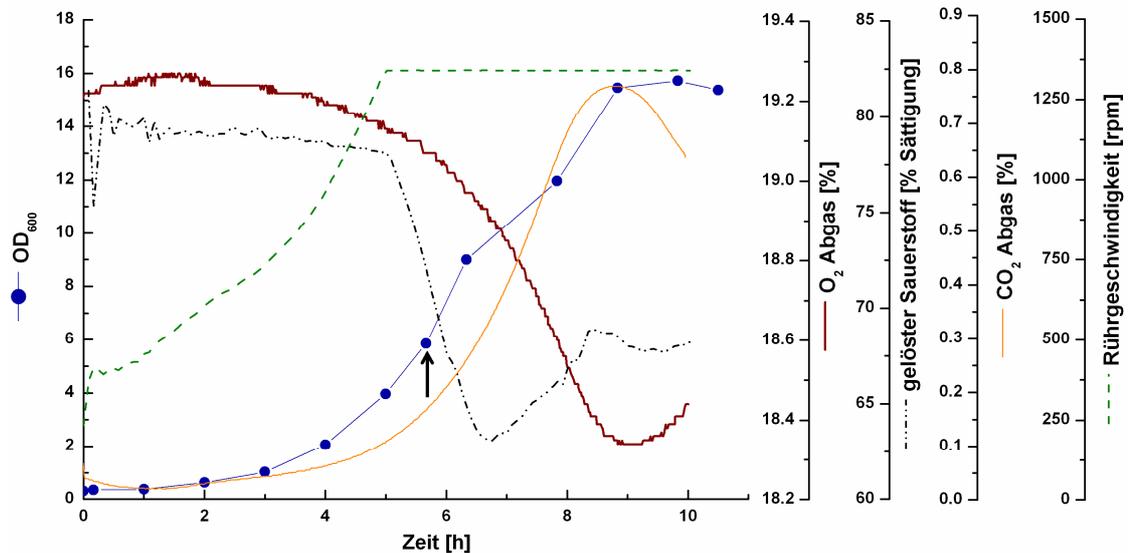


Abbildung 3.27 Reaktormessdaten der Kultivierung mit Induktion der rekombinanten Proteinproduktion (I). Dargestellt sind die zeitabhängigen Verläufe der OD, der Sauerstoffsättigung im Medium, der Rührgeschwindigkeit, sowie des Gehalts an CO₂ und O₂ im Abgas. Der Induktionszeitpunkt (bei OD = 6) ist durch einen Pfeil markiert. h, Stunde(n).

In Abbildung 3.27 können verschiedene Reaktormessdaten in Relation zu den OD-Werten verfolgt werden. Die Sauerstoffsättigung im Medium konnte trotz des steigenden Sauerstoffbedarfs der Bakterien während der ersten fünf Stunden auf Grund der Kompensation durch erhöhte Rührgeschwindigkeiten nahezu konstant gehalten werden. Durch das Erreichen der maximalen Rührerleistung (1350 rpm) nahm die Sauerstoffsättigung im Medium kontinuierlich ab und erreichte nach etwa sechseinhalb Stunden ein Minimum von 63 %. Anschließend stieg der Sauerstoffgehalt wieder an, da die Bakterien infolge eines verlangsamten Zellwachstums bzw. eines verlangsamten Gesamtstoffwechsels einen geringeren Sauerstoffbedarf zeigten. Schließlich wurde mit dem Eintreten der Bakterien in die stationäre Wachstumsphase ein annähernd konstanter Wert für die Sauerstoffsättigung im Medium erreicht (nach etwa neun bis zehn Stunden).

Die gemessenen Verläufe für Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid im Abgas des Reaktors zeigen auf Grund der Rolle der beiden Gase im Zellmetabolismus der Bakterien ein annähernd spiegelbildliches Verhalten. Der Kohlenstoffdioxidgehalt

stieg parallel mit den OD-Werten an und fiel erst bei Erreichen der stationären Phase wieder ab; für den Sauerstoffgehalt ließ sich ein genau umgekehrtes Verhalten beobachten.

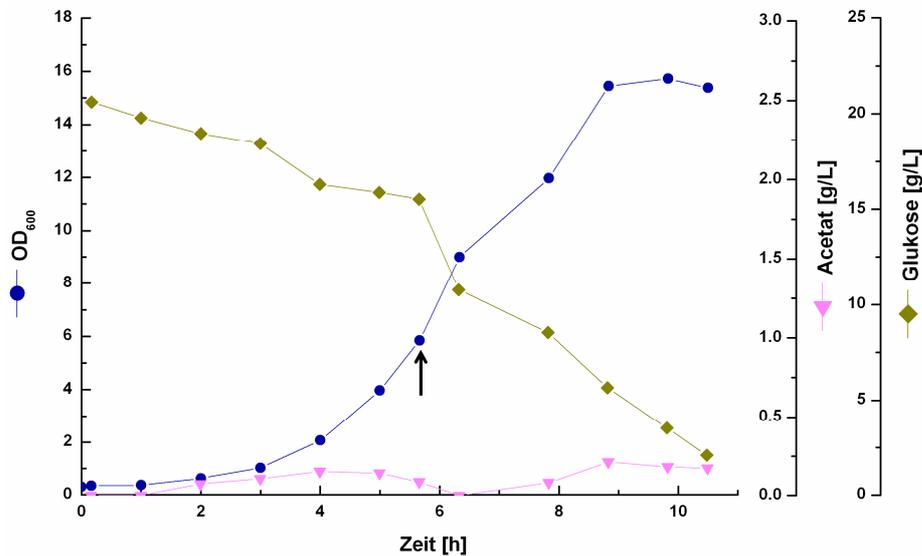


Abbildung 3.28 Reaktormessdaten der Kultivierung mit Induktion der rekombinanten Proteinproduktion (II). Dargestellt sind die zeitabhängigen Verläufe der OD sowie der Acetat- und Glukosekonzentrationen. Der Induktionszeitpunkt (bei OD = 6) ist durch einen Pfeil markiert. h, Stunde(n).

In Abbildung 3.28 sind die zeitabhängigen Verläufe der Glukose sowie des gebildeten Acetats in Relation zu den OD-Werten dargestellt. Der Verbrauch der Glukose stand dabei in direktem Zusammenhang mit dem Wachstum der Organismen. Besonders gut lässt sich dies während der Phase des stärksten exponentiellen Wachstums, welches zwischen fünf- und sechseinhalb Stunden nach Animpfen des Reaktors erfolgte, anhand der jeweiligen Steigungen der Kurven erkennen.

Auf Grund der Stoffwechselfvorgänge in *E. coli* (Glykolyse, Zitratzyklus, Zellatmung) werden verschiedene Metabolite produziert. Die Bildung von sauren Nebenprodukten wie insbesondere Acetat kann durch eine Verringerung des pH-Wertes zu einer Wachstumsinhibierung der Bakterien führen [187]. In der untersuchten Reaktorkultivierung wurde Acetat jedoch nur in geringen Mengen produziert, sodass sich dieser Metabolit vermutlich nicht inhibierend auswirkte [188].

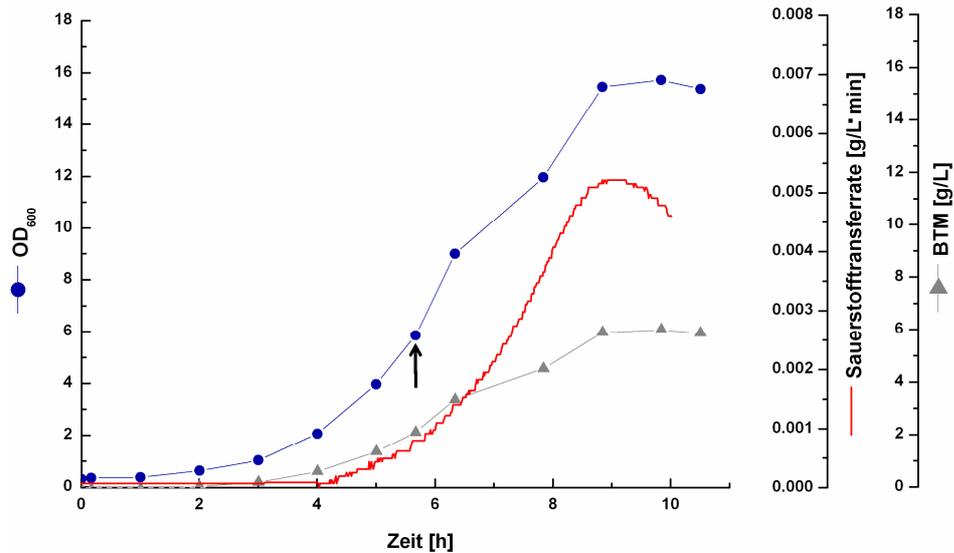


Abbildung 3.29 Reaktormessdaten der Kultivierung mit Induktion der rekombinanten Proteinproduktion (III). Dargestellt sind die zeitabhängigen Verläufe der OD, der BTM, sowie der Sauerstofftransfertrate. Der Induktionszeitpunkt (bei OD = 6) ist durch einen Pfeil markiert. h, Stunde(n).

Abbildung 3.29 zeigt die Biotrockenmasse und die berechnete Sauerstofftransfertrate (siehe Anhang, Abschnitt 5.15.3) während der Kultivierung in Relation zu den OD-Werten. Die Sauerstofftransfertrate ist eine Kenngröße, die den physiologischen Zustand und die Aktivität einer Kultur aerober Organismen charakterisiert und quantifiziert. Durch den annähernd parallelen Verlauf der Sauerstofftransfertrate zum Zellwachstum (OD-Werte) wird der durchgängig anaerob verlaufende Stoffwechsel der Bakterien verdeutlicht.

3.8.2 Produktbildung

Abbildung 3.30 zeigt den zeitlichen Verlauf der löslichen TRX-mSCF-Bildung bei der Reaktorkultivierung der Bakterien in definiertem Medium bei 37 °C. Durch den Vergleich mit der Probe vor der Induktion (Spur 1) ist deutlich zu erkennen, dass das rekombinante Fusionsprotein (32 kDa) etwa eine Stunde nach der Induktion verstärkt produziert wurde (Spur 3). Der zeitliche Beginn der Proteinproduktion lässt sich mit dem Verlauf der entsprechenden Wachstumskurve korrelieren. Die in Abbildung 3.31 dargestellten OD-Verläufe zeigen, dass etwa eine Stunde nach der Induktion ein

vermindertes Bakterienwachstum der induzierten im Vergleich zur nicht induzierten Kultur auftrat.

Die größten Produktkonzentrationen wurden zwei bis drei Stunden nach der Induktion erhalten (Abbildung 3.30, Spuren 4-5), wobei sich die Bakterien zu dieser Zeit in der exponentiellen Wachstumsphase befanden (Abbildung 3.31). Bereits nach etwa dreieinhalb Stunden nach der Induktion zeigt sich durch die leicht verminderte Bandenintensität auf dem Gel der SDS-PAGE ein beginnender Abbau von TRX-mSCF (Abbildung 3.30, Spur 6). Dieser Abbau wurde mit dem Erreichen der stationären Wachstumsphase der Bakterien sichtbar (Abbildung 3.31). Der vermutlich durch *E. coli*-Proteasen bedingte Abbau des Fusionsproteins konnte auch bei den Kultivierungen im Schüttelkolben beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.3).

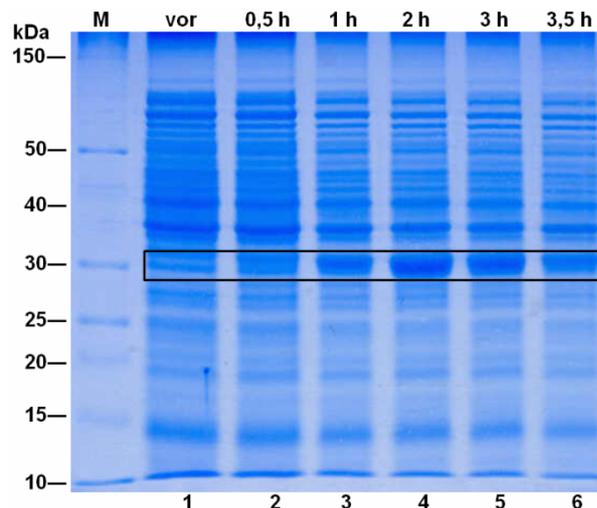


Abbildung 3.30 Zeitlicher Verlauf der TRX-mSCF-Bildung in der löslichen Fraktion des Zelllysats bei der Bioreaktorkultivierung. Gezeigt sind jeweils Proben vor der Induktion (Spur 1) sowie 0,5-3,5 Stunden nach der Induktion (Spuren 2-6). Die OD-Normierung der Proben erfolgte analog zu den Schüttelkolben-Versuchen (siehe Anhang, Abschnitt 5.5). Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; *Coomassie Blue*-Färbung). M; Proteinmarker (10-200 kDa); vor, lösliche Fraktion vor der Induktion; h, Stunde(n).

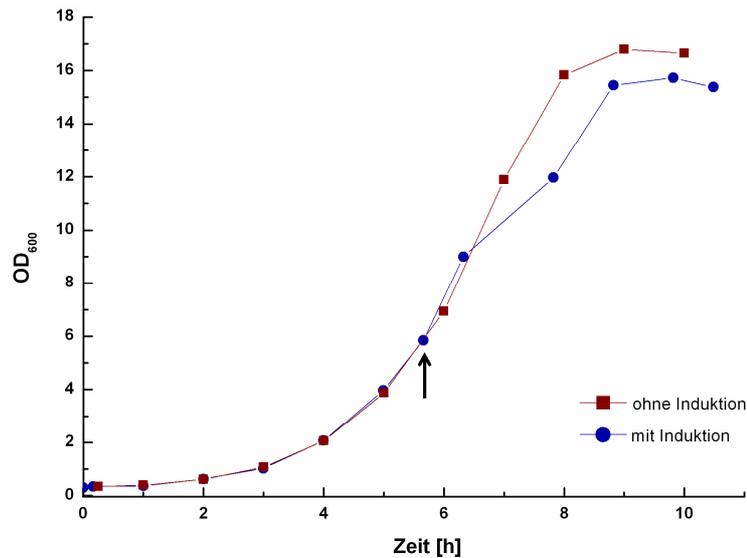


Abbildung 3.31 Vergleich der Wachstumskurven aus der Bioreaktorkultivierung mit und ohne Induktion. Der Induktionszeitpunkt (bei OD = 6) ist durch einen Pfeil markiert. h, Stunde(n).

3.8.3 Fazit des Kapitels

Das *Upscaling* der Schüttelkolben-Kultivierung auf den 2 L-Maßstab im Bioreaktor konnte erfolgreich realisiert werden. Die in definiertem Medium bei 37 °C kultivierten Bakterien produzierten sowohl im Schüttelkolben (Abbildung 3.10) als auch im Bioreaktor (Abbildung 3.30) das Fusionsprotein TRX-mSCF in der löslichen Form. In Tabelle 3.3 sind die erreichten Proteinmengen beider Kultivierungen im Vergleich zueinander dargestellt. Der optimale Erntezeitpunkt wurde als jener Zeitpunkt definiert, bei dem bei möglichst hoher BTM die größten Mengen an löslichem TRX-mSCF erreicht wurden (Bestimmung der BTM siehe Anhang, Abschnitt 5.4). Der Gesamtproteingehalt wurde über das Bradford-Assay ermittelt (siehe Anhang, Abschnitt 5.7); die Konzentrationsbestimmung von TRX-mSCF in der löslichen Fraktion des Zellysats erfolgte über eine densitometrische Auswertung (siehe Anhang, Abschnitt 5.12).

Tabelle 3.3 Vergleich der Kultivierungen im Schüttelkolben und im Reaktor. Beide Kultivierungen wurden in definiertem Medium bei 37 °C durchgeführt. Analysiert wurden jeweils die löslichen Fraktionen des Zellysats.

	Schüttelkolben	Reaktor
Optimaler Erntezeitpunkt nach der Induktion [h]	8	3
Menge lösliches Gesamtprotein [mg/L]	175	463
Menge lösliches TRX-mSCF [mg/L]	63	153
Anteil lösliches TRX-mSCF am Gesamtproteingehalt [%]	36	33
OD-Wert beim optimalen Erntezeitpunkt	4,8	15,5
BTM beim optimalen Erntezeitpunkt [g/L]	1,8	6,0
Menge lösliches TRX-mSCF in Relation zur BTM [mg/g]	35	26

Für beide Kultivierungen wurden vergleichbare Anteile an löslichem TRX-mSCF am löslichen Gesamtprotein erhalten (Schüttelkolben 36 %; Reaktor 33 %). Im Reaktor wurde der geeignete Erntezeitpunkt jedoch wesentlich schneller erreicht als im Schüttelkolben. Die unter diesen Bedingungen erreichte Biomasse liegt mit 6,0 g/L deutlich höher als die für den optimalen Erntezeitpunkt im Schüttelkolben mit 1,8 g/L. Auf Grund dieser höheren Zelldichten im Reaktor wurde insgesamt eine entsprechend höhere Ausbeute (bezogen auf das Volumen der Kultursuspension) an löslichem Fusionsprotein erhalten. Obwohl beim Vergleich dieser Daten die Fehleranfälligkeit der verwendeten Messmethoden (Bradford-Assay und Densitometrie) berücksichtigt werden muss, sind die erhaltenen Werte als relative Größen in guter Näherung miteinander vergleichbar.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Produktion von löslichem, murinem *Stem Cell Factor* (mSCF) in *Escherichia coli* (*E. coli*) konnte im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich realisiert werden. Die Bildung von *Inclusion Bodies* wurde durch die Produktion eines löslichen Fusionsproteins aus mSCF und Thioredoxin (TRX) nahezu vollständig verhindert. TRX erfüllte dabei die Rolle eines sogenannten Löslichkeits-*Tags* und wurde in einem späteren Schritt durch *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease wieder entfernt. Die Herstellung des erforderlichen Expressionsvektors für die Produktion des rekombinanten Fusionsproteins, welches als TRX-mSCF bezeichnet wurde, erfolgte in einem ersten Prozessschritt. Zusätzlich zum Gen für mSCF wurden codierende Abschnitte für eine TEV-Erkennungssequenz sowie für einen His-*Tag* in einen Plasmid-Vektor integriert. Als Basis für die Klonierung diente der pET-32b-Vektor; welcher bereits eine Codierung für TRX enthält. Als bakterieller Wirt wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet.

Der Einfluss von verschiedenen Medien und Temperaturen auf die Bildung des löslichen Fusionsproteins TRX-mSCF wurde durch eine Kultivierung der plasmidtragenden BL21(DE3)-Bakterien im Schüttelkolben untersucht. Getestet wurden die beiden komplexen Medien LB und TB sowie ein definiertes (synthetisches) Medium bei Temperaturen von jeweils 37 °C, 30 °C und 23 °C. Die Produktion von löslichem TRX-mSCF konnte nur für LB-Medium und das definierte Medium, nicht aber für TB-Medium beobachtet werden. Das Fusionsprotein wurde dabei fast ausschließlich in der löslichen Form produziert, d.h. *Inclusion Bodies* konnten nahezu gänzlich vermieden werden.

Entgegen der Vielzahl von Literaturbeispielen, die eine Verbesserung der Proteinlöslichkeit mit sinkenden Temperaturen beschreibt, erfolgte die Bildung von löslichem TRX-mSCF temperaturunabhängig. Die größten Mengen an Fusionsprotein (36 % Anteil am Gesamtproteingehalt) konnten durch eine Kultivierung der Bakterien in definiertem Medium erhalten werden.

Zur Separation des His-getaggten Fusionsproteins von den Wirtszellproteinen wurde eine immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (IMAC, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) durchgeführt. Die IMAC-Aufreinigung erfolgte unter

Verwendung von Membranadsorber-Technik und wurde zunächst im Analysenmaßstab optimiert. Im Anschluss wurden die ermittelten Bedingungen für die Aufreinigung auf die Durchführung an einer FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*)-Anlage übertragen. Durch Variation verschiedener Parameter wie der Zusammensetzung der jeweiligen Puffer oder der Elutionsstrategie wurde eine Optimierung der Vorschrift für die Durchführung an der FPLC-Anlage erreicht.

Die Untersuchung der Elutionsfraktionen zeigte, dass neben dem Zielprotein TRX-mSCF stets ein weiteres His-getagtes Protein an die Affinitätsmembran gebunden wurde. Dieses Protein konnte als proteolytisches Zwischenprodukt und damit als Teilfragment von TRX-mSCF identifiziert werden. Der Einsatz von verschiedenen Gemischen an Protease-Inhibitoren konnte die partielle Degradation des Fusionsproteins jedoch nicht verhindern. Für die weitere Prozesssierung des Fusionsproteins wurde dieses daher im Gemisch mit seinem Proteolyse-Fragment eingesetzt.

Zur Freisetzung von mSCF aus dem Fusionsprotein TRX-mSCF wurde letzteres mit Hilfe von *AcTEV*TM-Protease gespalten. Der Löslichkeits-*Tag* TRX wurde dabei in einem gemeinsamen Fragment mit dem His-*Tag* (als TRX-His bezeichnet) von mSCF getrennt. Die Löslichkeit des Zielproteins mSCF blieb auch nach diesem Schritt erhalten. Der Verdau des Fusionsproteins erfolgte mit den untersuchten Bedingungen zwar quantitativ, jedoch nicht vollständig.

Die Spaltung des Proteolyse-Fragments von TRX-mSCF wurde ebenfalls beobachtet. Basierend auf den Ergebnissen der nachfolgenden IMAC-Aufreinigung (s.u.), erfolgte dieser Verdau zu den beiden Spaltprodukten mSCF sowie einem His-getagten Fragment von TRX-His. Somit führte die Proteolyse des Fusionsproteins TRX-mSCF letztlich zu keinem Verlust an Zielprotein mSCF.

Die abschließende Aufreinigung von mSCF wurde erfolgreich mit Hilfe einer weiteren IMAC realisiert. Zur Vorbereitung wurde dafür zunächst eine Dialyse für den erforderlichen Pufferaustausch durchgeführt. Mit Hilfe von Membranadsorbern konnten alle Kontaminanten des vorangegangenen Verdaus durch ihren His-*Tag* von mSCF abgetrennt werden. Gemäß der Erwartung konnte das Zytokin als einziges Protein in den Durchlaufractionen der Chromatographie isoliert werden. Die Durchführung der IMAC konnte vom Analysenmaßstab auf den Labormaßstab an einer FPLC-Anlage übertragen werden.

Das in hoher Reinheit isolierte Zytokin (95 % Reinheit auf Basis einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Silberfärbung) wurde qualitativ und quantitativ durch einen für mSCF spezifischen ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) analysiert und damit die Identität von mSCF bestätigt.

Die biologische Aktivität von mSCF konnte anhand von verschiedenen Proliferations-Assays der megakaryozytischen Zelllinie M-07e nachgewiesen werden. Im Rahmen der durchgeführten Aktivitätstests zeigte das löslich in *E. coli* hergestellte Zytokin sogar bessere Ergebnisse als der kommerzielle Standard. Für das Fusionsprotein TRX-mSCF konnte im Rahmen eines Kurzzeit-Proliferations-Assays ebenfalls, wenn auch deutlich schwächer als für mSCF, eine biologische Aktivität nachgewiesen werden.

TRX hat sich damit im Fall von mSCF als potenter Löslichkeits-*Tag* bewährt. Das isolierte Zytokin konnte nicht nur in der löslichen Form, sondern auch in seiner nativen Konformation hergestellt werden.

In Abbildung 4.1 ist eine Übersicht aller Prozessschritte zur Herstellung von löslichem mSCF in *E. coli* dargestellt. Die Gesamtausbeute an mSCF aus einem Liter bakterieller Kulturbrühe (Kultivierung im Schüttelkolben) beträgt 2,5 mg.

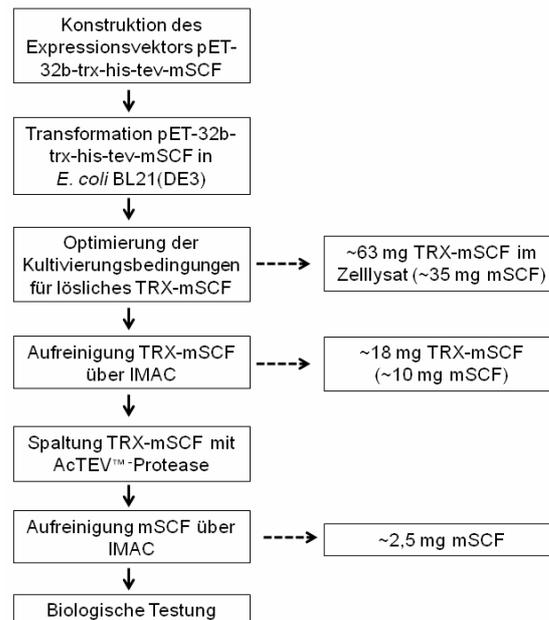


Abbildung 4.1 Übersicht der einzelnen Prozessschritte zur Herstellung von löslichem mSCF in *E. coli*. Die angegebenen Proteinmassen beziehen sich auf einen Liter Kulturbrühe (Kultivierung im Schüttelkolben). Die Zahlen in Klammern geben den jeweiligen Anteil an mSCF an der Gesamtmasse des Fusionsproteins an (56 %).

Die Kultivierung der plasmidtragenden Bakterien konnte erfolgreich im Bioreaktor (2 L, *Batch*-Prozess) durchgeführt werden. Die dafür verwendeten Bedingungen aus der Optimierung der Schüttelkolben-Kultivierung (definiertes Medium, 37 °C) konnten im *Upscaling* direkt übertragen werden. Das lösliche Fusionsprotein konnte dabei mit vergleichbaren Ergebnissen bezüglich des Anteils am löslichen Gesamtprotein sowohl im Schüttelkolben als auch im Bioreaktor produziert werden.

Der Maßstab des etablierten Prozesses für die Herstellung von löslichem mSCF ist für die Verwendung des Zytokins in der hämatopoetischen Stammzellforschung geeignet. Für die Produktion größerer Mengen an löslichem mSCF könnte die Kultivierung der Bakterien in einem *Fed-Batch*-Prozess durchgeführt werden. Diese Prozessführung erlaubt die definierte Substratzugabe während der Kultivierung und somit die verstärkte Kontrolle des Bakterienwachstums sowie damit verbundener Prozesse zur Produktion rekombinanter Proteine.

Zur möglichen Verkürzung des Gesamtprozesses zur Herstellung von löslichem mSCF könnte eine Co-Expression des TRX-Gens mit dem mSCF-Gen in *E. coli*

untersucht werden. Die notwendige Spaltung eines Fusionsproteins, wie in dieser Arbeit beschrieben, würde folglich entfallen. Durch die damit verbundene potentiell geringe Gesamtanzahl der Prozessschritte könnte möglicherweise eine höhere Ausbeute an löslichem mSCF erzielt werden.

5 Anhang

Im Folgenden sind die Methoden für die durchgeführten experimentellen Arbeiten zur Herstellung von löslichem murinem *Stem Cell Factor* (mSCF) in chronologischer Reihenfolge angegeben. Ein Verzeichnis der verwendeten Materialien und Geräte sowie noch nicht im Methodenteil aufgeführter Chemikalien ist im Anschluss (siehe Abschnitt 5.16) gegeben.

5.1 Allgemeines

Reinstwasser

Zum Ansetzen aller Lösungen, für Waschschrte o.ä. wurde Reinstwasser aus einem *Arium 611 Reinstwassersystem* (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) mit einer spezifischen Leitfähigkeit von 18,2 M Ω x cm verwendet.

Sterilisation

Sämtliche Kultivierungsgefäße (Schüttelkolben, Bioreaktor), Medien, 1,5 mL- und 2 mL-Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen o.ä. wurden für alle Arbeiten, die mit lebenden Organismen durchgeführt wurden, zuvor für 20 min bei 121 °C in einem Autoklaven sterilisiert. Kleinere Volumina oder nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch entsprechende Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 μ m sterilisiert.

Antibiotikum (Ampicillin)

Ampicillin wurde in einer Stammlösung mit 25 mg/mL angesetzt, aliquotiert und bei einer Temperatur von -20 °C gelagert. Alle Volumenangaben für Ampicillin beziehen sich im Folgenden auf diese Lösung. Die Arbeitskonzentration in Flüssigmedien betrug 75 μ g/mL.

Herstellung von Agarplatten

7,5 g Agar wurden mit LB-Medium (Zusammensetzung siehe Abschnitt 5.3) auf 500 mL aufgefüllt und sterilisiert. Die noch warme Lösung wurde in Petrischalen (90 x 14 mm; VWR, Darmstadt) gegossen und die Platten nach Erkalten bei 4 °C gelagert. Die Zugabe von Ampicillin erfolgte jeweils erst unmittelbar vor Verwendung der Platte. Dazu wurden 100 µL der Ampicillin-Stammlösung gleichmäßig auf der Agarplatte verteilt und etwa 10 min gewartet, bis die Lösung vollständig eingezogen war.

Schüttelkolben

Für Vorkulturen (20 mL) wurden 100 mL-Kolben mit Drehverschluss (leicht geöffnet) und vier Schikanen verwendet; für Hauptkulturen (100 mL-200 mL) wurden 500 mL-Kolben mit Aludeckel und zwei Schikanen verwendet.

OD-Messung

Zur Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer Zellsuspension wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die Kulturproben wurden mit 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung so verdünnt, dass Messwerte zwischen 0,05 und 0,8 erhalten wurden (entspricht Verdünnungen zwischen 1:10 und 1:20). Zum Nullabgleich wurde 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung verwendet.

Verdünnungen

Eine 1:2-Verdünnung entsprach einer Mischung von zwei Lösungen zu gleichen Teilen. Mit einer 1:10-Verdünnung ist die Mischung von einem Teil Lösung A zu neun Teilen Lösung B gemeint und so fort.

5.2 Herstellung des Expressionssystems

Zur Bereitstellung des Expressionssystems aus Plasmid-DNA und *Escherichia coli* (*E. coli*)-Wirt erfolgten zwei Schritte. Zunächst wurde der entsprechende Vektor mit den genetischen Informationen für das Fusionsprotein TRX-mSCF hergestellt (siehe Abschnitt 5.2.1). Durch Transformation von BL21(DE3)-Bakterien (siehe Abschnitt 5.2.2) wurde das Plasmid in das Bakterium eingeschleust und damit das Expressionssystem zusammengefügt.

5.2.1 Herstellung des Vektors

Das Templat einer murinen cDNA der löslichen Form von SCF (imaGenes, Berlin) wurde über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) vervielfältigt. Die dafür eingesetzten Primer waren 5' mSCF *Bam*HI 5'-AGGGATCCATGAAGGAGATCTGCGGGAATCC-3' sowie 3' mSCF *Xho*I 5'-TGCTCGAGTGCAACAGGGGGTAACATAAATGGTTT-3' (Eurofins MWG Operon, Ebersberg; die Restriktionsstellen sind jeweils unterstrichen). Die amplifizierte Nukleotidsequenz wurde 3' zur codierenden Sequenz von Thioredoxin (TRX) in einen pET-32b-Plasmidvektor (Novagen, Darmstadt) als *Bam*HI/*Xho*I-Fragment eingefügt. In analoger Vorgehensweise wurden sowohl ein *His-Tag* (Codierung für sechs Histidin-Reste) als auch eine Erkennungssequenz für *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease als gemeinsames *Msc*I/*Bam*HI-Fragment eingefügt. Dieses Fragment wurde durch folgende überlappende Primer erstellt: 5' His-TEV 5'-GCTGGCCATATGCACCATCATCATCATTCTTCTGGTGAGAATCTT TA-3' und 3' His-TEV 5'-GAGCTACGGGGCTGGATCCCTGAAAATAAAGATTCTCACCAGAAGAATGA-3' (Eurofins MWG Operon; die Restriktionsstellen sind jeweils unterstrichen). Aus diesen beiden Primern wurde in einer PCR-Reaktion unter Zuhilfenahme von *Taq* Polymerase ein doppelsträngiges Oligonukleotid erstellt, dieses in einen Zwischenvektor kloniert (pJet, Fermentas) und durch Sequenzierung verifiziert. Aus diesem Zwischenvektor wurde das TEV-His-Fragment durch *Msc*I- und *Bam*HI- Verdau freigesetzt und ebenfalls in das pET-32b

Plasmid eingefügt. Für die Ligation wurden in einem 20 µL-Ansatz 4 µL (400 ng) pET-32b und 12 µL Insert (400 ng) verwendet.

Das fertige Plasmid (Abbildung 5.1) wurde mittels Transformation und anschließender Kultivierung von *E. coli*-Bakterien des Stammes XL1 vervielfältigt. Die Isolation des Plasmids erfolgte über eine Mini-Präparation (siehe Abschnitt 5.2.4).

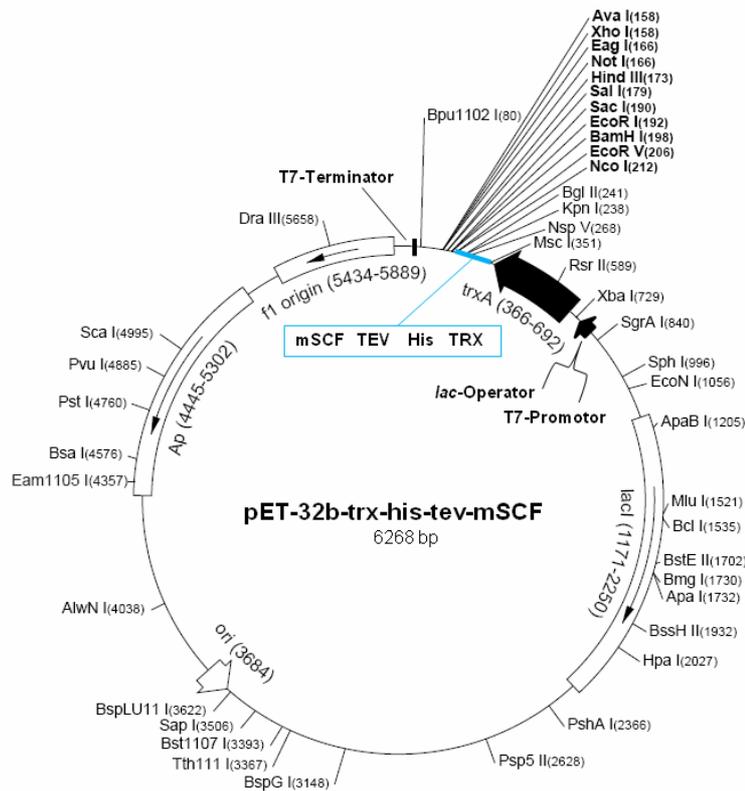


Abbildung 5.1 Plasmidkarte von pET-32b-trx-his-tev-mSCF. Das eingefügte Gesamt-Insert befindet sich zwischen den Schnittstellen von *MscI* und *BamHI* und ist in hellblau hervorgehoben.

Die codierende Sequenz des gesamten Fusionsproteins TRX-mSCF ist im Folgenden als Abfolge der entsprechenden Basen angegeben. Die zugehörigen Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code ebenfalls dargestellt. Farblich hervorgehoben sind die codierenden Bereiche für den His-Tag (hellgrün), die TEV-Erkennungssequenz (orange) sowie für mSCF (violett).

```
atgagcgataaaattattcacctgactgacgacagttttgacacggatgtactcaagcggacggggcgatcctcgtcgcg
ttctgggcagagtgggtcgggtccgtgcaaaatgatgccccgattctggatgaaatcgctgacgaatatcagggcaaac
gaccgttgcaaaactgaacatcgatcaaaacctggcactgcgccgaaatatggcatccgtggatcccgactctgctgc
```

tgttcaaaaacggtgaagtggcggcaaccaaaagtgggtgcactgtctaagggtcagttgaaagagttcctcgacgtaac
 ctggccggttctggttctggccatatgaccatcatcatcatattcttctggtgagaatctttatttcagggatccatgaagg
 agatctgcccgaatcctgtgactgataatgtaaaagacattacaaaactggggcaaatcttccaatgactatatgataac
 cctcaactatgtcggggatggatgtttgcctagtcattgttgctacgagatatggaatacaattatcactcagcttgact
 actcttctggacaagtctcaaatatttctgaaggcttgagtaactccatcatagacaaaactgggaaaatagtgatgac
 ctcgtgttatgcatggaagaaaacgcaccgaagaatataaaagaatctccgaagaggccagaaaactagatcctttactct
 gaagaattcttagtattttcaatagatccattgatgcctttaaggactttatggtggcatctgacactagtgactgtgtgctctt
 tcaacattaggtcccagaaaagattccagagtcagtgacacaaaaccattttatgttaccctctgttcataa

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQG
 KLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSCKGQLKEFL
 DANLAGSGSGHMHSHHSSGENLYFQGS MKEICGNPVTDNVKDITKLVA
 NLPNDYMITLNYVAGMDVLP SHCWLRDMVIQLSLSLTLLDKFSNISEGLSN
 YSIIDKLGKIVDDL VLCMEENAPKNIKESPKRPETRSFTPEEFFSIFNRSIDAFK
 DFMVASDTSDCVLSVVSSTLGPEKDSRTKPFMLPPVA*

5.2.2 Transformation

Herstellung kompetenter Zellen mittels TSS-Methode

Für die Einschleusung einer fremden DNA in ein Gram-negatives Bakterium ist es notwendig, die Zellmembran des Wirts für den Vektor durchlässig zu machen. Daher wurden für die Transformation der BL21(DE3)-Bakterien (Novagen) diese zunächst über die TSS (*Transformation and Storage Solution*)-Methode chemisch kompetent gemacht.

Für eine Vorkultur wurden 100 µL einer Gefrierkultur (siehe Abschnitt 5.2.3) von BL21(DE3) in 20 mL LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Die Hauptkultur (100 mL LB-Medium) wurde mit 1 mL der Vorkultur inokuliert und bis zum Erreichen einer OD von 0,7 bei 37 °C und 150 rpm kultiviert. 40 mL der Kultursuspension wurden bei 5000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand möglichst quantitativ entfernt. Das erhaltene Bakterienpellet wurde in 2 mL eiskalter TSS-Lösung resuspendiert und für 1,5 h auf Eis inkubiert. Nach Aliquotierung (je

300 μL) in 1,5 mL Reaktionsgefäße wurden die kompetenten Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

TSS-Lösung 10 % (w/v) PEG 6000
 30 mmol/L MgCl_2
 5 % (v/v) DMSO
 mit LB-Medium auffüllen

Transformation mittels Hitzeschock

250 μL der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 15 μL Vektor (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in TE-Puffer) 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 min einem Hitzeschock bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt und in direktem Anschluss 5 min auf Eis gelagert. Nach der Zugabe von 800 μL LB-Medium erfolgte eine Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 300 rpm für 1 h. Nachfolgend wurden die Zellen für 1 min bei 1000 g sedimentiert und der Überstand bis auf 300 μL verworfen. Im verbleibenden Volumen wurden die Bakterien resuspendiert, auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Da das verwendete Plasmid pET-32b-trx-his-tev-mSCF ein Gen für eine Ampicillin-Resistenz trägt, wurde dieses bei der Transformation von BL21(DE3) auf die Bakterien übertragen. Auf den Agarplatten konnten daher nur jene Bakterien wachsen, die durch die erfolgreiche Aufnahme des Plasmids die Antibiotikum-Resistenz als Selektionsmarker besaßen.

TE-Puffer 100 mmol/L Tris-HCl
 10 mmol/L EDTA
 pH auf 8,0 einstellen

5.2.3 Anlegen von Gefrierkulturen

Die folgende Vorschrift bezieht sich sowohl auf den untransformierten, als auch auf den transformierten BL21(DE3)-Stamm. Für alle Schritte mit den untransformierten

Bakterien wurde kein Antibiotikum verwendet; den Agarplatten und den Kultursuspensionen des plasmidtragenden Stammes wurde stets Ampicillin zugesetzt.

Für die Herstellung einer Gefrierkultur wurde eine Einzelkolonie einer frischen Agarplatte (maximal 2 Tage alt) zur Inokulation einer Vorkultur aus 20 mL LB-Medium (und ggf. 60 μ L Ampicillin-Stammlösung) verwendet. Nach der Inkubation über Nacht bei 30 °C und 130 rpm wurden 1 mL der Vorkultur zum Animpfen einer Hauptkultur aus 100 mL LB-Medium (und ggf. 300 μ L Ampicillin-Stammlösung) verwendet. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 150 rpm bis zum Erreichen einer OD zwischen 0,5 und 0,7 kultiviert. 10 mL der Kultursuspension wurden mit dem äquivalentem Volumen an Glycerin vermischt (kurzes Vortexen), aliquotiert (je 500 μ L) und bei -80 °C gelagert.

5.2.4 Überprüfung der Transformation

Plasmid-Präparation

Zur Isolierung des Plasmids pET-32b-trx-his-tev-mSCF aus den transformierten BL21(DE3)-Bakterien wurde das *Peq-GOLD Plasmid Miniprep Kit II* (PeqLab GmbH, Erlangen) verwendet. 10 mL einer Übernacht-Kultur in LB-Medium wurden bei 5000 g für 10 min zentrifugiert und der Kulturüberstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 500 μ L Lösung I/RNaseA durch Vortexen resuspendiert. Nach der Zugabe von 500 μ L Lösung II und Invertieren der Lösung wurden 700 μ L Lösung III dazugegeben und erneut invertiert. Für eine möglichst quantitative Präzipitation wurde die Plasmidpräparation für 2 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 10000 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in mehreren Schritten mit maximal 750 μ L vollständig auf die im Kit enthaltenen Säulen aufgegeben und bei 10000 g für 1 min zentrifugiert. Nachfolgend wurde ein Waschschriff mit 500 μ L HB-Puffer sowie zwei identische Waschschriffe mit 750 μ L Waschpuffer II (Waschpuffer mit Ethanol) durchgeführt. Zwischen den Waschschriffen wurde jeweils 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Zur Entfernung von Rückständen an Ethanol wurde die Säule zusätzlich nach dem letzten Waschschriff für 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Für die Elution der Plasmid-DNA von der Säule wurde TE-Puffer verwendet. Der erste Elutionsschriff erfolgte mit 50 μ L TE-Puffer; der zweite mit

25 μL . Die Konzentration und die Reinheit der Mini-Präparation wurden photometrisch bestimmt. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Restriktionsverdau

Für die verschiedenen Ansätze wurden je 1,5 μg Plasmid-DNA aus der Mini-Präparation, je 1 μL jedes Restriktionsenzym sowie 4 μL Restriktionspuffer (10 fach-konzentriert) mit H_2O auf 40 μL aufgefüllt. Die Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgte über Nacht. Für die Linearisierung des Plasmids wurde *EcoRI* (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet; für den Doppelverdau wurden *EcoRI* und *PstI* (Fermentas) in Kombination eingesetzt. Die jeweiligen Puffer wurden zusammen mit den Enzymen vom Hersteller bereitgestellt.

Agarosegelelektrophorese

Für die Analyse der DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdau wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung eines 1,5 % igen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose mit TAE-Puffer auf 100 mL aufgefüllt und bei 80 W für ca. 1,5 min in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose gelöst hatte. Nach der Zugabe von 5 μL Ethidiumbromid wurde die gesamte Lösung zur Abkühlung etwas stehen lassen und im Anschluss zum Gießen des Gels verwendet.

<u>TAE-Puffer</u>	40 mmol/L Tris-HCl
	19 mmol/L Essigsäure
	1 mmol/L EDTA
	pH auf 8,0 einstellen

Je 10 μL Probe wurden mit 10 μL Auftragspuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 5 min bei 50 V betrieben und dann weitere 1,5 Stunden bei 125 V. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte mittels UV-Licht.

<u>Auftragspuffer</u>	9,5 mL Formamid
	25 µL 10 % iges SDS
	2,5 mg Bromphenolblau
	2,5 mg Xylencyanol
	10 µL 0,5 mmol/L EDTA
	auffüllen auf 10 mL mit H ₂ O

Produktion des Fusionsproteins

Zur Überprüfung der Transformation auf Proteinebene wurde eine Einzelkolonie von der Transformations-Agarplatte entnommen und damit eine Vorkultur angeimpft. Die Durchführung der Kultivierung erfolgte in LB-Medium und bei 37 °C; das Protokoll ist Abschnitt 5.3 zu entnehmen. Die Ernte der Bakterien erfolgte drei Stunden nach der Induktion. Nach der Lyse der Zellen via Ultraschall (siehe Abschnitt 5.5) wurden die Proben über eine SDS-PAGE untersucht (siehe Abschnitt 5.6).

5.3 Kultivierungen im Schüttelkolben

In umfassenden Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass für die erfolgreiche Produktion des Fusionsproteins TRX-mSCF in BL21(DE3) die Einhaltung eines bestimmten Protokolls entscheidend ist. Es wurde beobachtet, dass die direkte Inokulation einer Vorkultur aus der Gefrierkultur nicht zur späteren Produktion des Fusionsproteins führte. Daher wurde zunächst eine Agarplatte (frisch mit 100 µL Ampicillin-Stammlösung versehen) aus der Gefrierkultur angeimpft. Durch Eintauchen einer sterilen Impföse in die Gefrierkultur wurden Bakterien auf die Agarplatte transferiert und dort durch einen Verdünnungsausstrich ausplattiert. Nach Inkubation der Platte bei 37 °C über Nacht wurde am folgenden Tag eine Vorkultur mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte inokuliert. Die Platte mit den übrigen Kolonien wurde für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert, um sie ggf. zur Animpfung weiterer Agarplatten zu verwenden. Vor einer neuen Kultivierung wurde stets eine frische Agarplatte auf die beschriebene Weise zur Anzucht von Einzel-

kolonien verwendet. Ob die zum Ausplattieren auf einer Agarplatte verwendeten Bakterien aus der Gefrierkultur oder einer anderen mit Einzelkolonien besiedelten Agarplatte stammten, hatte keinen Einfluss auf die Produktion von TRX-mSCF.

Für eine Vorkultur wurden 20 mL Medium, 60 µL Ampicillin-Stammlösung, sowie eine Einzelkolonie des plasmidtragenden BL21(DE3)-Stammes über Nacht bei 30 °C und 130 rpm inkubiert. Die Hauptkultur (200 mL Medium, 600 µL Ampicillin-Stammlösung) wurde mit der entsprechend benötigten Menge an Vorkultur angeimpft, um eine Start-OD in der Hauptkultur von 0,1 zu erreichen. Die Kultivierung der Hauptkultur erfolgte je nach untersuchter Temperatur bei 37 °C, 30 °C oder 23 °C und 150 rpm. Die Induktion der Genexpression wurde durch die Zugabe von 0,1 mmol/L Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) bei einer OD von 0,6 (LB- und definiertes Medium); bzw. bei einer OD von 1,0 (TB-Medium) erreicht. Für die Probennahme wurde Kultursuspension entnommen und die Bakterien durch Zentrifugation (5000 g, 10 min) vom Kulturüberstand getrennt. Die Bakterienpellets wurden entweder direkt aufgeschlossen (siehe Abschnitt 5.5) oder bei -20 °C gelagert. Für ein jeweilig untersuchtes Medium (LB, TB oder definiert; Zusammensetzungen s.u.) wurden sowohl die Vorkultur als auch die Hauptkultur mit diesem Medium angesetzt.

LB-Medium

10 g/L Tryptone Plus
5 g/L Hefextrakt
10 g/L NaCl

TB-Medium

12 g Tryptone Plus
24 g Hefeextrakt
4 mL Glycerin
auffüllen auf 900 mL mit H₂O (Lösung 1)

2,31 g KH₂PO₄
12,54 g K₂HPO₄
auffüllen auf 100 mL mit H₂O (Lösung 2)

Beide Lösungen wurden separat angesetzt und autoklaviert. Direkt vor Benutzung des Mediums wurden beide Lösungen im Verhältnis neun Teile Lösung 1 zu einem Teil Lösung 2 zusammengegeben.

<u>Definiertes Medium</u>	10 g/L Glukose
	1,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	4,5 mg/L Thiamin·HCl
	2,5 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
	12,8 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
	2,2 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
	3,0 mg/L H_3BO_3
	2,1 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	33,8 mg/L $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
	100,8 mg/L Fe(III)Citrat
	13,3 g/L KH_2PO_4
	4,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
	1,7 g/L Zitronensäure
	14,1 mg EDTA
	pH auf 6,9 einstellen

Alle Lösungen (Glukose, MgSO_4 , Thiamin, Spurenelemente und der Phosphatpuffer) wurden separat hergestellt und sterilisiert (bis auf Thiamin können alle Lösungen autoklaviert werden). Dabei wurden verschieden konzentrierte Stammlösungen angesetzt (Glukose: 50-fach; MgSO_4 : 100-fach; Thiamin: 100-fach, Spurenelemente: 100-fach; Phosphatpuffer: einfach) und unmittelbar vor Verwendung des Mediums in entsprechenden Mengen zusammengegeben.

5.4 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurden für jede Probe in Doppelbestimmung je 2 mL der Kultursuspension entnommen und in ein 2 mL-Reaktionsgefäß gefüllt. Die Bakterien wurden bei 5000 g für 10 min pelletiert und anschließend bei 80 °C für zwei Tage in einem Trockenofen getrocknet. Zur Abkühlung wurden die Proben für 30 min im Exsikkator aufbewahrt. Aus der Differenz der beiden Massen für das Reaktionsgefäß vor und nach der Befüllung mit Probe konnte die BTM ermittelt werden.

Für die Kultivierungen im Schüttelkolben wurde für jedes Medium (LB, TB und definiert) bei 30 °C eine Kalibration für den Zusammenhang aus OD-Wert und zugehöriger BTM durchgeführt. Über eine lineare Regression wurde eine Geradengleichung berechnet und mit dieser die BTM für die weiteren Temperaturen (23 °C und 37 °C) rechnerisch bestimmt.

5.5 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte für aufzuschließende Volumina bis 500 µL durch Ultraschall; ab 500 µL wurde die Lyse chemisch mit *BugBuster™ Protein Extraction Reagent* (Novagen) durchgeführt. Aufschlüsse für Volumina >500 µL mittels Ultraschall führten unter allen untersuchten Bedingungen (kürzere Intervalle und längere Pausen zwischen den Ultraschall-Einheiten) stets zur Aggregation des Fusionsproteins. Unabhängig von der verwendeten Methode wurden die pelletierten Bakterien in der entsprechenden Menge Lysepuffer so resuspendiert, dass der Aufschluss bei einer OD von 20 erfolgte. Damit lag für alle Aufschlüsse stets eine konstante Anzahl an Zellen zugrunde, sodass die jeweiligen Proteinbanden aus der SDS-PAGE-Analyse direkt miteinander verglichen werden konnten. Die Berechnung für das benötigte Volumen an Lysepuffer erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{20}{OD \text{ bei Probenentnahme}} = x$$

$$\frac{\text{Kulturvolumen der Probe [mL]}}{x} = \text{Volumen Lysepuffer [mL]}$$

Die OD bei Probenentnahme bezieht sich auf die gemessene OD der Kultursuspension zum Zeitpunkt der Probenentnahme bzw. Ernte der Bakterien. Das Kulturvolumen der Probe beschreibt jenes Volumen an Kultursuspension, das dem aufzuschließenden Bakterienpellet zu Grunde lag.

Für eine mechanische Lyse der Zellen mit Hilfe von Ultraschall wurden die Bakterienpellets zunächst in PBS-Puffer (Lysepuffer für Ultraschall-Aufschluss) resuspendiert. Durch Vorversuche wurden verschiedene Bedingungen wie die Leistung und Pulsdauer der Ultraschall-Sonde sowie die Lyse-Dauer untersucht und optimiert. Die besten Ergebnisse wurden für die folgenden Bedingungen erhalten. Unter Eiswasserkühlung der Probe wurde diese für 6 min bei 100 W und einer Pulsdauer von 0,6 s lysiert.

<u>PBS-Puffer</u>	137 mmol/L NaCl
	2,7 mmol/L KCl
	10 mmol/L Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O
	2 mmol/L KH ₂ PO ₄
	pH auf 7,4 einstellen

Für den chemischen Aufschluss mit *BugBuster™ Protein Extraction Reagent* unter Zusatz von Lysozym und Benzonase wurden ebenfalls Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Bedingungen (erforderliche Mengen der beiden Enzyme) durchgeführt. Die benötigte Menge an Aufschluss-Reagenz (Lysepuffer für chemischen Aufschluss) wurde jeweils frisch nach folgendem Grundrezept hergestellt:

<u>Aufschluss-Reagenz</u>	1 mL <i>BugBuster™ Protein Extraction Reagent</i>
	0,6 µL Benzonase
	1,0 µL Lysozym-Lösung

Die Lysozym-Lösung wurde ebenfalls stets frisch angesetzt, wobei 50 mg Lysozym in 500 µL Lysozym-Puffer gelöst wurden.

<u>Lysozym-Puffer</u>	50 mmol/L Tris-HCl
	100 mmol/L NaCl
	0,1 mmol/L EDTA
	0,1 % (v/v) Triton X-100
	pH auf 8,0 einstellen

Das Bakterienpellet wurde in der entsprechenden Menge Aufschluss-Reagenz aufgenommen und für 20 min bei 350 rpm und Raumtemperatur inkubiert.

Bei beiden Aufschluss-Methoden wurde das erhaltene Zelllysats für je 20 min bei 17000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der der löslichen Fraktion des Zelllysats entspricht, wurde möglichst quantitativ abgenommen. Für die unlösliche Fraktion des Zelllysats wurde der Rückstand erneut in der entsprechenden Menge Lysepuffer durch kräftiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert.

5.6 SDS-PAGE

Zur Durchführung einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proben mit der äquivalenten Menge Laemmli-Auftragspuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Da die Lyse der Bakterienpellets stets bei einer OD von 20 erfolgte (siehe Abschnitt 5.5), wurden alle Proben durch die Vorbereitung für die SDS-PAGE auf eine theoretische OD von 10 verdünnt. Durch diese einheitliche Vorgehensweise wurde eine allgemeine Normierung der Proben erreicht, sodass diese direkt auf dem Gel miteinander verglichen werden konnten.

<u>Laemmli-Auftragspuffer</u>	80 % (v/v) SDS-Probenpuffer
	10 % (v/v) Glycerin (55 % ig (v/v))
	10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol

<u>SDS-Probenpuffer</u>	20 mmol/L Tris-HCl 2 mmol/L EDTA 5 % SDS (w/v) 0,02 % Bromphenolblau auffüllen auf 90 mL mit H ₂ O
<u>SDS-Laufpuffer</u> (“1x TGS”)	25 mmol/L Tris-Base 192 mmol/L Glycin 0,1 % SDS (w/v) pH auf 8,3 einstellen

Tabelle 5.1 Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele (Angaben für zwei Gele).

Substanz	Sammelgel (6 % ig)	Trenngel (12 % ig)
Polyacrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1); 40 % ig	750 µL	3,0 mL
SDS (1 % ig)	300 µL	1,0 mL
Tris-HCl (1,5 mol/L), pH 8,8	-	2,8 mL
Tris-HCl (1,5 mol/L), pH 6,8	630 µL	-
H ₂ O	3,770 mL	3,2 mL
TEMED	10 µL	20 µL
APS (25 % ig)	10 µL	20 µL

Die Elektrophorese wurde zunächst für 30 min bei einer Spannung von 100 V und anschließend für 60-90 min bei 200 V betrieben. Die Färbung der Gele erfolgte mittels Silberfärbung (Empfindlichkeit <1 ng Protein pro Bande) oder *Coomassie Blue*-Färbung (Empfindlichkeit 0,1-0,2 µg Protein pro Bande).

Silber-Färbung

Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit H₂O gespült und dann für mindestens 30 min im Entfärber/Fixierer (80 mL Essigsäure, 400 mL Ethanol und 400 mL H₂O) inkubiert. Nach zweimaligem, kurzem Waschen mit H₂O wurde das Gel für 2,5 min

in *Farmers Reducer* (1 Spatelspitze $K_3[Fe(CN)_6]$ sowie 1 Spatelspitze $Na_2S_2O_3$ in 100 mL H_2O) gelegt. Anschließend wurde das Gel bis zur vollständigen Entfärbung mit H_2O gewaschen (Wechsel des Waschwassers nach jeweils 5 min). Im folgenden Schritt wurde das Gel für 30 min in einer 0,1 % (w/v) igen $AgNO_3$ -Lösung inkubiert und im Anschluss zweimal für je 30 s mit H_2O gewaschen. Ein weiterer Waschschrift erfolgte für 30 s mit einer 2,5 % (w/v) igen Na_2CO_3 -Lösung. Zur Entwicklung der Proteinbanden wurde das Gel in 100 mL einer Lösung aus 300 μ L Formaldehyd (36,5 % ig) in 2,5 % (w/v) iger Na_2CO_3 -Lösung inkubiert. Zum Stoppen der Färbung wurde das Gel für 10 min in einer 5 % (v/v) igen Essigsäure geschwenkt. Alle genannten Schritte erfolgten auf einer Rüttelplatte zur homogenen Verteilung der Lösungen auf dem Gel.

Coomassie Blue-Färbung

Zur Herstellung der Färbelösung wurde eine *Phast Gel Blue R*-Tablette in 80 mL H_2O und 120 mL Methanol gelöst und die Lösung filtriert. Nach kurzem Waschen des Gels mit H_2O wurde dieses für mindestens zwei Stunden mit der *Coomassie Blue*-Lösung gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit einer Lösung aus (30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig und 60 % (v/v) H_2O), wobei diese alle 30 min gewechselt wurde. Zum Stoppen der Entfärbung wurde das Gel in H_2O gelagert. Alle genannten Schritte erfolgten auf einer Rüttelplatte zur homogenen Verteilung der Lösungen auf dem Gel.

5.7 Bradford-Assay

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts einer Lösung wurde das Bradford-Assay durchgeführt [189]. In einer Mikrotiterplatte wurden je 10 μ L einer Probe mit 300 μ L Bradford-Reagenz (*Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit*, Pierce, Rockford, USA) versetzt und 30 s geschüttelt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 570 nm gemessen. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe von BSA verwendet und über die erstellte Kalibration von

Proteinkonzentration und gemessener Absorption die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

5.8 Aufreinigung des Fusionsproteins mittels IMAC

5.8.1 *Vivawell 8-Strips*

Für die Aufreinigung des Fusionsproteins mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC, *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) wurden im Analysenmaßstab *Vivawell 8-Strips* (Sartorius Stedim Biotech) verwendet. Für jeden Schritt wurden 300 μL der entsprechenden Lösung auf die Membran pipettiert und anschließend zentrifugiert. Dafür wurden die acht nebeneinander angeordneten Einheiten der *Vivawell 8-Strips* mit einem Lochrahmen sowie einer 96-well-Platte kombiniert und somit die jeweiligen Fraktionen aufgefangen.

Für das *Screening* der Metalle wurden neben ZnSO_4 auch NiSO_4 , CuSO_4 , CoCl_2 , FeSO_4 und CdCl_2 (jeweils 0,5 mol/L in Equilibrierungspuffer) verwendet.

Eine Übersicht der verwendeten Puffer und der Zentrifugationsbedingungen für die einzelnen Schritte gibt Tabelle 5.2. Der Zellaufschluss der Bakterien erfolgte mittels Ultraschall (siehe Abschnitt 5.5), sodass als Probenpuffer PBS verwendet wurde.

Tabelle 5.2 Übersicht der Puffer und Zentrifugationsbedingungen für *Vivawell 8-Strips*.

Puffer	Zusammensetzung	Zentrifugation
Equilibrierungspuffer	100 mmol/L Natriumacetat 500 mmol/L NaCl pH auf 4,5 einstellen	1500 g, 1 min
Metalllösung (Zn ²⁺)	0,5 mol/L ZnSO ₄ in Equilibrierungspuffer	1500 g, 1 min
Waschpuffer 1 (Probenpuffer)	PBS-Puffer (siehe Abschnitt 5.5)	1500 g, 3 min
Waschpuffer 2 (Basis-Elutionspuffer ohne Imidazol)	50 mmol/L Tris-HCl 100 mmol/L NaCl pH auf 8,0 einstellen	1500 g, 3 min
Elutionspuffer 1	50 mmol/L Tris-HCl 100 mmol/L Imidazol 100 mmol/L NaCl pH auf 8,0 einstellen	1500 g, 3 min
Elutionspuffer 2	50 mmol/L Tris-HCl 250 mmol/L Imidazol 100 mmol/L NaCl pH auf 8,0 einstellen	1500 g, 3 min

Vor der Funktionalisierung der Membran mit Zinkionen wurde zweimal mit Equilibrierungspuffer gewaschen und dann zweimal mit Metalllösung beladen. Zur Entfernung von ungebundenen Metallionen wurde erneut zweimal mit Equilibrierungspuffer gewaschen.

Für die Aufreinigung des Fusionsproteins wurde die funktionalisierte Membran zunächst zweimal mit Probenpuffer gespült, dann die Probe (lösliche Fraktion des Zelllysats 1:2 mit Probenpuffer verdünnt und filtriert) auf die Membran gegeben und für 8 min bei 300 g zentrifugiert. Die nachfolgenden Waschschrte erfolgten wie die erste Elution mit Elutionspuffer 1 jeweils nur einmal. Elutionspuffer 2 wurde sowohl für den zweiten als auch für den dritten Elutionsschritt verwendet.

5.8.2 Durchführung an der FPLC-Anlage

Für die Aufreinigung des Fusionsproteins an der FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*)-Anlage wurde eine *Sartobind™ MA IDA 75*-Einheit (Sartorius Stedim Biotech) benutzt. Der Zellaufschluss der Bakterien erfolgte mittels chemischer Lyse mit *BugBuster™ Protein Extraction Reagent* (siehe Abschnitt 5.5). Auf Grund einer telefonischen Herstellerangabe (Novagen) war bekannt, dass *BugBuster™ Protein Extraction Reagent* auf einem Tris-Puffer (100 mmol/L Tris-HCl, pH = 7,5) basiert. Vereinfachend wurde dieser Tris-Puffer näherungsweise dem Probenpuffer gleichgesetzt, da die genaue Zusammensetzung von *BugBuster™ Protein Extraction Reagent* unbekannt ist.

Eine Übersicht der verwendeten Puffer sowie der eingesetzten Volumina für die einzelnen Schritte gibt Tabelle 5.3. Die Flussrate wurde bis auf den Beladungsschritt mit Metalllösung (5 min bei 1 mL/min; 10 min bei 0,5 mL/min) konstant bei 1 mL/min gehalten.

Tabelle 5.3 Übersicht der Puffer und Volumina für die Durchführung an der FPLC.

Puffer	Zusammensetzung	Eingesetztes Volumen [mL]
Equilibrierungspuffer	100 mmol/L Natriumacetat 500 mmol/L NaCl pH auf 4,5 einstellen	10
Metalllösung (Zn ²⁺)	0,5 mol/L ZnSO ₄ in Equilibrierungspuffer	10
Waschpuffer 1	50 mmol/L Tris-HCl 20 mmol/L Imidazol pH 8,0 einstellen	5
Waschpuffer 2	50 mmol/L Tris-HCl 40 mmol/L Imidazol pH 8,0 einstellen	10
Waschpuffer 3	50 mmol/L Tris-HCl 100 mmol/L Imidazol 500 mmol/L NaCl pH 8,0 einstellen	10
Waschpuffer 4	50 mmol/L Tris-HCl 100 mmol/L Imidazol 100 mmol/L NaCl pH 8,0 einstellen	8
Elutionspuffer 1	50 mmol/L Tris-HCl 150 mmol/L Imidazol 100 mmol/L NaCl pH auf 8,0 einstellen	Siehe Text
Elutionspuffer 2	50 mmol/L Tris-HCl 400 mmol/L Imidazol 100 mmol/L NaCl pH auf 8,0 einstellen	Siehe Text

Die Probe (lösliche Fraktion des Zelllysats) wurde vor ihrer Prozessierung an der FPLC-Anlage 1:2 mit Probenpuffer (s.o.) verdünnt und filtriert. Für einen Lauf an der FPLC-Anlage wurden etwa 5 mL der so vorbereiteten Probe verwendet.

Für die Elution wurde zunächst ein linearer Gradient von 150 mmol/L auf 175 mmol/L Imidazol über 6 mL eingestellt. Die benötigten Mengen an Elutionspuffer 1 und 2 wurden automatisch durch die Pumpen angesogen und vermischt. Im Anschluss wurde isokratisch mit Elutionspuffer 2 über 12 mL eluiert.

Zur Regeneration der Membran wurde das Metall durch Spülen mit 1 mol/L H₂SO₄ (10 min) abgelöst. Die Membran wurde anschließend mit Ethanol gespült und bei 4 °C gelagert.

5.8.3 Waschfraktionen der FPLC-Aufreinigung

In Abbildung 5.2 ist die SDS-PAGE-Analyse der Waschfraktionen der optimierten Aufreinigung des Fusionsproteins an der FPLC-Anlage dargestellt (siehe Abschnitt 3.4.2).

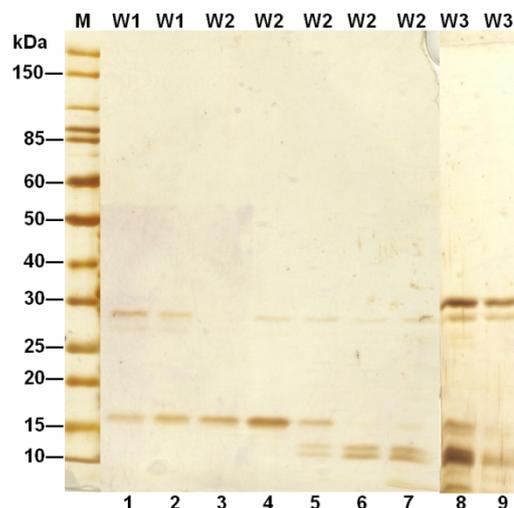


Abbildung 5.2 Waschfraktionen der optimierten IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF über eine Zn²⁺-funktionalisierte *Sartobind*TM MA IDA 75. Gezeigt sind Proben der jeweiligen Fraktionen mit Waschpuffer 1 (Spuren 1-2), Waschpuffer 2 (Spuren 3-7) und Waschpuffer 3 (Spuren 8-9). Die Zusammensetzung der einzelnen Puffer ist Abschnitt 5.8.2 zu entnehmen. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE (12 % iges Gel; Silberfärbung). M, Protein-Marker (10-200 kDa); W1, Waschpuffer 1; W2, Waschpuffer 2; W3, Waschpuffer 3.

5.9 Western Blot

Im ersten Schritt des Western Blots wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe Abschnitt 5.6), jedoch ohne Färbung des Gels. Zum Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran wurde diese zunächst mit Ethanol gewaschen und dann mit zusammen mit dem SDS-Gel sowie den Filterpapieren und Filzstücken in Transferpuffer geschwenkt. Für 60 min erfolgte der Proteintransfer bei 0,1 A pro Gel unter Eiskühlung in Transferpuffer. Die PVDF-Membran wurde 5 min mit H₂O gewaschen und dann eine Stunde in Blockpuffer inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran eine Stunde in die primäre Antikörperlösung (*Mouse-Anti-His-Tag* Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg; 1:1000 in Blockpuffer) gelegt. Nach dreimaligem Waschen (je 5 min) mit Blockpuffer wurde die Membran für eine Stunde in der sekundären Antikörperlösung (*Goat-Anti-Mouse IgG-(H+L)-Alkaline-Phosphatase-Conjugate*-Antikörper; BD Bioscience, Heidelberg; 1:3000 in TBST-Puffer) inkubiert. Die Membran wurde in mehreren Schritten gewaschen: dreimal je 5 min mit TBST-Puffer; zweimal je 10 min mit TBS-Puffer sowie einmal 5 min mit AP-Puffer. Zur Entwicklung der Banden wurde die Membran in Farbreaktionlösung (25 mL AP-Puffer und je 250 µL Farbreagenz A und B aus dem *AP Conjugate Substrate Kit* [BioRad, München; vorgemischte Lösungen aus BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphat *p*-Toluidin Salz) und NBT (*Nitro-Blue Tetrazolium Chlorid*)] gegeben. Die Färbung wurde durch den Transfer der Membran in H₂O beendet und die Membran an der Luft getrocknet.

Transferpuffer 25 mmol/L Tris-HCl
 192 mmol/L Glycin
 10 % (v/v) Ethanol
 pH auf 8,3 einstellen

TBS-Puffer 25 mmol/L Tris-HCl
 150 mmol/L NaCl
 pH auf 7,4 einstellen

<u>TBST-Puffer</u>	25 mmol/L Tris-HCl 150 mmol/L NaCl 0,5 % (v/v) Tween 20 pH auf 7,4 einstellen
<u>Blockpuffer</u>	25 mmol/L Tris-HCl 150 mmol/L NaCl 2 % (w/v) BSA 0,5 % (v/v) Tween 20 pH auf 7,4 einstellen
<u>AP-Puffer</u>	100 mmol/L Tris-HCl 100 mmol/L NaCl 5 mmol/L MgCl ₂ ·7 H ₂ O pH auf 9,5 einstellen

5.10 Protease-Inhibitoren

Zur Vermeidung der Proteolyse des Fusionsproteins (siehe Abschnitt 3.4.3) wurden drei verschiedene kommerzielle Gemische von Protease-Inhibitoren gemäß dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Es wurden folgende Inhibitoren untersucht: *Protease Inhibitor Cocktail for Use with Bacterial Cell Extracts* (P 8465, Sigma Aldrich, Steinheim), *Protease Inhibitor Cocktail for Purification of Histidine-Tagged Proteins* (P 8849, Sigma Aldrich) und *Complete Mini, EDTA-free* (Cat. No. 11836170001, Roche, Mannheim). Da jedoch keines der getesteten Gemische den gewünschten Effekt erzielte, wurde in der weiteren Prozessierung auf den Einsatz von Protease-Inhibitoren verzichtet.

5.11 Verdau des Fusionsproteins

Zur Spaltung von 46 µg Fusionsprotein TRX-mSCF (densitometrische Konzentrationsbestimmung; siehe Abschnitt 5.12) wurden 1 µL *AcTEV*TM-Protease (10 U/µL,

Cat. No 12575-015, Invitrogen, Darmstadt) und 21 μL *AcTEV*TM 20x-Puffer eingesetzt. Der Verdau erfolgte bei 4 °C für 40 Stunden. Als Substrat wurden die vereinigten Elutionsfraktionen der IMAC-Aufreinigung von TRX-mSCF verwendet.

5.12 Densitometrie

Die Konzentrationsbestimmung des Fusionsproteins erfolgte über eine densitometrische Auswertung [190]. Hierfür wurde neben der zu untersuchenden Probe ein Proteinstandard (BSA) in verschiedenen Konzentrationen auf das Polyacrylamid-Gel einer SDS-PAGE aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit *Coomassie Blue* gefärbt (siehe Abschnitt 5.6), eingescannt und über die Software *Gel-Pro Analyzer 6.0* ausgewertet. Über die bekannten Konzentrationen der BSA-Standardreihe und der von der Software bestimmten Intensitäten der zugehörigen Proteinbanden auf dem Gel konnte eine Kalibrationsgerade erstellt werden. Über lineare Regression wurde die Geradengleichung berechnet und somit die Proteinkonzentration des Fusionsproteins bestimmt.

5.13 IMAC-Aufreinigung zur Isolierung von mSCF

5.13.1 Dialyse

Das Proteingemisch aus dem Verdau des Fusionsproteins wurde vor der IMAC für 24 Stunden bei 7 °C gegen PBS-Puffer dialysiert. Die dafür verwendeten Dialyseschläuche (*Visking Tubing, Size 2, cut-off 12-14 kDa*, Medicell International, London, UK) wurden zuvor 30 min bei 80 °C in einer Lösung aus 2 % (w/v) NaHCO_3 und 1 mmol/L EDTA inkubiert. Der Schlauch wurde anschließend gründlich mit H_2O gewaschen und zur Dialyse eingesetzt.

5.13.2 Durchführung der IMAC an der FPLC-Anlage

Für die Isolierung von mSCF an der FPLC-Anlage wurde eine *Sartobind™ MA IDA* 75-Einheit (Sartorius Stedim Biotech) benutzt. Als Probe wurde das filtrierte Proteingemisch aus einem 40-stündigem Verdau des Fusionsproteins (10 mL-Ansatz) und nachfolgender Dialyse verwendet. Eine Übersicht der verwendeten Puffer sowie der eingesetzten Volumina für die einzelnen Schritte gibt Tabelle 5.4. Die Flussrate wurde bis auf den Beladungsschritt mit Metalllösung (5 min bei 1 mL/min; 10 min bei 0,5 mL/min) und der Beladung mit der Probe (0,5 ml/min) konstant bei 1 mL/min gehalten.

Tabelle 5.4 Übersicht der Puffer und Volumina für die Isolierung von mSCF an der FPLC.

Puffer	Zusammensetzung	Eingesetztes Volumen [mL]
Equilibrierungspuffer	100 mmol/L Natriumacetat 500 mmol/L NaCl pH auf 4,5 einstellen	10
Metalllösung (Zn ²⁺)	0,5 mol/L ZnSO ₄ in Equilibrierungspuffer	10
Waschpuffer	50 mmol/L Tris-HCl 40 mmol/L Imidazol pH 8,0 einstellen	5
Elutionspuffer 1	50 mmol/L Tris-HCl 150 mmol/L Imidazol 100 mmol/L NaCl pH auf 8,0 einstellen	Siehe Text
Elutionspuffer 2	50 mmol/L Tris-HCl 250 mmol/L Imidazol 100 mmol/L NaCl pH auf 8,0 einstellen	Siehe Text

Die Probe (dialysiertes Gemisch aus den Spaltprodukten des Verdau) wurde ohne Verdünnung direkt zur Aufreinigung verwendet.

Für die Elution wurde zunächst ein linearer Gradient von 150 mmol/L auf 250 mmol/L Imidazol über 4 mL eingestellt. Die benötigten Mengen an Elutionspuffer 1 und 2 wurden automatisch durch die Pumpen angesogen und vermischt. Im Anschluss wurde isokratisch mit Elutionspuffer 2 über 5 mL eluiert.

Zur Regeneration der Membran wurde das Metall durch Spülen mit 1 mol/L H₂SO₄ (10 min) abgelöst. Die Membran wurde anschließend mit Ethanol gespült und bei 4 °C gelagert.

Isoliertes mSCF aus den Durchflussfraktionen wurde steril filtriert, aliquotiert und bei -20 °C (42 µg/mL in PBS-Puffer; Zusammensetzung des Puffers siehe Abschnitt 5.5) gelagert. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren des Zytokins wurden dabei vermieden.

5.13.3 ELISA

Für die Durchführung des enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) wurde ein Kit (*mouse SCF-ELISA Kit*, Ray Biotech, Köln) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Es wurden Proteinkonzentrationen sowohl für das löslich in *E. coli* hergestellte mSCF als auch für das kommerziell erhältliche mSCF_{comm} (PeproTech, Hamburg) bestimmt. mSCF_{comm} wurde ebenfalls aus rekombinanten *E. coli* hergestellt (über die Aufarbeitung von *Inclusion Bodies*) und als Standard für die biologischen Aktivitätstests eingesetzt.

5.13.4 Bestimmung des Endotoxingehalts

Zur Detektion von Endotoxinen wurde die Probe mittels LAL-Test (*Endosafe-PTSTM*, Charles River Laboratories, Boston, MA, USA) gemäß den Herstellerangaben untersucht.

5.14 Biologische Testung von mSCF

5.14.1 Zellkultur

Alle biologischen Tests wurden unter Verwendung der humanen Zelllinie M-07e (DMSZ, Braunschweig) durchgeführt. Die Zellen wurden in IMDM-Medium (Biochrome AG, Berlin) mit 20 % (v/v) fetalem Kälberserum (PAA Laboratories GmbH, Cölbe), 2 % (v/v) L-Glutamin (200 mmol/L Stammlösung; PAA Laboratories GmbH) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100x Stammlösung; PAA Laboratories GmbH) kultiviert.

Zur Erhaltung der Zellen in der Suspensionskultur wurden die M-07e-Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert und mit einer Zelldichte von etwa 5×10^5 Zellen/mL und unter Zugabe von 520 ng/mL mSCF_{comm} (PeproTech) neu ausplattiert. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37 °C unter 5 % CO₂/95 % Luft. Die Zellzahlen wurden jeweils durch mikroskopische Zählungen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Alle Kultivierungsversuche wurden von mir in den Laboratorien der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH, Experimentelle Hämatologie, Abteilung Prof. Christopher Baum) in den Gruppen von Dr. Johann Meyer und von Dr. Dr. Axel Schambach durchgeführt.

5.14.2 Kurzzeit-Proliferations-Assay

Die biologische Aktivität von mSCF und TRX-mSCF im Vergleich zu mSCF_{comm} wurde anhand eines Zellproliferations-Assays mit löslichem Formazan (*CellTiter96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega, Mannheim) untersucht. Der Assay basiert auf der enzymatischen Reduktion eines Tetrazolium basierten Substratgemisches (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium („MTS“) und Phenazin Ethosulfat („PES oder Owen Reagenz“) durch vitale, proliferierende Zellen zu einem farbigen Formazankomplex. Durch die Löslichkeit des entstehenden Farbkomplexes ist dieses Assay im Gegensatz zum MTT-Assay auch für Suspensionszellen geeignet. Eine

Quantifizierung der metabolisch aktiven Zellen erfolgt durch Messung der Absorption bei 490 nm.

Zur Durchführung des Assays wurde gemäß den Herstellerangaben vorgegangen; wobei alle Ansätze in Fünffachbestimmung untersucht wurden. Die Zellen wurden zunächst dreimal mit PBS-Puffer (Dulbecco's PBS ohne Ca/Mg, PAA Laboratories GmbH) mittels Zentrifugation (311 g, 10 min) gewaschen. Anschließend wurden die M-07e-Zellen in neuem Medium resuspendiert, in 96er-Mikrotiterplatten (Greiner Bio One, Frickenhausen) ausplattiert und separat mit den zu untersuchenden Zytokinen für 36 Stunden inkubiert. Dabei wurden die Zytokine jeweils mit einer Konzentration von 520 ng/mL eingesetzt. Vier Stunden nach der Zugabe des Tetrazolium basierten Substratgemisches wurde die Absorption als Maß für die Anzahl der proliferierenden Zellen gemessen.

5.14.3 EC₅₀-Bestimmung

Zur Bestimmung der EC₅₀-Werte von löslich in *E. coli* hergestelltem mSCF und dem kommerziellen Standard mSCF_{comm} wurde der unter 5.14.2 beschriebene Kurzzeit-Proliferations-Assay mit *CellTiter96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* durchgeführt. Beide Zytokine wurden in verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 20 ng/mL-1000 ng/mL eingesetzt und die resultierenden Absorptionen gemessen. Die Berechnung der EC₅₀-Werte erfolgte auf Basis der erhaltenen Daten [191].

5.14.4 Langzeit-Proliferations-Assay

Die M-07e-Zellen wurden zunächst dreimal mit PBS-Puffer (Dulbecco's PBS ohne Ca/Mg, PAA Laboratories GmbH) mittels Zentrifugation (311 g, 10 min) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in neuem Medium resuspendiert und mit einer Konzentration von 4.5×10^5 Zellen/mL in 12er-Mikrotiterplatten (Greiner Bio One) ausplattiert. mSCF_{comm} wurde in Konzentrationen von 520 ng/mL und 260 ng/mL eingesetzt; für das löslich in *E. coli* hergestellte mSCF wurden Konzentrationen von

417 ng/mL, 84 ng/mL und 42 ng/mL verwendet. Das Gesamtvolumen in einem Well betrug 1 mL und alle Ansätze wurden in Dreifachbestimmung untersucht.

Die M-07e-Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen alle zwei bis drei Tage passagiert. Dabei wurden die Zellen stets wieder mit einer Zellzahl von 4.5×10^5 Zellen/mL ausgesät und das jeweilige Zytokin in den oben angegebenen Konzentrationen zugegeben. Die Zellzahlen wurden durch Auszählen am Mikroskop unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Ermittlung des Verlaufs der Zellzahlen über den Zeitraum des gesamten Experiments wurden die jeweiligen Verdünnungen der Zellpopulationen durch das Passagieren berücksichtigt.

5.14.5 Morphologische Untersuchungen der M-07e-Zellen

Nach Beendigung des Langzeit-Proliferations-Assays wurden die Zellen über Zentrifugation (10 min, 72 g, Shandon Cytospin-Zentrifuge, Thermo Electron Corporation, Pittsburgh, PA, USA) auf Objektträger immobilisiert. Nach Trocknung der Präparate wurde eine Färbung nach der Pappenheim-Methode [192] durchgeführt. Zellkerne erscheinen bei dieser Färbemethode bläulich-violett; das Zytoplasma wird blau angefärbt.

Die Präparate wurden zunächst für 5 min in unverdünnter May-Grünwald-Lösung inkubiert, gründlich mit H₂O gewaschen und 30 min in Giemsa Lösung (5 % (v/v) Giemsa Stammlösung) inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit H₂O gewaschen, getrocknet und zur Konservierung mit einem Tropfen Roti-Histokitt versehen sowie mit einem Glasplättchen abgedeckt. Nach der Trocknung der Präparate konnten diese unter einem hochauflösenden Mikroskop analysiert werden.

5.15 Kultivierung im Bioreaktor

5.15.1 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung erfolgte in einem 2 L-Bioreaktor (*Biostat A Plus*, Sartorius Stedim Biotech) bei 37 °C und in definiertem Medium (siehe Abschnitt 5.3; Verwendung

von 20 g/L Glukose). Nach Vorlage des Kulturmediums, Ampicillin (75 µg/mL) und 0,1 mL/L Antischaummittel wurde der Bioreaktor mit der Vorkultur angeimpft; das Gesamtkulturvolumen lag bei 1,5 L. Die Induktion erfolgte mit 0,1 mmol/L IPTG bei einer OD von 6.

Für die Vorkultur wurden mehrere Schüttelkolben (100 mL, vier Schikanen) in LB-Medium wie unter Abschnitt 5.3 beschrieben vorbereitet (30 °C, 130 rpm). Die Inokulation des Reaktors erfolgte bei einer OD von 0,3. Dafür wurde die entsprechend benötigte Menge an Vorkultur vereinigt, 5 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (4000 g, 15 min, 4 °C) und in gekühltem, definierten Medium resuspendiert.

Die Kultivierung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur:	37 °C
pH-Wert:	6,9 (Regelung mit 1 mol/L NaOH und 1 mol/L HCl)
Sauerstoffsättigung:	80 %
Rührgeschwindigkeit:	200-1350 rpm (zur Regelung des Gelöstsauerstoffs)
Begasung (Druckluft):	1,5 L/min

Der Prozessverlauf wurde sowohl über das *Biostat*-System (Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffsättigung und Begasung) als auch die *RISP*-Software (Abgas CO₂ und O₂) *online* verfolgt. Die *offline*-bestimmten Größen waren der OD-Wert und die BTM (siehe Abschnitt 5.4), sowie die jeweiligen Acetat- und Glukosekonzentrationen (Bestimmung über eine HPLC-Analyse, siehe Abschnitt 5.15.2). Die Produktbildung wurde durch eine SDS-PAGE-Analyse ebenfalls *offline* untersucht, wobei die Proben wie in 5.5 beschrieben aufgeschlossen wurden.

5.15.2 HPLC-Analytik

Die Konzentrationsbestimmung von Glukose und Acetat erfolgte mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*). Zur Erstellung der jeweiligen Kalibration wurden vor der Proben-

analyse Standardreihen von Glukose und Acetat angesetzt und vermessen. Es wurden folgende Bedingungen verwendet:

Chromatographie-Säule:	Aminex HPX-87h, 300 x 7,8 mm (BioRad)
Flussrate:	0,8 mL/min
Temperatur:	65 °C
Eluent:	5 mmol/L H ₂ SO ₄
Detektion:	Brechungsindex-Detektor
Analysenzeit:	20 min/Probe

5.15.3 Berechnung der Sauerstofftransferrate

Zur Berechnung der Sauerstofftransferrate (OTR, *Oxygen Transfer Rate*) wurde folgende Formel verwendet:

$$OTR = \frac{M_{O_2} \dot{V}_{in}}{V_{ideal} V_{Reaktor}} \cdot \left(\frac{X_{in} Q_2 - X_{out} Q_2}{100} \right) \cdot \left(\frac{100 - X_{in} Q_2 - X_{in} CO_2}{100 - X_{out} Q_2 - X_{out} CO_2} \right)$$

- X_{in} Prozentualer Anteil der Gaskomponente am Reaktoreingang
- X_{out} Prozentualer Anteil der Gaskomponente am Reaktorausgang
- $V_{Reaktor}$ Reaktorvolumen
- V_{ideal} Ideales Gasvolumen der Komponente bei Reaktortemperatur
- M Molmasse der Komponente
- \dot{V}_{in} Volumenstrom der Reaktorbelegung

5.16 Chemikalien/Reagenzien, Materialien, Geräte

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
2-Mecaptoethanol	Fluka Chemie AG, Seelze
Agar	Carl Roth GmbH& Co, Karlsruhe
Benzonase, 2,5 kU, Purity>90 %, (Cat. No 70746-4)	Novagen/Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Desmophen 3900</i> (Antischaummittel)	Bayer AG, Leverkusen
EDTA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH& Co, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Fluka Chemie AG, Seelze
Formaldehyd (36,5 % ig)	Fluka Chemie AG, Seelze
Giemsa Lösung	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hefe-Extrakt	Carl Roth GmbH& Co, Karlsruhe
Imidazol	Fluka Chemie AG, Seelze
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Fluka Chemie AG, Seelze
Lysozym (aus Hühnereiweis, 62971)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
May-Grünwald-Lösung	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Carl Roth GmbH& Co, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt

Natriumthiosulfat	Fluka Chemie AG, Seelze
Chemikalie/Reagenz	Hersteller
<i>O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix 100-10000 bp (SM 1173)</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>PageRuler™ Prestained 10-170 kDa (SM 0671)</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>PageRuler™ Unstained 10-200 kDa (SM 0661)</i>	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>PhastGel Blue R</i> Tablette (17-0518-01)	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Polyacrylamid/Bisacrylamid-Mischung (37,5:1); 40 % ig	Carl Roth GmbH& Co, Karlsruhe
Roti-Histokitt	Carl Roth GmbH& Co, Karlsruhe
SDS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Silbernitrat	Carl Roth GmbH& Co, Karlsruhe
TEMED	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-HCl	Merck kGaA, Darmstadt
Triton-X-100	Merck kGaA, Darmstadt
Tryptone Plus	Fluka Chemie AG, Seelze
Material	Hersteller
Eppendorf-Hütchen, Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Falcon Tubes, 15 mL und 50 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen, Spitzentyp A, B, D	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter Minisart 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Analytik AC 210S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Autoklav Systec V-150	Systec GmbH, Wettengel
FPLC-Anlage BioLogic AVR7-3	BioRad Laboratories Inc., München
HPLC-Anlage	Merck kGaA, Darmstadt; Hitachi Europe GmbH, München
pH-Elektrode	Checker [®] Hanna Instruments Ltd, Leight on Buzzard, UK
Photospektrometer „Multiskan“	Thermolabsystems GmbH, Langenselbold
Pipetten Research [®]	Eppendorf AG, Hamburg
Rüttelplatte	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Thermomixer „Compact“	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschall-Sonde Labsonic M	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Vortex-Mixer	VM-300 NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
Zeiss AxioImager.M1	Carl Zeiss AG, Göttingen
Zentrifuge „Centrifuge 5415 C“	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge „Multifuge 3s“	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zweikanal-Spektralphotometer für OD- Messung (Uvicon 940)	Kontron Embedded Computers GmbH, Neufahrn

6 Literaturverzeichnis

- [1] Loppnow, H., *Cytokines: Classification, receptors and action mechanisms*. Internist, 2001. **42**(1): p. 13-27.
- [2] Klouche, M., *Zytokine-Ein zweischneidiges Schwert in der Pathogenese und der Therapie von Krebserkrankungen*. Bundesgesundheitsbla, 2003. **46**(3): p. 203-10.
- [3] Ogawa, M., *Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells*. Blood, 1993. **81**(11): p. 2844-53.
- [4] Metcalf, D., *The granulocyte-macrophage colony stimulating factors*. Cell, 1985. **43**(1): p. 5-6.
- [5] Lyman, S.D. and S.E. Jacobsen, *c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities*. Blood, 1998. **91**(4): p. 1101-34.
- [6] Zsebo, K.M., et al., *Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium*. Cell, 1990. **63**(1): p. 195-201.
- [7] Nocka, K., et al., *Candidate ligand for the c-kit transmembrane kinase receptor: KL, a fibroblast derived growth factor stimulates mast cells and erythroid progenitors*. EMBO J, 1990. **9**(10): p. 3287-94.
- [8] Zsebo, K.M., et al., *Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor*. Cell, 1990. **63**(1): p. 213-24.
- [9] Witte, O.N., *Steel locus defines new multipotent growth factor*. Cell, 1990. **63**(1): p. 5-6.
- [10] Williams, D.E., et al., *Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogene*. Cell, 1990. **63**(1): p. 167-74.
- [11] Martin, F.H., et al., *Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs*. Cell, 1990. **63**(1): p. 203-11.
- [12] Huang, E., et al., *The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl-locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene-product of the W-locus* Cell 1990. **63**(1): p. 225-33.
- [13] Copeland, N.G., et al., *Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles*. Cell, 1990. **63**(1): p. 175-83.
- [14] Blouin, R. and A. Bernstein, *Clinical disorders and Experimental Models of Erythropoietic Failure*. The white spotting and steel hereditary anemias of the mouse, ed. M. Freedman and S. Feig. 1993, Boca Raton, USA.
- [15] Sette, C., et al., *The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells*. Int J Dev Biol, 2000. **44**(6): p. 599-608.
- [16] Huang, E.J., et al., *Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2*. Mol Biol Cell, 1992. **3**(3): p. 349-62.
- [17] Wang, C.H., et al., *Stem cell factor attenuates vascular smooth muscle apoptosis and increases intimal hyperplasia after vascular injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(3): p. 540-7.

- [18] Domen, J. and I.L. Weissman, *Hematopoietic stem cells need two signals to prevent apoptosis; BCL-2 can provide one of these, Kitl/c-Kit signaling the other.* J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1707-18.
- [19] Metcalf, D., *Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety?* Blood, 1993. **82**(12): p. 3515-23.
- [20] Leary, A.G., et al., *Growth factor requirements for survival in G0 and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**(9): p. 4013-7.
- [21] Wershil, B.K., et al., *The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces c-kit receptor-dependent mouse mast cell activation in vivo. Evidence that signaling through the c-kit receptor can induce expression of cellular function.* J Exp Med, 1992. **175**(1): p. 245-55.
- [22] Fleming, W.H., et al., *Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**(8): p. 3760-4.
- [23] Matsui, J., et al., *Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells.* J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18600-7.
- [24] Levesque, J.P., et al., *Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins.* J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1805-15.
- [25] Ashman, L.K., *The biology of stem cell factor and its receptor C-kit.* Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(10): p. 1037-51.
- [26] Gilfillan, A.M. and J. Rivera, *The tyrosine kinase network regulating mast cell activation.* Immunol Rev, 2009. **228**(1): p. 149-69.
- [27] Tsai, M., et al., *Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991. **88**(14): p. 6382-6.
- [28] Rodewald, H.R., et al., *Intrathymically expressed c-kit ligand (stem cell factor) is a major factor driving expansion of very immature thymocytes in vivo.* Immunity, 1995. **3**(3): p. 313-9.
- [29] Brugger, W., et al., *Reconstitution of hematopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo.* N Engl J Med, 1995. **333**(5): p. 283-7.
- [30] Rennick, D., et al., *Cofactors are essential for stem cell factor-dependent growth and maturation of mast cell progenitors: comparative effects of interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-10, and fibroblasts.* Blood, 1995. **85**(1): p. 57-65.
- [31] Lemoli, R.M., et al., *Stem cell factor (c-kit ligand) enhances the interleukin-9-dependent proliferation of human CD34+ and CD34+CD33-DR- cells.* Exp Hematol, 1994. **22**(9): p. 919-23.
- [32] Bernstein, I.D., R.G. Andrews, and K.M. Zsebo, *Recombinant human stem cell factor enhances the formation of colonies by CD34+ and CD34+lin-cells, and the generation of colony-forming cell progeny from CD34+lin-cells cultured with interleukin-3, granulocyte colony-stimulating factor, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.* Blood, 1991. **77**(11): p. 2316-21.
- [33] Broudy, V.C., N.L. Lin, and K. Kaushansky, *Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro.* Blood, 1995. **85**(7): p. 1719-26.

- [34] Kobayashi, M., et al., *Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3*. Blood, 1996. **88**(2): p. 429-36.
- [35] Pesce, M., et al., *Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis)*. Development, 1993. **118**(4): p. 1089-94.
- [36] Metcalfe, D.D., D. Baram, and Y.A. Mekori, *Mast cells*. Physiol Rev, 1997. **77**(4): p. 1033-79.
- [37] Wu, H., et al., *Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**(5): p. 1806-10.
- [38] Valent, P., et al., *Induction of differentiation of human mast cells from bone marrow and peripheral blood mononuclear cells by recombinant human stem cell factor/kit-ligand in long-term culture*. Blood, 1992. **80**(9): p. 2237-45.
- [39] Caceres-Cortes, J., et al., *Product of the steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor*. J Biol Chem, 1994. **269**(16): p. 12084-91.
- [40] Li, C.L. and G.R. Johnson, *Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells*. Blood, 1994. **84**(2): p. 408-14.
- [41] Lennartsson, J. and L. Ronnstrand, *The stem cell factor receptor/c-Kit as a drug target in cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2006. **6**(1): p. 65-75.
- [42] Liu, H., et al., *Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases*. EMBO J, 2007. **26**(3): p. 891-901.
- [43] Jensen, B.M., C. Akin, and A.M. Gilfillan, *Pharmacological targeting of the KIT growth factor receptor: a therapeutic consideration for mast cell disorders*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(8): p. 1572-82.
- [44] Wang, Z.Q., et al., *Gain-of-function mutation of KIT ligand on melanin synthesis causes familial progressive hyperpigmentation*. Am J Hum Genet, 2009. **84**(5): p. 672-7.
- [45] Heinrich, M.C., et al., *Constitutive expression of steel factor gene by human stromal cells*. Blood, 1993. **82**(3): p. 771-83.
- [46] Linenberger, M.L., et al., *Stem cell factor production by human marrow stromal fibroblasts*. Exp Hematol, 1995. **23**(10): p. 1104-14.
- [47] Longley, B.J., Jr., et al., *Altered metabolism of mast-cell growth factor (c-kit ligand) in cutaneous mastocytosis*. N Engl J Med, 1993. **328**(18): p. 1302-7.
- [48] Klimpel, G.R., et al., *A role for stem cell factor (SCF): c-kit interaction(s) in the intestinal tract response to Salmonella typhimurium infection*. J Exp Med, 1996. **184**(1): p. 271-6.
- [49] Kassel, O., C. da Silva, and N. Frossard, *The stem cell factor, its properties and potential role in the airways*. Pulm Pharmacol Ther, 2001. **14**(4): p. 277-88.
- [50] deCastro, C.M., et al., *The c-kit proto-oncogene receptor is expressed on a subset of human CD3-CD4-CD8- (triple-negative) thymocytes*. Exp Hematol, 1994. **22**(10): p. 1025-33.
- [51] Hollenbeck, S.T., et al., *Stem cell factor and c-kit are expressed by and may affect vascular SMCs through an autocrine pathway*. J Surg Res, 2004. **120**(2): p. 288-94.

- [52] Langley, K.E., et al., *Soluble stem cell factor in human serum*. Blood, 1993. **81**(3): p. 656-60.
- [53] Anderson, D.M., et al., *Alternate splicing of mRNAs encoding human mast cell growth factor and localization of the gene to chromosome 12q22-q24*. Cell Growth Differ, 1991. **2**(8): p. 373-8.
- [54] Anderson, D.M., et al., *Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms*. Cell, 1990. **63**(1): p. 235-43.
- [55] Smith, M.A., C.J. Pallister, and J.G. Smith, *Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice*. Acta Haematol, 2001. **105**(3): p. 143-50.
- [56] Langley, K.E., et al., *Properties of variant forms of human stem cell factor recombinantly expressed in Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys, 1994. **311**(1): p. 55-61.
- [57] Flanagan, J.G., D.C. Chan, and P. Leder, *Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant*. Cell, 1991. **64**(5): p. 1025-35.
- [58] Welker, P., et al., *Human mast cells produce and differentially express both soluble and membrane-bound stem cell factor*. Scand J Immunol, 1999. **49**(5): p. 495-500.
- [59] Toksoz, D., et al., *Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor*. Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**(16): p. 7350-4.
- [60] Galli, M.C., et al., *The biology of stem cell factor, a new hematopoietic growth factor involved in stem cell regulation*. Int J Clin Lab Res, 1993. **23**(2): p. 70-7.
- [61] Marziali, G., D. Lazzaro, and V. Sorrentino, *Binding of germ cells to mutant Sld Sertoli cells is defective and is rescued by expression of the transmembrane form of the c-kit ligand*. Dev Biol, 1993. **157**(1): p. 182-90.
- [62] Miyazawa, K., et al., *Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form*. Blood, 1995. **85**(3): p. 641-9.
- [63] Langley, K.E., et al., *Purification and characterization of soluble forms of human and rat stem cell factor recombinantly expressed by Escherichia coli and by Chinese hamster ovary cells*. Arch Biochem Biophys, 1992. **295**(1): p. 21-8.
- [64] Lu, H.S., et al., *Post-translational processing of membrane-associated recombinant human stem cell factor expressed in Chinese hamster ovary cells*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**(1): p. 150-8.
- [65] Arakawa, T., et al., *Glycosylated and unglycosylated recombinant-derived human stem cell factors are dimeric and have extensive regular secondary structure*. J Biol Chem, 1991. **266**(28): p. 18942-8.
- [66] Flanagan, J.G. and P. Leder, *The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts*. Cell, 1990. **63**(1): p. 185-94.
- [67] Matous, J.V., K. Langley, and K. Kaushansky, *Structure-function relationships of stem cell factor: an analysis based on a series of human-murine stem cell factor chimera and the mapping of a neutralizing monoclonal antibody*. Blood, 1996. **88**(2): p. 437-44.
- [68] Zhang, Z., et al., *Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation*. Proc Natl Acad Sci USA, 2000. **97**(14): p. 7732-7.

- [69] Jones, M.D., et al., *Refolding and oxidation of recombinant human stem cell factor produced in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1996. **271**(19): p. 11301-8.
- [70] Broudy, V.C., *Stem cell factor and hematopoiesis*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1345-64.
- [71] Lu, H.S., et al., *Spontaneous dissociation-association of monomers of the human-stem-cell-factor dimer*. Biochem J, 1995. **305** (Pt 2): p. 563-8.
- [72] Lu, H.S., et al., *Isolation and characterization of a disulfide-linked human stem cell factor dimer. Biochemical, biophysical, and biological comparison to the noncovalently held dimer*. J Biol Chem, 1996. **271**(19): p. 11309-16.
- [73] Pandit, J., et al., *Three-dimensional structure of dimeric human recombinant macrophage colony-stimulating factor*. Science, 1992. **258**(5086): p. 1358-62.
- [74] Menziani, M.C., F. Fanelli, and P.G. De Benedetti, *Computational simulations of stem-cell factor/c-kit receptor interaction*. Proteins, 1996. **26**(1): p. 42-54.
- [75] Bazan, J.F., *Genetic and structural homology of stem cell factor and macrophage colony-stimulating factor*. Cell, 1991. **65**(1): p. 9-10.
- [76] Glocker, M.O., et al., *Assignment of the inter- and intramolecular disulfide linkages in recombinant human macrophage colony stimulating factor using fast atom bombardment mass spectrometry*. Biochemistry, 1993. **32**(2): p. 482-8.
- [77] Lyman, S.D., et al., *Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells*. Cell, 1993. **75**(6): p. 1157-67.
- [78] Hannum, C., et al., *Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs*. Nature, 1994. **368**(6472): p. 643-8.
- [79] Qiu, F.H., et al., *Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus*. EMBO J, 1988. **7**(4): p. 1003-11.
- [80] Russell, E.S., *Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists*. Adv Genet, 1979. **20**: p. 357-459.
- [81] Yarden, Y., et al., *Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand*. EMBO J, 1987. **6**(11): p. 3341-51.
- [82] Hubbard, S.R. and J.H. Till, *Protein tyrosine kinase structure and function*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 373-98.
- [83] Vandenbark, G.R., et al., *Cloning and structural analysis of the human c-kit gene*. Oncogene, 1992. **7**(7): p. 1259-66.
- [84] d'Auriol, L., et al., *Localization of the human c-kit protooncogene on the q11-q12 region of chromosome 4*. Hum Genet, 1988. **78**(4): p. 374-6.
- [85] Brizzi, M.F., et al., *Protein kinase C-dependent release of a functional whole extracellular domain of the mast cell growth factor (MGF) receptor by MGF-dependent human myeloid cells*. Oncogene, 1994. **9**(6): p. 1583-9.
- [86] Nocka, K., et al., *Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice*. Genes Dev, 1989. **3**(6): p. 816-26.
- [87] Broudy, V.C., et al., *Human umbilical vein endothelial cells display high-affinity c-kit receptors and produce a soluble form of the c-kit receptor*. Blood, 1994. **83**(8): p. 2145-52.

- [88] Gari, M., et al., *c-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 1999. **105**(4): p. 894-900.
- [89] Blechman, J.M., et al., *The fourth immunoglobulin domain of the stem cell factor receptor couples ligand binding to signal transduction*. Cell, 1995. **80**(1): p. 103-13.
- [90] Philo, J.S., et al., *Human stem cell factor dimer forms a complex with two molecules of the extracellular domain of its receptor, Kit*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 6895-902.
- [91] Lemmon, M.A., et al., *Kit receptor dimerization is driven by bivalent binding of stem cell factor*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6311-7.
- [92] Blechman, J.M. and Y. Yarden, *Structural aspects of receptor dimerization. c-kit as an example*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **766**: p. 344-62.
- [93] Funasaka, Y., et al., *c-Kit-kinase induces a cascade of protein tyrosine phosphorylation in normal human melanocytes in response to mast cell growth factor and stimulates mitogen-activated protein kinase but is down-regulated in melanomas*. Mol Biol Cell, 1992. **3**(2): p. 197-209.
- [94] Andrews, R.G., et al., *A c-kit ligand, recombinant human stem cell factor, mediates reversible expansion of multiple CD34+ colony-forming cell types in blood and marrow of baboons*. Blood, 1992. **80**(4): p. 920-7.
- [95] Blaise, D., et al., *Rescue of haemopoiesis by a combination of growth factors including stem-cell factor*. Lancet, 2000. **356**(9238): p. 1325-6.
- [96] Lange, W., R. Henschler, and R. Mertelsmann, *Biological and clinical advances in stem cell expansion*. Leukemia, 1996. **10**(6): p. 943-5.
- [97] Emerson, S.G., *Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics*. Blood, 1996. **87**(8): p. 3082-8.
- [98] Dunbar, C.E., et al., *Improved retroviral gene transfer into murine and Rhesus peripheral blood or bone marrow repopulating cells primed in vivo with stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**(21): p. 11871-6.
- [99] Bodine, D.M., et al., *Efficient retrovirus transduction of mouse pluripotent hematopoietic stem cells mobilized into the peripheral blood by treatment with granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor*. Blood, 1994. **84**(5): p. 1482-91.
- [100] Dick, J.E., et al., *Gene transfer into normal human hematopoietic cells using in vitro and in vivo assays*. Blood, 1991. **78**(3): p. 624-34.
- [101] McNiece, I.K. and R.A. Briddell, *Stem cell factor*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(1): p. 14-22.
- [102] Kojima, S., T. Matsuyama, and Y. Kodera, *Plasma levels and production of soluble stem cell factor by marrow stromal cells in patients with aplastic anaemia*. Br J Haematol, 1997. **99**(2): p. 440-6.
- [103] Philpott, N.J., et al., *Increased apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance*. Exp Hematol, 1995. **23**(14): p. 1642-8.
- [104] Costa, J.J., et al., *Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2681-6.
- [105] Weaver, A., et al., *Increased numbers of long-term culture-initiating cells in the apheresis product of patients randomized to receive increasing doses of stem cell factor administered in combination with chemotherapy and a*

- standard dose of granulocyte colony-stimulating factor*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3323-8.
- [106] Smith, M.A., E.L. Court, and J.G. Smith, *Stem cell factor: laboratory and clinical aspects*. Blood Rev, 2001. **15**(4): p. 191-7.
- [107] Lyman, S.D. and D.E. Williams, *Biological activities and potential therapeutic uses of steel factor. A new growth factor active on multiple hematopoietic lineages*. Am J Pediatr Hematol Oncol, 1992. **14**(1): p. 1-7.
- [108] Brandt, J., et al., *Role of c-kit ligand in the expansion of human hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1992. **79**(3): p. 634-41.
- [109] Oehler, L., et al., *Culture requirements for induction of dendritic cell differentiation in acute myeloid leukemia*. Ann Hematol, 2000. **79**(7): p. 355-62.
- [110] Fleischman, R.A., *From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development*. Trends Genet, 1993. **9**(8): p. 285-90.
- [111] Majumdar, M.K., et al., *Identification and mutation of primary and secondary proteolytic cleavage sites in murine stem cell factor cDNA yields biologically active, cell-associated protein*. J Biol Chem, 1994. **269**(2): p. 1237-42.
- [112] Wang, C., et al., *Solubilization and refolding with simultaneous purification of recombinant human stem cell factor*. Appl Biochem Biotechnol, 2008. **144**(2): p. 181-9.
- [113] Lili, W., W. Chaozhan, and G. Xindu, *Expression, renaturation and simultaneous purification of recombinant human stem cell factor in Escherichia coli*. Biotechnol Lett, 2006. **28**(13): p. 993-7.
- [114] Potala, S. and R.S. Verma, *A Novel Fusion Protein Diphtheria Toxin-Stem Cell Factor (DT-SCF)-Purification and Characterization*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010. **162**(5): p. 1258-69.
- [115] Su, L., et al., *Cloning and expression of human stem cell factor fused with thrombopoietin mimetic peptide in Escherichia coli*. Biotechnol Lett, 2006. **28**(12): p. 857-62.
- [116] Zang, Y., et al., *Expression, refolding, and characterization of recombinant thrombopoietin/stem cell factor fusion protein in Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **74**(4): p. 836-42.
- [117] LaVallie, E.R., et al., *A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(2): p. 187-93.
- [118] Esposito, D. and D.K. Chatterjee, *Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags*. Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(4): p. 353-8.
- [119] Choi, J., K. Keum, and S. Lee, *Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli*. Chem Eng Sci 2006. **61**(3): p. 876-85.
- [120] Sorensen, H.P. and K.K. Mortensen, *Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli*. J Biotechnol, 2005. **115**(2): p. 113-28.
- [121] Baneyx, F., *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(5): p. 411-21.
- [122] Sorensen, H.P. and K.K. Mortensen, *Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli*. Microb Cell Fact, 2005. **4**(1): p. 1-8.
- [123] Villaverde, A. and M.M. Carrio, *Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies*. Biotechnol Lett, 2003. **25**(17): p. 1385-95.

- [124] Kapust, R.B. and D.S. Waugh, *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci*, 1999. **8**(8): p. 1668-74.
- [125] Panda, A.K., *Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2003. **85**: p. 43-93.
- [126] Fahner, B., H. Lilie, and P. Neubauer, *Inclusion bodies: formation and utilisation*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004. **89**: p. 93-142.
- [127] Schroder, H., et al., *DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage*. *EMBO J*, 1993. **12**(11): p. 4137-44.
- [128] Nelson, D. and M. Cox, *Lehninger Biochemie*. Vol. 3. Auflage. 2001, Berlin: Springer-Lehrbuch.
- [129] Georgiou, G. and P. Valax, *Expression of correctly folded proteins in Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1996. **7**(2): p. 190-7.
- [130] Singh, S.M. and A.K. Panda, *Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins*. *J Biosci Bioeng*, 2005. **99**(4): p. 303-10.
- [131] Bessette, P.H., et al., *Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999. **96**(24): p. 13703-8.
- [132] de Marco, A., *Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2009. **8**: p. 26-43.
- [133] Alberts, B., et al., *Molekularbiologie der Zelle*. Vol. 2. 1990, Weinheim: Wiley-VCH
- [134] Stewart, E.J., F. Aslund, and J. Beckwith, *Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins*. *EMBO J*, 1998. **17**(19): p. 5543-50.
- [135] Prinz, W.A., et al., *The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(25): p. 15661-7.
- [136] Takashi, Y., et al., *Increase of solubility of foreign proteins in Escherichia coli by coproduction of the bacterial thioredoxin*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(43): p. 25328-31.
- [137] Schein, C.H., *Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria*. *Bio-Technology*, 1989. **7**(11): p. 1141-7.
- [138] Weickert, M.J., et al., *Optimization of heterologous protein production in Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 1996. **7**(5): p. 494-9.
- [139] Wang, X., et al., *Evaluation of different culture conditions for high-level soluble expression of human cyclin A2 with pET vector in BL21 (DE3) and spectroscopic characterization of its inclusion body structure*. *Protein Expr Purif*, 2007. **56**(1): p. 27-34.
- [140] Nallamsetty, S. and D.S. Waugh, *Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners*. *Protein Expr Purif*, 2006. **45**(1): p. 175-82.
- [141] Fox, J.D. and D.S. Waugh, *Maltose-binding protein as a solubility enhancer*. *Methods Mol Biol*, 2003. **205**: p. 99-117.
- [142] Davis, G.D., et al., *New fusion protein systems designed to give soluble expression in Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1999. **65**(4): p. 382-8.
- [143] Nygren, P.A., S. Stahl, and M. Uhlen, *Engineering proteins to facilitate bioprocessing*. *Trends Biotechnol*, 1994. **12**(5): p. 184-8.

- [144] Tokunaga, H., et al., *Halophilic beta-lactamase as a new solubility- and folding-enhancing tag protein: production of native human interleukin 1alpha and human neutrophil alpha-defensin*. Appl Microbiol Biotechnol, 2009. **86**(2): p. 649-58.
- [145] Zhang, Y.B., et al., *Protein aggregation during overexpression limited by peptide extensions with large net negative charge*. Protein Expr Purif, 2004. **36**(2): p. 207-16.
- [146] Marblestone, J.G., et al., *Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO*. Protein Sci, 2006. **15**(1): p. 182-9.
- [147] Zhang, Z., et al., *Overexpression of DsbC and DsbG markedly improves soluble and functional expression of single-chain Fv antibodies in Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2002. **26**(2): p. 218-28.
- [148] Zhao, Y., et al., *Multi-antigen immunization using IgG binding domain ZZ as carrier*. Vaccine, 2005. **23**(43): p. 5082-90.
- [149] Lee, C., et al., *The soluble expression of the protein using fusion partners: Thioredoxin, maltose binding human renin binding a comparison of ubiquitin, protein and NusA*. Biotechnol Bioprocess E, 2003. **8**(2): p. 89-93.
- [150] Meyer, M., et al., *Thioredoxin elicits a new dihydrolipoamide dehydrogenase activity by interaction with the electron-transferring flavoprotein in Clostridium litoralis and Eubacterium acidaminophilum*. J Bacteriol, 1991. **173**(4): p. 1509-13.
- [151] Yasukawa, T., et al., *Increase of solubility of foreign proteins in Escherichia coli by coproduction of the bacterial thioredoxin*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25328-31.
- [152] Jurado, P., V. de Lorenzo, and L.A. Fernandez, *Thioredoxin fusions increase folding of single chain Fv antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli: Evidence that chaperone activity is the prime effect of thioredoxin*. J Mol Biol, 2006. **357**(1): p. 49-61.
- [153] Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.
- [154] Kochetkov, S.N., E.E. Rusakova, and V.L. Tunitskaya, *Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism*. FEBS Lett, 1998. **440**(3): p. 264-7.
- [155] Studier, F.W., et al., *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes*. Methods Enzymol, 1990. **185**: p. 60-89.
- [156] Novagen. *pET System Manual 11th Edition, 2006 [Zugriff am 21.11.2010]*. http://www.merck-chemicals.de/life-science-research/technical-bulletins/c_IMOb.s1OXkUAAAEj2xsYzMkq.
- [157] Doherty, A.J., et al., *A superior host strain for the over-expression of cloned genes using the T7 promoter based vectors*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(11): p. 2074-5.
- [158] Dubendorff, J.W. and F.W. Studier, *Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor*. J Mol Biol, 1991. **219**(1): p. 45-59.
- [159] Kapust, R.B., et al., *The P1 specificity of tobacco etch virus protease*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(5): p. 949-55.
- [160] Gaberc-Porekar, V. and V. Menart, *Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography*. J Biochem Biophys Methods, 2001. **49**(1-3): p. 335-60.

- [161] Kiefhaber, T., et al., *Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation*. Biotechnology (NY), 1991. **9**(9): p. 825-9.
- [162] Chesshyre, J.A. and A.R. Hipkiss, *Low-Temperatures Stabilize Interferon-Alpha-2 against Proteolysis in Methylophilus-Methylotrophus and Escherichia-Coli*. Appl Microbiol Biot, 1989. **31**(2): p. 158-62.
- [163] Shaw, M.K. and J.L. Ingraham, *Synthesis of macromolecules by Escherichia coli near the minimal temperature for growth*. J Bacteriol, 1967. **94**(1): p. 157-64.
- [164] Mak, K.W., K.C. Loh, and M.G. Yap, *Production and purification of recombinant tumor necrosis factor-beta*. Australas Biotechnol, 1993. **3**(4): p. 206-12.
- [165] Albanese, E. and K. Kafkewitz, *Effect of medium composition on the growth and asparaginase production of Vibrio succinogenes*. Appl Environ Microbiol, 1978. **36**(1): p. 25-30.
- [166] Seeger, A., et al., *Comparison of Temperature-Induced and Isopropyl-Beta-D-Thiogalacto-Pyranoside-Induced Synthesis of Basic Fibroblast Growth-Factor in High-Cell-Density Cultures of Recombinant Escherichia-Coli*. Enzyme and Microbial Technology, 1995. **17**(10): p. 947-53.
- [167] Rozkov, A. and S.O. Enfors, *Analysis and control of proteolysis of recombinant proteins in Escherichia coli*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2004. **89**: p. 163-95.
- [168] Schmidt, M., et al., *Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant Escherichia coli*. J Biotechnol, 1999. **68**(1): p. 71-83.
- [169] Mühlhardt, C., *Der Experimentator-Molekularbiologie/Genomics*. 6 ed. 2009, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- [170] Tsuruta, H., et al., *High-level production of amorpho-4,11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin, in Escherichia coli*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4489.
- [171] Korz, D.J., et al., *Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli*. J Biotechnol, 1995. **39**: p. 59-65.
- [172] Riesenber, D., et al., *High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate*. J Biotechnol, 1991. **20**(1): p. 17-27.
- [173] Shiloach, J. and R. Fass, *Growing E. coli to high cell density-a historical perspective on method development*. Biotechnol Adv, 2005. **23**(5): p. 345-57.
- [174] Suck, K., et al., *Fast and efficient protein purification using membrane adsorber systems*. J Biotechnol, 2006. **121**(3): p. 361-7.
- [175] Kökpinar, Ö., *Untersuchung von Membranadsorbersystemen in der Proteinaufreinigung und Entwicklung Aptamer-basierter Affinitätschromatographie* 2008, Dissertation am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
- [176] Müller, H., et al., *Separation of native prion protein (PrP) glycoforms by copper-binding using immobilized metal affinity chromatography (IMAC)*. Biochem J, 2005. **388**: p. 371-8.
- [177] Phan, J., et al., *Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50564-72.
- [178] Nallamsetty, S., et al., *Efficient site-specific processing of fusion proteins by tobacco vein mottling virus protease in vivo and in vitro*. Protein Expression and Purification, 2004. **38**(1): p. 108-15.

- [179] Parks, T.D., et al., *Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase*. Anal Biochem, 1994. **216**(2): p. 413-7.
- [180] Polayes, D.A., et al., *TEV protease, recombinant: a site-specific protease for efficient cleavage of affinity tags from expressed proteins*. FOCUS, 1994. **16**: p. 2-5.
- [181] Yoshinuma, N., et al., *The inhibitory effect of endotoxins on growth of human cell lines*. J Nihon Univ Sch Dent, 1994. **36**(2): p. 139-44.
- [182] Welsch, U., *Repetitorium Histologie*. Vol. 1. 2006, München: Urban und Fischer Verlag.
- [183] Bonsi, L., et al., *M-07e cell bioassay detects stromal cell production of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and stem cell factor in normal and in Diamond-Blackfan anemia bone marrow*. Stem Cells, 1993. **11**: p. 131-4.
- [184] Erickson-Miller, C.L., H. Ji, and M.J. Murphy, Jr., *Megakaryocytopoiesis and platelet production: does stem cell factor play a role?* Stem Cells, 1993. **11**(2): p. 163-9.
- [185] Hendrie, P.C., et al., *Mast cell growth factor (c-kit ligand) enhances cytokine stimulation of proliferation of the human factor-dependent cell line, M07e*. Exp Hematol, 1991. **19**(10): p. 1031-7.
- [186] Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
- [187] Luli, G.W. and W.R. Strohl, *Comparison of Growth, Acetate Production, and Acetate Inhibition of Escherichia-Coli Strains in Batch and Fed-Batch Fermentations*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. **56**(4): p. 1004-1011.
- [188] Fass, R., T.R. Clem, and J. Shiloach, *Use of a novel air separation system in a fed-batch fermentative culture of Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 1989. **55**(5): p. 1305-7.
- [189] Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
- [190] Ball, E.H., *Quantitation of proteins by elution of Coomassie brilliant blue R from stained bands after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. Anal Biochem, 1986. **155**(1): p. 23-7.
- [191] Alexander, B., et al., *A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC50*. J Pharmacol Toxicol Methods, 1999. **41**(2-3): p. 55-58.
- [192] Grage-Griebenow, E., et al., *Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes*. Eur J Immunol, 2001. **31**(1): p. 48-56.

Curriculum Vitæ

Persönliche Daten

Name	Bals
Vorname	Carola
Geburtsdatum	11.01.1983
Geburtsort	Herten
Nationalität	deutsch

Studium

03/2008-04/2011	Promotionsstudium am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
10/2002-02/2008	Studium der Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Abschluss Dipl. Chemikerin

Schulbildung

1996-2002	Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule Lüneburg, Abschluss Abitur
1995-1996	Gymnasiale Oberstufe Rhenanus-Schule Bad Sooden- Allendorf, Gesamtschule des Werra-Meißner-Kreises
1993-1995	Förderstufe Rhenanus-Schule Bad Sooden-Allendorf, Gesamtschule des Werra-Meißner-Kreises
1989-1993	Grundschule Rhenanus-Schule Bad Sooden-Allendorf, Gesamtschule des Werra-Meißner-Kreises