

Neue Ansätze zur Produktion von rekombinantem TGF- β 3 in verschiedenen Expressionssystemen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Lena Stuckenberg, M. Sc.

2021

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

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

Tag der Promotion: 08.03.2021

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Scheper dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, am Institut für Technische Chemie zu promovieren, und mich dabei mit vielen Denkanstößen und Ideen unterstützt hat.

Ich möchte mich außerdem bei Prof. Dr. Ursula Rinas für die Hilfe an verschiedenen Stellen des Projekts bedanken sowie für die Übernahme des Korreferats. Prof. Dr. Andreas Kirschning danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ein großer Dank gilt Dr. Janina Bahnemann, die mir vor allem während der CHO-Kultivierungen zur Seite stand und sich viel Zeit für mich und meine Fragen genommen hat. Ebenso möchte ich Dr. Iliyana Pepelanova danken, die mich während der ersten Zeit am Institut begleitet hat.

Für die konstruktiven Diskussionen und die Umsetzung der HEK-Kultivierungen möchte ich Dennis Karthaus danken.

Während meiner Zeit am TCI habe ich so viele wunderbare Menschen kennengelernt, die mich durch Hoch- und Tiefphasen begleitet haben. Für den Umgang miteinander und den kollegiale Zusammenhalt bedanke ich mich bei allen TCIlern. Ich danke vor allem meinem Büro und dem Nachbarbüro, die sich über die Jahre immer wieder neu zusammensetzten, für die ruhigen, die schönen und die lustigen Momente - und die Unterstützung in der Zeit, in der ich nicht mehr direkt am Institut war. Danke!

Meinen Eltern und Geschwistern möchte ich von Herzen für die bedingungslose Unterstützung und den unerschütterlichen Glauben an mich danken. Mein größter Dank gilt meinem Mann Toby - ohne dich wäre das alles nicht möglich gewesen. Du warst immer an meiner Seite, ob in guten oder schlechten Zeiten, und ich danke dir für deine sachliche Herangehensweise an Probleme, die mir unlösbar schienen, und deine unendliche Geduld. Zum Schluss möchte ich mich bei meiner kleinen Tochter Finja bedanken - für die Fokussierung auf die wichtigen Dinge des Lebens, das Lachen mit dem Du mich ansteckst und das Staunen, in das du mich immer wieder versetzt!

Kurzfassung

Der humane Wachstumsfaktor *Transforming Growth Factor*- β 3 (TGF- β 3) kommt im embryonalen und adulten Körper vor. Unter anderem beeinflusst das Zytokin in strukturgebendem Gewebe die Differenzierung von Zellen zu Chondrozyten. Diese Eigenschaft soll im Rahmen der DFG-Forschergruppe „Gradierte Implantate“ in einem medizinischen Produkt zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren genutzt werden, um Verletzungen am Sehnen-Knochen-Übergang in der Schulter heilen zu können.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Ansätze zur Produktion von rekombinanten TGF- β 3 evaluiert. Als Expressionsorganismen dienten das Bakterium *Escherichia coli* sowie die Säugetierzelllinien CHO-K1 und HEK293. Auf Grundlage der Aminosäuresequenz des humanen TGF- β 3 wurden verschiedene Plasmide entwickelt und in die Organismen eingebracht.

In *E. coli* wurde das Zielprotein als Monomer in Proteinaggregaten exprimiert. Mithilfe der statistischen Versuchsplanung wurde die Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab hinsichtlich einer möglichst hohen Proteinausbeute optimiert. Nach Solubilisierungsversuchen konnte die Löslichkeit schließlich mithilfe des Fusionsproteins Thioredoxin A erhöht werden. Im Anschluss erfolgte die Optimierung des Zellaufschlusspuffers und die Aufreinigung des Zielproteins über eine Nickel-Affinitätschromatographie. Für die Herstellung in CHO-K1-Zellen wurde zunächst eine geeignete Methode zur Polyethylenimin-vermittelten transienten Transfektion etabliert. Die Expression des Zielproteins TGF- β 3 konnte im Anschluss nicht nachgewiesen werden. In den HEK293-Zellen wurde mittels transients Transfektion die Expression von TGF- β 3 erreicht. Das Zielprotein liegt neben der monomeren auch in seiner dimeren Form vor. Insgesamt konnten zwei vielversprechende Ansätze zur Produktion von rekombinanten TGF- β 3 aufgezeigt werden.

Schlagwörter: TGF- β 3, *E. coli*, Thioredoxin A, CHO-K1, HEK293, PEI-vermittelte transiente Transfektion

Abstract

The human cytokine Transforming Growth Factor- β 3 (TGF- β 3) occurs in many areas of the embryonic and adult body. Among other effects, the cytokine in structure-giving tissue influences the differentiation of cells into chondrocytes. Within the context of the DFG research group "Gradierte Implantate", this property is to be used in a medical product together with other growth factors in order to be able to heal injuries at the tendon-bone transition in the shoulder.

In this thesis different approaches for the production of recombinant TGF- β 3 were evaluated. The bacterium *Escherichia coli* and the mammalian cell lines CHO-K1 and HEK293 have been used as expression organisms. Based on the amino acid sequence of human TGF- β 3 different plasmids were developed and transferred into the organisms.

In *E. coli* the target protein was expressed as a monomer in protein aggregates. Using statistical design of experiments, the cultivation in shaking flask scale was optimized to achieve the highest possible protein yield. After solubilization experiments, the solubility could finally be increased with the fusion protein thioredoxin A. Subsequently, the cell disruption buffer was optimized and the target protein was purified using nickel affinity chromatography. For the production in CHO-K1 cells, a suitable method for polyethyleneimine-mediated transient transfection was established. However, the expression of the target protein TGF- β 3 could not be detected in the following. In HEK293 cells the expression of TGF- β 3 was achieved by transient transfection. The target protein could be detected in its monomeric form as well as in its dimeric form. In total, two promising approaches for the production of recombinant TGF- β 3 were demonstrated.

Keywords: TGF- β 3, *E. coli*, thioredoxin A, CHO-K1, HEK293, PEI-mediated transient transfection

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Kurzfassung	II
Abstract	III
1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	2
2 Theoretische Grundlagen	4
2.1 <i>Transforming Growth Factor-β</i>	4
2.1.1 TGF- β -Unterfamilie	5
2.1.2 Physiologische Bedeutung von TGF- β 3	7
2.2 Produktion von rekombinanten Proteinen	9
2.2.1 Produktionsorganismen	9
2.2.2 Transfektionssysteme	10
3 Experimenteller Teil	17
3.1 Arbeiten in <i>Escherichia coli</i>	17
3.1.1 Molekularbiologische Arbeiten	18
3.1.2 Kultivierung und Produktion	19
3.1.3 Optimierung der Kultivierungsparameter	20
3.1.4 Versuche zur Solubilisierung der IBs	26
3.1.5 Alternativer <i>E. coli</i> -Stamm SHuffle [®]	27
3.1.6 Thioredoxin-Fusionsprotein zur Erhöhung der Löslichkeit	29
3.1.7 Fazit	40
3.2 Arbeiten in CHO-Zellen	41
3.2.1 Transiente Transfektion mit GFP-Plasmiden	42
3.2.2 Transiente Transfektion mit TGF- β 3-Plasmiden	49

3.2.3	Plasmidmarkierung mit dem Farbstoff Cy5	51
3.2.4	Fazit	57
3.3	Arbeiten in HEK293-Zellen	59
3.3.1	Transiente Transfektion mit pCSG-IBA102-TGF- β 3	59
3.3.2	Fazit	61
4	Zusammenfassung und Ausblick	62
A	Materialien	66
A.1	Verbrauchsmaterialien	66
A.2	Geräte	67
A.3	Chemikalien	69
A.4	Puffer, Lösungen und Medien	71
A.4.1	Puffer und Lösungen	71
A.4.2	Medien	73
A.4.3	Gellösungen	73
A.4.4	Färbelösungen	74
A.4.5	Zellfixierlösung	74
A.5	Protein- und Nukleinsäuresequenzen	75
A.5.1	Proteinsequenz	75
A.5.2	Nukleinsäuresequenzen für <i>E. coli</i>	76
A.5.3	Nukleinsäuresequenzen für Säugetierzellen	77
A.6	Biomoleküle, Plasmide und Zellen	80
A.6.1	Biomoleküle	80
A.6.2	Vektoren	81
A.6.3	Zellen	82
A.7	Reaktionskits	82
B	Methoden	83
B.1	Molekularbiologische Methoden	83
B.1.1	Allgemeine Methoden	83
B.1.2	Klonierung	84
B.1.3	Plasmid-Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5	87
B.2	Proteinexpression und -aufreinigung in <i>E. coli</i>	89
B.2.1	Kultivierung	89
B.2.2	Zellaufschluss	91
B.2.3	Solubilisierung	92

B.3	Proteinexpression und -aufreinigung in CHO	93
B.3.1	Kultivierung	93
B.3.2	PEI-vermittelte transiente Transfektion	95
B.3.3	Zellanalyseverfahren	97
B.3.4	Mikroskopie	100
B.4	Proteinexpression und -aufreinigung in HEK-Zellen	101
B.4.1	Kultivierung	101
B.4.2	PEI-vermittelte transiente Transfektion	102
B.4.3	Zellaufschluss mittels Ultraschall	102
B.5	Proteinanalytik	102
B.5.1	Allgemeine Methoden	102
B.5.2	Proteinisolierung	106
B.5.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	107
B.6	Statistische Versuchsplanung	108
B.6.1	Rohdatenanalyse	109
B.6.2	Regressionsanalyse	109
B.6.3	Güteprüfung	110
C	Ergänzende Versuchsergebnisse	112
C.1	Statistische Versuchsplanung	112
C.2	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> per Ultraschall	113
C.2.1	Korrektur des systematischen Fehlers	113
C.2.2	Zellaufschluss mit Varianten von Puffer 1	115
C.3	Solubilisierung von IBs mittels Harnstoff	115
	Literaturverzeichnis	117
	Abkürzungsverzeichnis	129
	Abbildungsverzeichnis	134
	Tabellenverzeichnis	135
	Mitarbeit an Experimenten	136
	Publikationsverzeichnis	137
	Lebenslauf	138

1 Einleitung

Trotz des in den letzten Jahrhunderten stetig wachsenden Wissens im Bereich der operativen Medizin sind viele Krankheiten und Alterserscheinungen des Körpers noch immer nicht zufriedenstellend zu heilen oder auszugleichen. Neben den großen gesundheitlichen Problemen der Menschheit, wie Krebs oder Alzheimer, ist auch die Nachbildung verletzten oder überalterten Gewebes ein wichtiges Thema.

Ein Beispiel dafür sind Verletzungen des Sehnen-Knochen-Übergangs in der Schulter. Patienten, die einen kompletten Abriss der Supraspinatussehne in der Rotatorenmanschette erleiden, können weder durch nicht-invasive noch operative Methoden ihren Arm wieder annähernd vollständig belasten. Die aktuelle Technik, die abgerissene Sehne wieder an den Knochen zu nähen, führt zu suboptimalen Ergebnissen.

Im Rahmen der DFG-Forschergruppe 2180 soll ein gradiertes, zellfreies Implantat entwickelt werden, welches den Übergang zwischen verschiedenen Gewebearten imitieren kann. Das Implantat soll mit Wachstumsfaktoren dekoriert sein, die freigesetzt werden und zur Differenzierung von patienteneigenen Zellen in Knochen-, Knorpel- und Sehnenzellen führen. Neben dem die Knochenbildung beeinflussenden BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein*) und dem intrazellulären Signalmolekül Smad8 ist der Wachstumsfaktor *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) im Implantat beteiligt. TGF- β hat neben vielen Einflüssen auf unterschiedliche Zelltypen die Eigenschaft, Chondrogenese zu fördern. Von den drei Isoformen im menschlichen Körper unterstützt das TGF- β 3 die reduzierte Narbenbildung am stärksten [1].

1.1 Zielsetzung

Im Zuge dieser Arbeit soll die Herstellung des rekombinanten humanen Wachstumsfaktors *Transforming Growth Factor-β3* (TGF-β3) für den Einsatz in einem medizinischen Implantat etabliert werden.

Um dieses Ziel zu erreichen, werden sowohl pro- als auch eukaryotische Modellsysteme getestet. Durch seinen hohen industriellen Stellenwert soll im ersten Teil der Arbeit das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) als Produktionsorganismus eingesetzt werden. Der Organismus zeichnet sich durch kurze Generationszeiten und einfache, kostengünstige Kultivierungsbedingungen sowie hohe Produktausbeuten aus. Für die Produktion eines rekombinanten Proteins muss eine genetische Veränderung von *E. coli* erfolgen. Dafür sollen zunächst zwei Plasmide für die bakterielle Proteinexpression konstruiert werden. Die erste Variante soll für das mature, monomere TGF-β3 codieren und keine zusätzlichen Modifikationen beinhalten. Diese Variante kommt dem natürlich vorkommenden TGF-β3 am nächsten. Zusätzliche Veränderungen können bei einer späteren Zulassung in der Anwendung im menschlichen Körper aufgrund von unbekanntem Wechselwirkungen zu Problemen führen. Da es in Bakterien durch hohe Expressionsraten zur Bildung unlöslicher Proteinaggregate (*Inclusion Bodies*) kommen kann, soll mit einer zweiten Variante die Löslichkeit des Zielproteins durch ein Helferprotein erhöht werden. Das Plasmid soll die Sequenz für das Protein Thioredoxin A (TrxA) beinhalten, das zusammen mit einem Histidin-Tag am N-Terminus des TGF-β3 exprimiert wird. Durch das Einbringen einer Protease-Schnittstelle soll eine Abspaltung von Fusionsprotein und Tag vom Zielprotein erreicht werden.

Die Plasmide sollen zunächst in *E. coli* eingebracht und TGF-β3 exprimiert werden. Dabei wird eine Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab angestrebt. Um eine höhere Proteinausbeute zu erzielen, sollen die Kultivierungsbedingungen mithilfe der Methoden des Design of Experiments (DoE) optimiert werden. Die anschließende chromatographische Primär-Aufreinigung des produzierten TGF-β3 und weitere Aufreinigungsschritte sollen etabliert werden.

Im zweiten und dritten Teil der Arbeit sollen Säugetierzellen als Expressionsorganismen für TGF-β3 eingesetzt werden. Als Modellzellsysteme sollen hierfür CHO- und HEK293-Suspensionszellen verwendet werden. Beide Zelllinien sind für die Produktion rekombinanter Proteine weit verbreitet. Im Gegensatz zu Bakterien

zeichnen sich Säugerzellen dadurch aus, dass sie neben posttranslationalen Modifikationen häufig die korrekte Faltung von Proteinen durchführen können. Diese Faltung ist gerade bei TGF- β 3 von Bedeutung, da das biologisch aktive Protein ein Dimer mit einem Cystinknoten darstellt. Außerdem können die Zellen das Zielprotein nach der Expression ins Medium sekretieren und so die Aufreinigung erleichtern. Es sollen verschiedene DNA-Sequenzen, die entweder für das mature Protein oder für eine Preprotein-Variante codieren, konstruiert und in zwei unterschiedliche Plasmide kloniert werden. Die Aufnahme dieser Plasmid-DNA in die Zellen soll mithilfe der Polyethylenimin (PEI)-vermittelten transienten Transfektion durchgeführt werden. Für die Optimierung der transienten Transfektion sollen zunächst Vorversuche in CHO-Zellen mit einem für GFP (*Green Fluorescent Protein*) codierendem Plasmid durchgeführt werden. Es sollen zwei Methoden miteinander verglichen und Transfektionseffizienzen durchflusszytometrisch bestimmt werden. Anschließend sollen die TGF- β 3-Plasmide unter den in den Vorversuchen optimierten Bedingungen eingesetzt und das exprimierte Protein immunologisch nachgewiesen werden. Als dritten Ansatz zur Herstellung von TGF- β 3 soll die Expression in HEK293-Zellen evaluiert werden. Das Zielprotein soll im Anschluss ebenfalls immunologisch nachgewiesen werden.

Im abschließenden Teil dieser Arbeit sollen die gewonnenen Erkenntnisse der vorherigen Teile verglichen und diskutiert werden. Dabei sollen die vielversprechendsten Ansätze hervorgehoben werden.

2 Theoretische Grundlagen

Dieser Teil der Arbeit befasst sich mit den theoretischen Grundlagen und dient der Vermittlung von Hintergrundwissen zu transformierenden Wachstumsfaktoren und deren Einsatzgebieten in der Medizin. Außerdem wird auf die biotechnologische Produktion in Mikroorganismen und Säugetierzellen eingegangen und das Einbringen von Fremd-DNA in Zellen beschrieben.

2.1 *Transforming Growth Factor- β*

Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle im Körper. Als Signalmoleküle regulieren sie Zellwachstum und -differenzierung. Sie werden entweder parakrin, autokrin oder endokrin sekretiert oder außen an der Membran haftend präsentiert. So können sie von den Zellmembran-Rezeptoren anderer Zellen erkannt werden und intrazelluläre Signalkaskaden auslösen.

Eine große Gruppe der Zytokine mit mehr als 40 Mitgliedern ist die *Transforming Growth Factor* (TGF)- β -Superfamilie. TGF- β 1 wurde 1981 als Wachstumsinduzierer von Fibroblasten in Nierenzellen entdeckt [2]. Seitdem wurden viele weitere Zytokine mit ähnlicher Sequenzhomologie (mind. 25 %) der Superfamilie zugeordnet und entsprechend der Proteinähnlichkeiten und -eigenschaften in wiederum kleinere Unterfamilien eingeteilt [3]. Zudem lässt sich die TGF- β -Superfamilie in zwei funktionelle Gruppen aufteilen: Die TGF- β -ähnlichen und die *Bone Morphogenic Protein* (BMP)-ähnlichen Zytokine. Zu den TGF- β -ähnlichen zählen neben den TGF- β auch Activin, Nodal und einige *Growth Differentiation Factors* (GDF). Die BMP-ähnliche Gruppe besteht aus BMP, den meisten GDFs und *Müllerian-Inhibiting Substances* (MIS). Alle Zytokine dieser Superfamilie spielen sowohl bei der Embryonalentwicklung als auch im Erwachsenenalter von Säugetieren eine wichtige Rolle [4].

2.1.1 TGF- β -Unterfamilie

Jedes Mitglied der TGF- β -Unterfamilie stellt als biologisch aktives Molekül ein etwa 25 kDa schweres Homodimer dar. Die beiden Monomere sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. In Säugetierzellen besteht die TGF- β -Unterfamilie aus drei verschiedenen Isoformen des TGF- β (TGF- β 1 bis - β 3) und anderen Signalmolekülen. In Hühnern kann außerdem TGF- β 4 nachgewiesen werden, das dem TGF- β 1 in Säugetieren entspricht, und in der Froschart *Xenopus leavis* tritt neben TGF- β 2 auch TGF- β 5 auf [5–7]. Die Gene der verschiedenen Isoformen befinden sich auf unterschiedlichen Chromosomen, dennoch weisen sie eine Sequenzhomologie von 72–80 % auf und sind hochkonserviert [8].

2.1.1.1 TGF- β -Synthese und Aktivierung

Alle Isoformen werden als Pre-Pro-Peptid exprimiert, das aus dem maturen TGF- β und dem *Latency Associated Peptide* (LAP) besteht (siehe Abbildung 2.1). Es findet eine Homodimerisierung durch die intermolekulare Disulfidbrückenbildung zwischen den Cysteinen Cys7 und Cys16 statt. Dabei werden außerdem drei intramolekulare Disulfidbrücken gebildet und ein sogenannter Cystinknoten entsteht (siehe Abbildung 2.2). Das N-terminal am maturen TGF- β hängende LAP wird im Cytoplasma durch die Protease Furin abgespalten, interagiert aber weiterhin mit dem TGF- β -Dimer. Dieser inaktive Komplex wird *Small Latent Complex* (SLC) genannt und weist eine deutlich erhöhte Stabilität gegenüber dem freien TGF- β auf [9, 10]. Durch die Bildung des Komplexes wird die Halbwertszeit des TGF- β *in vivo* von wenigen Minuten auf mehrere Stunden erhöht [10].

Das LAP geht über Disulfidbrücken eine Bindung zu einem weiteren Protein ein, das zu der Gruppe der *Latent TGF- β Binding Proteins* (LTBP) gehört. Die Aminosäuresequenz von LTBP ist sehr repetitiv und besteht hauptsächlich aus Wiederholungen einer acht Cystein langen Domäne. Das Muster der Cystein-Wiederholungen ist aus der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) bekannt und schützt den nun entstandenen trimolekularen Komplex, *Large Latent Complex* (LLC) genannt, vor dem proteolytischen Abbau [11, 12]. Die Abspaltung der LTBP und die Dissoziation des LAP führt zu der Aktivierung des TGF- β s,

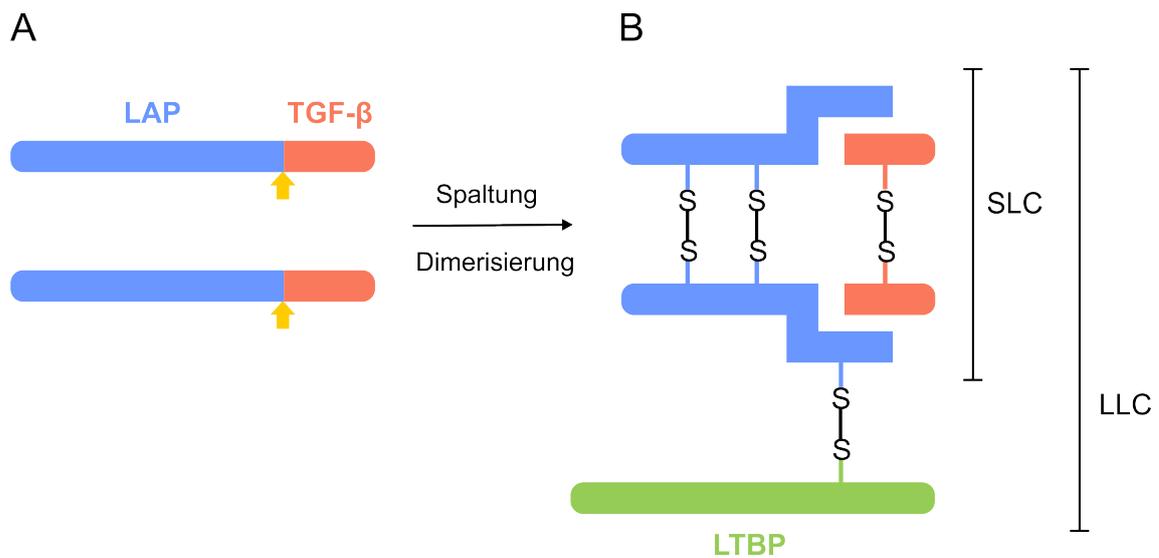


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Vorläuferproteins und des matten TGF- β 3-Proteins. A: vor der Spaltung; B: inaktives Protein. LAP: *Latency Associated Peptide*, SLC: *Small Latent Complex*, LLC: *Large Latent Complex*, LTBP: *Latent TGF- β Binding Protein*. Nach [13].

welches dann an spezifischen Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren auf der Plasmamembran der Zielzellen binden kann. Das aktive TGF- β wird von Leber, Nieren, Lunge und Milz aufgenommen und verstoffwechselt [10].

2.1.1.2 Signalwege

Die Signale der Wachstumsfaktoren aus der TGF- β -Superfamilie werden über die transmembranen Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren an Zellen weitergegeben. In diesem Prozess sind Rezeptoren vom Typ I und II beteiligt, die es in Wirbeltieren in sieben bzw. fünf Varianten gibt. Einige Mitglieder der TGF- β -Superfamilie benötigen außerdem den Co-Rezeptor Typ III [4]. Bei der Signalübertragung in eine Zelle ist immer jeweils ein Rezeptortyp beteiligt. Innerhalb der TGF- β -Subfamilie findet zunächst eine Bindung zwischen Wachstumsfaktor und dem TGF- β -Rezeptor (T β R)-II statt. Erst dann kann T β R-I ebenfalls binden, wird von T β R-II an einem Serin- oder Threonin-Rest phosphoryliert und damit aktiviert [15].

Innerhalb der Zellen werden die Signale von den Zelloberflächen-Rezeptoren mithilfe intrazellulärer Mediatoren, den so genannten Smads, direkt in den Zellkern

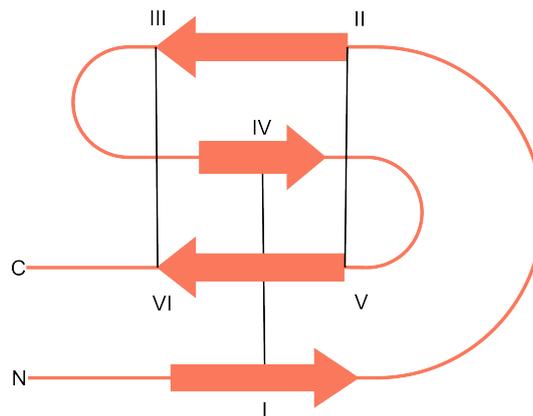


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Cystinknotens innerhalb eines TGF- β -3-Monomers. Cys7 und Cys16, Cys15 und Cys78 (I und V), Cys44 und Cys109 (II und V) und Cys48 und Cys111 (III und VI). Nach [14].

übertragen [4]. Die Smads lassen sich in drei Klassen unterteilen. Die Rezeptor-regulierten R-Smads (Smad1–3,-5,-8,-9) sind bei der Signalübertragung durch direkte Interaktion mit den Rezeptoren beteiligt. Je nach Zusammensetzung der Rezeptorkomplexe werden unterschiedliche R-Smads bevorzugt phosphoryliert. Die *common-mediator*-Smads (Co-Smads) haben die Aufgabe in Zusammenarbeit mit den R-Smads weitere Co-Faktoren zu rekrutieren und damit die Übertragung des Signals in den Zellkern zu gewährleisten. Das einzige bekannte menschliche Co-Smad-Protein ist Smad-4. Die Inhibitor-Smads (I-Smads) Smad-6 und -7 wirken regulatorisch auf die R-Smads und können diese inhibieren.

Neben Smad-abhängiger Signaltransduktion konnten auch Smad-unabhängige Signalkaskaden nachgewiesen werden. Dabei spielen vor allem Kinasen aus der Familie der Mitogenaktivierte-Proteinkinase (MAPK)-Familien eine Rolle, die die Signale in einer dreistufigen Signalkaskade aus Kinasen weiterleiten. Die Phosphorylierung eines Tyrosin- anstelle von Serin- oder Threonin-Rests des T β R-I führt beispielsweise zur Auslösung des MAPK/*Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK)-Signalwegs [16].

2.1.2 Physiologische Bedeutung von TGF- β 3

Die Isoform TGF- β 3 (siehe Abbildung 2.3) wurde 1988 von Derynck *et al.* durch cDNA-Charakterisierung entdeckt [8]. Im Gegensatz zu TGF- β 1 und - β 2 zeigt sie nur eine sehr geringe Affinität zu Heparin und Heparansulfat [17].

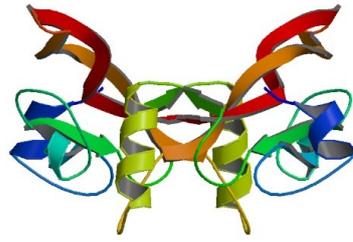


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des TGF- β 3-Dimers [18].

Wie auch die anderen Mitglieder der TGF- β -Subfamilie ist TGF- β 3 ein multifunktionelles Protein. Es hat unter anderem einen Einfluss auf die Wundheilung und Narbenbildung. Bei einer epidermalen Wunde wird aus dem Plasma, das die Zellen umspült, durch den Entzug von Fibrinogen das so genannte Serum. Die Konzentration von TGF- β 3 im Serum ist deutlich höher als im Plasma und unterstützt so die dermale und epidermale Zellmotilität, die zum Schließen der Wunde nötig ist [19]. Die exogene Zugabe von TGF- β 3 bei der Wundheilung führt zu einer verringerten Narbenbildung [1]. Eine Vermarktung durch die Firma Renovo Group plc (Großbritannien) als Anti-Narbenmittel Juvista ist 2011 allerdings in der dritten Phase der klinischen Studien gescheitert, da die primären und sekundären Endpunkte der Studie nicht erreicht werden konnten [20].

Auch im kardiovaskulären System spielt TGF- β 3 eine wichtige Rolle. Es konnte ein Zusammenhang zwischen Mutationen in der für TGF- β 3 codierenden Gensequenz und dem Krankheitsbild der Aortenaneurysmen hergestellt werden [21]. Ebenfalls nachgewiesen werden konnte ein Einfluss von TGF- β 3 auf die Gehirnentwicklung in Verbindung mit dem Sonic-Hedgehog-Protein (Shh) und auf die Differenzierung dopaminerger Nervenzellen zusammen mit TGF- β 2 [22, 23]. Außerdem wird in einer Studie ein Zusammenhang von TGF- β 3-Morphismen und männlicher Unfruchtbarkeit vermutet [24].

Bei Patienten mit einer Lippen-Kiefer-Gaumensegel-Spalte kann eine verringerte TGF- β 3-Konzentration nachgewiesen werden als bei Menschen, die diese angeborene Fehlbildung im Mund-Nasen-Bereich nicht haben [25]. Zusammen mit BMP-2 und TGF- β 2 ist TGF- β 3 auch bei der Knochenbildung involviert und inhibiert diese bei mesenchymalen Stammzellen (MSC) [26–28]. Eine verringerte Konzentration von TGF- β 3 kann zu einer frühzeitigen Verknöcherung der Schädelspalten führen, teilweise schon vor der Geburt [29].

Außerdem kann TGF- β 3 die Bildung von knorpelspezifischer extrazellulärer Ma-

trix (EZM) *in vivo* auslösen und damit die Differenzierung von Zellen unterstützen [30]. Gleichzeitig wird das Zytokin bei der Dedifferenzierung von menschlichen Chondrozyten hochreguliert [31].

2.2 Produktion von rekombinanten Proteinen

Die Herstellung von Proteinen in einem Organismus, der dieses Protein natürlicherweise eigentlich nicht herstellt, hat sich in der Biotechnologie seit Jahrzehnten bewährt. Hohe Ausbeuten, schnelle Produktion und eine Kostensenkung im Vergleich zu einer Extraktion aus dem Ursprungsorganismus sprechen in vielen Fällen für eine biotechnologische Herstellung.

2.2.1 Produktionsorganismen

Prokaryotische Mikroorganismen wie *Escherichia coli* sind gut erforscht und weisen hohe Verdopplungs- und Produktionsraten auf. Die Kultivierung ist unter einfachen Bedingungen und in großem Maßstab möglich. Entsprechend niedrig sind die wirtschaftlichen Kosten. Daher ist oft die biotechnologische Proteinherstellung in Bakterien eine der ersten Methoden, die getestet wird. Es gibt viele Stämme, die für die Expression verschiedenster Proteine optimiert und mit denen gute Erfahrungen gemacht wurden. Problematisch ist allerdings die Produktion komplexer, nicht-bakterieller Proteine, da die meisten Bakterienstämme nicht in der Lage sind, posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen durchzuführen. Außerdem kann es zur Bildung fehlgefalteter Proteine kommen, die im Anschluss an die Kultivierung durch Renaturierungsprozesse in ihre aktive Form überführt werden müssen. Trotz dieser zusätzlichen Schritte kann eine Produktion in Mikroorganismen dennoch wirtschaftlich sein.

Wenn das Zielprotein Glykosylierungsmuster aufweist oder der humanen Konformation entsprechen soll, werden allerdings bevorzugt Säugetierzellen eingesetzt. Posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen und Faltungen können aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Expressionsumgebung wie im ursprünglichen Organismus durchgeführt und so biologisch aktive Proteine gewonnen werden. Im Gegensatz zu Mikroorganismen wie Bakterien haben euka-

ryotische Zellen deutlich niedrigere Wachstumsraten und höhere Anforderungen an die Kultivierungsbedingungen. Ein hohes Maß an Sterilität sowie der Einsatz spezieller und teurer Medien sind nötig, um die Zellen je nach Art konfluent oder in Suspension zu kultivieren.

Die in der Industrie und Forschung wichtigsten Zelllinien stellen die *Chinese Hamster Ovary* (CHO)- und die *Human Embryonic Kidney* (HEK)-Zellen dar. Die CHO-Zellen wurden 1957 aus den Ovarien eines Chinesischen Zwerghamsters (*Cricetulus griseus*) gewonnen [32]. Die HEK-Zellen wurden in den 70er Jahren aus menschlichen embryonalen Nierenzellen mit Teilen der DNA-Sequenz des menschlichen Adenovirus' 5 hergestellt [33]. Im Gegensatz zu Zellen aus einer Primärkultur sind beide Zelllinien immortalisiert. Das bedeutet, sie haben durch Mutation die Eigenschaft verloren, nur eine begrenzte Anzahl Teilungen durchlaufen zu können, bevor der programmierte Zelltod eintritt, und können sich daher theoretisch unendlich vermehren. Das hat den Vorteil, dass ständig Zellen mit einem gleichen Set an Genen zur Verfügung stehen.

2.2.2 Transfektionssysteme

Um eine Produktion rekombinanter Proteine zu erreichen, wird freie DNA oder RNA, welche für das jeweilige Zielprotein codiert, in Säugetierzellen eingebracht. Dieser Vorgang wird Transfektion genannt und kann durch verschiedene Methoden erreicht werden. Es wird zwischen einer stabilen und einer transienten Transfektion unterschieden.

Die Integration eines gewünschten Gens in das Genom der Wirtszelle erlaubt die Weitergabe in folgende Generationen und wird als stabile Transfektion bezeichnet. Dabei wird vor allem mit Viren gearbeitet, die die Gensequenz gezielt in die Zellen schleusen. Um einen Zellklon zu erhalten, der das Zielprotein in ausreichender Menge produziert, muss ein aufwendiger und zeitintensiver Screening-Prozess durchlaufen werden, da durchschnittlich nur etwa eine von 10^4 Zellen das Zielgen in das Genom einbaut [34, 35]: Das rekombinante Gen wird mit allen nötigen transkriptionalen Regulationselementen zusammen mit einem Selektionsmarker in die Zellen eingebracht. Dann werden nur die Zellen, die einem an den Marker angepassten Selektionsdruck standhalten, einzeln in einer Reinkultur

weiterkultiviert. Anschließend werden die Klone, die das Zielprotein produzieren, detektiert und die Kandidaten mit der höchsten Zielproteinausbeute weiter kultiviert und analysiert. Aus diesem Pool wird schlussendlich eine Zelllinie mit den optimalen Wachstums- und Produktivitätscharakteristika für die Produktion des rekombinanten Proteins ausgewählt. Von der Plasmid-Konstruktion bis zum fertigen Produktionsprozess können so mehrere Monate vergehen. Anschließend können Produktausbeuten von 5-10 g/L erreicht werden [36, 37].

Im Gegensatz zu der stabilen Transfektion wird bei der transienten Transfektion das Gen nicht fest in das Genom der Zelle integriert und daher nur kurzzeitig von den Zellen exprimiert. Der Produktionszeitraum von 7 bis 14 Tagen ist entsprechend limitiert. Sobald das Transfektionssystem allerdings etabliert ist, ist der Prozess schnell und mit verschiedenen Plasmiden durchführbar. Gerade für Forschungseinrichtungen und Universitäten bietet sich die transiente Transfektion an, da hier häufig Proteine in kleinen Mengen benötigt werden. Mit Auswahl und Optimierung der passenden Transfektionsmethode können beispielsweise in CHO-Zellen zwischen 0,8 und 2 g/L Proteinausbeute erreicht werden [38, 39].

2.2.2.1 Transfektionsmethoden

Eine Transfektion kann unter Zuhilfenahme verschiedener biologischer, chemischer oder physikalischer Verfahren durchgeführt werden. Einen Überblick über die Methoden gibt Tabelle 2.1.

Die Transfektion von Säugetierzellen mit Viren, wie beispielsweise dem Adenovirus oder dem Maus-Leukämie-Virus, wird auch als Transduktion bezeichnet und stellt eine häufig in der klinischen Forschung genutzte Methode dar. Sie ist hoch effizient und kann einfach umgesetzt werden. Allerdings sind die Viren eine potenzielle Gefahr für die Experimentatoren und können für die Zellen zytotoxisch sein. Außerdem können Insertionsmutationen und Entzündungsreaktionen durch die zufällige Intergration ins Genom entstehen. Ein weiterer Aspekt ist die Limitierung durch die maximal einsetzbare Länge der Gensequenz [17].

Zu den physikalischen Transfektionsmethoden zählen Verfahren wie Elektroporation oder Mikroinjektion. Ebenso wie die virale Transfektion sind sie hocheffizient, können allerdings schnell zelltoxisch wirken und dadurch der Zelle schaden.

Tabelle 2.1: Überblick verschiedener Methoden zur Transfektion von Säugetierzellen. Nach [40].

Methode	
biologisch	Virus-vermittelt
physikalisch	Elektroporation laserbasierte Verfahren Mikroinjektion Sonoporation biolistische Verfahren
chemisch	anorganische Agenzien kationische Lipide kationische Polymere

Zu den chemischen Transfektionsmethoden zählen neben dem Einsatz anorganischer Agenzien (Calcium-Phosphat-Präzipitation) auch die lipid- und polymervermittelten Verfahren. Die Fremd-DNA wird mit Reagenzien komplexiert oder umschlossen und die Zellen nehmen diese dann über Phagozytose oder ähnliche Mechanismen auf. Dabei können die eingesetzten Reagenzien ebenfalls zelltoxische Eigenschaften aufweisen.

2.2.2.2 PEI-vermittelte Transfektion

Eine der am häufigsten verwendeten transienten Methoden ist die PEI-vermittelte Transfektion (siehe Abbildung 2.4). Das Polyethylenimin (PEI) besteht aus sich wiederholenden Einheiten aus aliphatischen Carbongruppen und sekundären Aminen (siehe Abbildung 2.5). Diese Amine sorgen für den stark kationischen Charakter des Moleküls. Durch elektrostatische Wechselwirkungen kann das PEI mit der negativ geladenen Fremd-DNA Komplexe ausbilden.

Auf dem Markt sind lineare (L-PEI) und verzweigte (B-PEI) Typen mit unterschiedlichen Molekulargewichten erhältlich. Das Molekulargewicht hat einen großen Einfluss auf die Komplexierung. Das 25 kDa schwere L-PEI hat eine größere Oberfläche und präsentiert dadurch eine höhere positive Ladung als niedriger molekulargewichtiges PEI. Gleichzeitig weisen Polyethylenimine mit

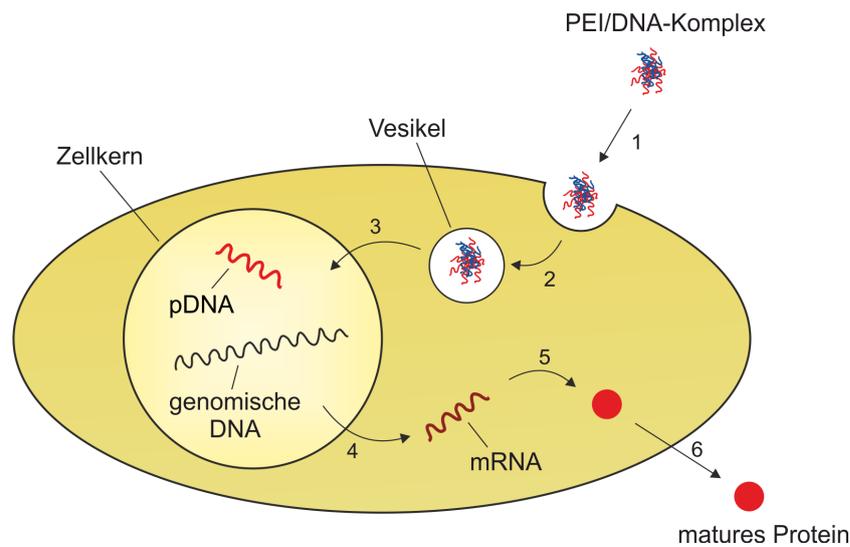


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der transienten Transfektion mittels PEI. Die PEI/DNA-Polyplexe werden endozytotisch in die Zelle aufgenommen (1) und dort in Vesikeln zum Zellkern transportiert (2). Es erfolgt die Dissoziation der DNA vom PEI und die Aufnahme in den Zellkern (3). Die Plasmid-DNA wird transkribiert und die mRNA in das Cytoplasma geschleust (4). Dort findet die Transkription zum maturen Protein statt (5), welches anschließend aus der Zelle sekretiert wird (6). Nach [40].

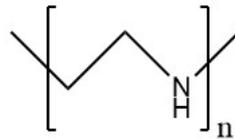


Abbildung 2.5: Strukturformel von linearem Polyethylenimin (PEI).

einem höheren Molekulargewicht eine erhöhte Zytotoxizität auf. Durch die Bildung großer Cluster auf der Zelloberfläche kann Nekrose induziert werden [41]. Die Zytotoxizität steht dabei im direkten Zusammenhang mit dem Verzweigungsgrad der Polymere [42]. Daher werden für biotechnologische Prozesse 5 bis 25 kDa große PEI-Polymere verwendet [43]. Die Ausbildung der PEI-DNA-Komplexe wird durch verschiedene Parameter beeinflusst. Hat das Medium, in dem die Komplexbildung stattfindet, eine hohe Ionenstärke, führt dies zur Bildung größerer Komplexe [43]. Das Verhältnis von PEI zu DNA ist ein weiterer Faktor, der die Größe der Polyplexe entscheidend beeinflusst. Xie *et al.* haben verschiedene Verhältnisse miteinander verglichen und konnten dabei auch eine Veränderung der Polyplexgröße über die Zeit feststellen. Direkt nach den ersten zehn Minuten wiesen alle Polyplexe die gleiche Größe auf. Nach einer Stunde konnten bei PEI-DNA-Verhältnissen von 1:1 bzw. 1:3 Komplexe mit einem Durchmesser zwischen

150 und 5500 nm gemessen werden. Bei Versuchen mit einem Verhältnis von 1:5 bzw. 1:7 wurden im Durchschnitt kleinere Polyplexe (400–950 nm) ermittelt [44]. Es muss außerdem berücksichtigt werden, dass unter Umständen die Größe der gebildeten Polyplexe während der Transfektionszeit weiter zunehmen kann. Dies ist abhängig vom Medium: Ohne den Zusatz von Serum konnten Pezzoli *et al.* beobachten, dass die Polyplexgröße im Verlauf von vier Stunden um mehr als das Sechsfache ansteigt, während die Polyplexe ihre Größe in serumhaltigen Medium nahezu gar nicht änderten. Sie erklären dies durch die zeitnahe Adsorption von Serumproteinen an die Polyplexe, wodurch langfristig die Aggregation der Polyplexe aufgrund fehlender Partikel-Partikel-Interaktionen verhindert wird [45].

Die DNA-PEI-Komplexe werden endozytotisch von der Zelle aufgenommen, wobei mehrere Aufnahmewege infrage kommen [46]. Bei der Clathrin-vermittelte Endozytose binden die Polyplexe in bestimmten Bereichen der Membran an Rezeptoren. Diese Bereiche sind von innen mit dem Protein Clathrin beschichtet und lösen nach der Polyplex-Bindung die Einstülpung der Membran aus [47]. Eine andere Aufnahmemöglichkeit ist die Caveolae-vermittelte Endozytose. Caveolae sind spezielle so genannte *Lipid Rafts*, also Membranbereiche mit einer bestimmten Zusammensetzung aus Proteinen und Lipiden mit dem strukturgebende Protein Caveolin. Rejman *et al.* konnten zeigen, dass die Polyplexe über beide Wege aufgenommen werden, allerdings lediglich die Caveolae-vermittelte Aufnahme zu einer erfolgreichen Transfektion führt [46]. Eine weitere Theorie ist, dass die Komplexe über Syndecan-Rezeptoren der Zellen an der Oberfläche gebunden werden und anschließend eine Einkapselung stattfindet. Über die Actin-Filamente werden sie dann ins Innere der Zellen gezogen [48].

Nach der Aufnahme befinden sich die Polyplexe innerhalb der Endosomen. Der Freisetzungsmechanismus ist noch nicht eindeutig geklärt. Er könnte nach der so genannten Protonenschwamm-Theorie ablaufen [49]: Da jedes dritte Atom des PEI ein Stickstoffatom ist, ist die kationische Ladungsdichte besonders hoch. Unter physiologischen Bedingungen sind etwa 20 % der Stickstoffatome protoniert [50]. Aufgrund dieser hohen Pufferkapazität kann PEI im Endosom Protonen binden und damit eine Ansäuerung verhindern. Die im pH-Bereich von 5–6,5 aktiven lysosomalen Nukleasen werden dadurch inhibiert und die DNA vor dem Abbau geschützt [51]. Außerdem werden vermehrt Protonen über membranständige ATPasen ins Innere der Endosomen gepumpt, die das passive Einströmen von Chloridionen fördern. Dies führt zu einem Ionenungleichgewicht zwischen Endosom

und Cytoplasma. Durch den Einstrom von Wasser kommt es zu einer osmotischen Lyse der Endosomen. Das Aufplatzen setzt die Polyplexe ins Cytoplasma frei.

Die Protonenschwamm-Theorie ist umstritten [52]. So konnte beispielsweise der erwartete Anstieg des pH-Werts innerhalb der Endosomen durch den Einsatz von Nanosensoren nicht nachgewiesen werden [51, 53]. In einem mathematischen Modell haben Won *et al.* gezeigt, dass der theoretische osmotische Druck und die damit verbundene Anschwellung der Endosomen nicht die alleinige Erklärung für das Aufplatzen der Endosomen sein kann [54]. Faktoren, wie die unterschiedlichen Endosom-Größen in verschiedenen Zellen sowie die Interaktion der Polymere mit der Membran, müssen ebenfalls berücksichtigt werden [43, 55].

Nach der Freisetzung des Polyplexes muss die Fremd-DNA vom Polymer dissoziieren. Sobald dies geschehen ist, geht die freie DNA sowohl spezifische als auch unspezifische Bindungen mit verschiedenen Zellproteinen ein. Bei der Transfektion mit dem GFP-Expressionsvektor pEGFPN1 (Clontech) konnten mehr als 600 solcher Proteine identifiziert werden [56]. Diese Proteine unterstützen die DNA beim Transport entlang des Cytoskeletts durch das Cytoplasma zum Nucleus, wo die Gensequenz dann transkribiert wird [57].

2.2.2.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz beschreibt, in wie vielen Zellen die DNA-Aufnahme in den Nucleus und die Transkription sowie die Translation des Gens erfolgreich ist. Methoden zur Bestimmung basieren auf einem Reporter, der durch die Expression des Zielgens messbar gemacht wird. So kann beispielsweise durch das Einbringen der für das fluoreszierende Protein GFP (*Green Fluorescent Protein*) codierenden Gensequenz die Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden.

Eine andere Methode zur Bestimmung der Transfektionseffizienz ist die Nutzung eines Reporter-Plasmids, das für eine Luciferase codiert. Ein Beispiel hierfür ist das pGL3-Plasmid. Bei erfolgreicher Transfektion wird das Biolumineszenz auslösende Enzym Luciferase gebildet. Die Lumineszenz kann dann mit einem Luciferase-Assay-System nachgewiesen werden.

Bei beiden Methoden ist zu beachten, dass sowohl die Aufnahme der DNA in die Zelle und den Nucleus als auch die Transkription und Translation ablaufen müssen. Die Transfektionseffizienz kann also nicht direkt nach der Transfektion bestimmt werden.

Ein Ansatz, der die direkte Bestimmung der Transfektionseffizienz erlaubt, ist die Markierung der Plasmid-DNA mit einem Farbstoff. Damit soll die Verfolgung der DNA innerhalb der Zelle ermöglicht werden. Der Zusammenhang zwischen Aufnahme der DNA und tatsächlicher Expression des Zielgens muss dafür allerdings zuvor bestimmt werden.

2.2.2.4 Einflüsse auf die Transfektionseffizienz

Es gibt sehr viele Faktoren, die die Transfektion und ihre Effizienz beeinflussen. Neben der Wahl und Konzentration des Transfektionsreagenzes und des Plasmids beeinflusst die Zelllinie selbst das Ergebnis. Alter und damit die Passagenanzahl, Viabilität und Physiologie sind dabei wichtige Parameter, die immer im Zusammenhang zueinander betrachtet werden sollten.

Neben der Wahl eines geeigneten Transfektionsmedium, eines optimierten Protokolls (Reihenfolge der Zugabe von DNA und PEI) und damit auch der Größe der Polyplexe sowie weiterer Parameter hat das Verhältnis von positiv geladenen Stickstoffatomen und negativ geladenen Phosphaten, kurz N/P-Verhältnis, einen großen Einfluss auf die PEI-vermittelte Transfektion. Um stabile Komplexe zu erhalten, sollte das N/P-Verhältnis einen Wert von mindestens 2-3 haben und etwa 90 % der geladenen Gruppen neutral sein [43, 58].

3 Experimenteller Teil

In dieser Arbeit werden Ansätze zur Herstellung des rekombinanten humanen *Transforming Growth Factor-β3* untersucht. Dabei werden verschiedene Produktionssysteme getestet. Im industriellen Bereich der Proteinproduktion werden unterschiedlichste Zellsysteme genutzt. Neben Hefen sind bakterielle und Säugetierzellen die am weitesten verbreiteten Expressionssysteme. Aus diesem Grund ist der Vergleich dieser Systeme besonders interessant. Es wurden der bakterielle Organismus *Escherichia coli* und zwei Säugerzelllinien (CHO-K1 und HEK293) ausgewählt. Die Systeme werden im Folgenden zunächst getrennt voneinander betrachtet und die durchgeführten Experimente beschrieben.

3.1 Arbeiten in *Escherichia coli*

Die Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien wird in der Biotechnologie häufig als Methode der Wahl eingesetzt. Aufgrund kurzer Generationszeiten und einfacher Kultivierungsbedingungen kann in Bakterien eine sehr hohe und dabei kostengünstige Produktausbeute erreicht werden, ohne dass eine Virusanreicherung erfolgen muss. Gleichzeitig müssen aber auch die potenziell problematischen Aspekte bakterieller Systeme berücksichtigt werden. Gerade sehr komplex gefaltete Proteine bergen ein höheres Risiko für Fehlfaltungen. Pharmazeutische Produkte, die intrazellulär gebildet werden, müssen besonders intensiv betrachtet werden: Durch den Zellaufschluss während der Proteinaufreinigung können Endotoxine freigesetzt werden, die bei Patienten allergische Reaktionen auslösen können.

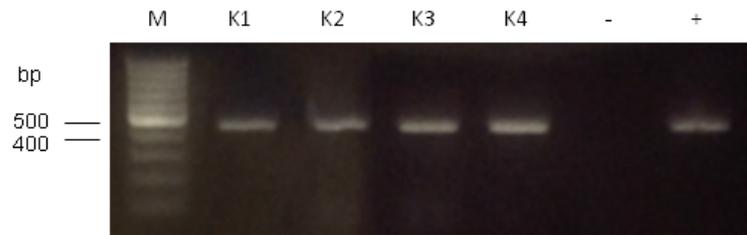


Abbildung 3.1: Agarosegel zum Nachweis der erfolgreichen Hitzeschock-Transformation mittels Kolonie-PCR. Aufgetragen wurden ein molekularer Größenstandard (M), die Amplifikate der gepickten Klone (K1–K4), eine Negativkontrolle (-) und der aufgereinigte Vektor als Positivkontrolle (+).

3.1.1 Molekularbiologische Arbeiten

Für eine erfolgreiche Produktion eines humanen Proteins in Prokaryoten ist es notwendig einige Anpassungen der für das Protein codierenden Gensequenz vorzunehmen. Da die Bakterien die menschlichen Sekretionssignale nicht verarbeiten können und die LAP-Sequenz nicht abgespalten werden kann, wurde ein künstliches Gen für das mature TGF- β 3 ohne das Prepropeptid entwickelt. Als Grundlage diente die Sequenz des humanen TGF- β 3-Proteins (NCBI Reference Sequence: NP.001316868.1, siehe Abschnitt A.5). Die reverse Translation in eine Gensequenz wurde unter Berücksichtigung der Codonverwendung von *E. coli* durchgeführt. Dies ist notwendig, da sich die Häufigkeitsverteilung der Codons in verschiedenen Organismen unterscheiden kann und nur eine optimale Verwendung zu einer schnellen und fehlerfreien Translation im Zielorganismus führt. Die konstruierte Sequenz (siehe Abschnitt A.5.2.1) wurde mithilfe der Restriktionsenzyme NcoI und XhoI gerichtet in den Vektor pET-16b kloniert, sodass das TGF- β 3-Gen unter Kontrolle des T7-Promotors steht. Der korrekte Einbau wurde anschließend mittels einer Sequenzierung bestätigt.

Nach der Amplifizierung des Plasmids in dem chemisch kompetenten *E. coli*-Stamm Top10 und einer anschließenden Plasmidaufreinigung (siehe Abschnitt B.1.2.4) wurde der Vektor pET-16b-TGF- β 3 mittels Hitzeschock-Transformation (siehe Abschnitt B.1.2.3) in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) eingebracht. Es erfolgte eine Kolonie-PCR (siehe Abschnitt B.1.2.5) von vier Bakterienkolonien zur Überprüfung der Aufnahme eines vollständigen Plasmids. Abbildung 3.1 zeigt, dass in allen Kolonien ein TGF- β 3-Amplifikat bei etwa 480 Basenpaaren (bp) nachgewiesen werden konnte. Von den ausgewählten Kolonien wurden Ge-

frierkulturen angelegt (siehe Abschnitt B.2.1.5) und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Es wurden aus allen gezeigten Kolonien die Plasmid-DNA aufgereinigt und erneut extern sequenziert. Für die folgenden Experimente wurde Klon 2 ausgewählt.

3.1.2 Kultivierung und Produktion

Die Kultivierung des ausgewählten Klons zur TGF- β 3-Produktion wurde im Schüttelkolbenmaßstab bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 180 rpm durchgeführt. Die IPTG-Induktion der Proteinexpression wurde bei einer optischen Dichte (Wellenlänge = 600 nm, OD_{600}) in einem Bereich von 0,4 bis 0,6 durchgeführt. Es wurde eine IPTG-Endkonzentration von 1 mM eingesetzt. Um die TGF- β 3-Expression nachweisen zu können, wurden vor der Induktion sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion 1 mL Kulturbrühe entnommen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation vom Medium getrennt und das Zellpellet bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Analyse gelagert. Der Zellaufschluss nach der Kultivierung wurde mit dem Proteinextraktionsreagent BugBuster[®] durchgeführt. Dieses Reagent enthält eine Mixtur nicht-ionischer und zwitterionischer Detergenzien und löst eine Perforation der Zellwände aus, ohne dabei Proteine zu denaturieren. Die lösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation von der nicht-löslichen abgetrennt und die Proben elektrophoretisch aufgetrennt.

Das Gel der SDS-PAGE in Abbildung 3.2 weist in den Proben zum Zeitpunkt der IPTG-Zugabe (0 h) keine Banden auf. Es kommt also zu keiner auffälligen Basalexpression des TGF- β 3-Gens. Nach der Induktion sind in den unlöslichen Fraktionen Banden auf Höhe von etwa 12,5 kDa zu sehen, die für eine Expression des TGF- β 3-Monomers sprechen und auf eine Aggregatbildung innerhalb der Bakterien hinweisen. Diese so genannten *Inclusion Bodies* (IBs) oder Einschlusskörperchen bestehen zumeist aus unvollständig oder fehlerhaft gefalteten Proteinen. Sie reichern sich im Zytoplasma an und sind unter anderem auf hohe Expressionsraten eines (heterologen) Proteins zurückzuführen. Eine auf die Aufreinigung der IBs folgende Resuspendierung und eine anschließende Renaturierung mit chemischer Unterstützung kann zu einem korrekt gefalteten und bioaktiven Protein führen [59, 60]. Der Vorteil von IBs ist, dass das Zielprotein bereits in einer recht hohen Reinheit vorliegt.

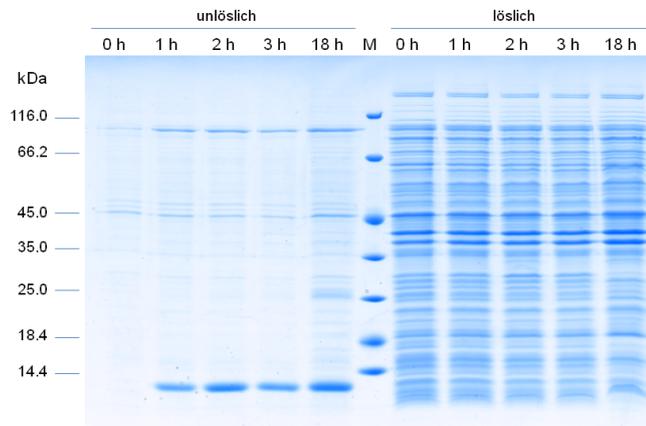


Abbildung 3.2: Gel einer SDS-PAGE. Aufgetragen sind unlösliche und lösliche Fraktionen von aufgeschlossenen Zellproben (mit BugBuster[®]) von unterschiedlichen Zeitpunkten nach IPTG-Zugabe.

3.1.3 Optimierung der Kultivierungsparameter

Nachdem die Expression des *TGF- β 3*-Gens erfolgreich umgesetzt werden konnte, folgte eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen. Dabei wurden die Parameter Temperatur, Konzentration des Induktors IPTG und Zelldichte zum Zeitpunkt der Induktion (OD_{600}) ausgewählt. Zur Optimierung wurde die statistische Versuchsplanung (*Design of Experiment, DoE*) genutzt. Dazu wurden die einzelnen Einflussgrößen nach einem Versuchsplan miteinander kombiniert und der mathematischer Zusammenhang ermittelt. Mittels dieser Methode kann mit wenigen Experimenten eine hohe Informationsdichte gewonnen werden.

In dem eingesetzten Versuchsdesign, ein Box-Behnken-Versuchsplan, spannen die drei Parameter Temperatur, IPTG-Konzentration und OD_{600} einen quadratischen Versuchsraum auf (siehe Abbildung 3.3). Es werden insgesamt 15 Versuche durchgeführt, wobei davon drei so genannte Zentralversuche sind (dunkelblauer Kreis in Abbildung 3.3). Sie stellen die Reproduzierbarkeit dar und werden zur statistischen Absicherung gemacht. Die restlichen 12 Versuche werden so angeordnet, dass sie sich auf den Verbindungslinien zwischen den Ecken des Würfels befinden. Somit sind zwei der drei Parameter auf einem minimalen oder maximalen Wert, der dritte liegt genau mittig dazwischen. Für die untersuchten Parameter

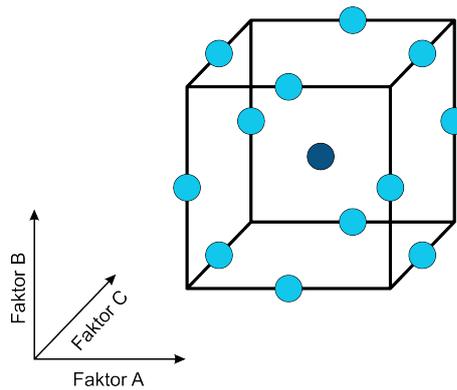


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Parameterraums eines Box-Behnken-Versuchsplans. Die Faktoren A, B und C spannen den Versuchsraum auf; die hellblauen Punkte stellen die Versuche, der dunkelblaue die Zentralversuche dar.

wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten Intervalle genutzt. Mithilfe der Software MODDE[®] (Fa. Umetrics) wurde ein Versuchsplan erstellt (siehe Tabelle C.1).

Tabelle 3.1: Parameter und Intervalle des DoE-Versuchsplans.

Parameter	Intervall
Induktions-OD ₆₀₀	0,2 – 1
IPTG-Konzentration	0,1 – 1 mM
Kultivierungstemperatur	20 – 37 °C

Es wurden je 100 mL LB-Medium in 500-mL-Kolben mit 300 μ L Ampicillin vorbereitet und mit 1 mL Vorkultur angeimpft. Die Kultivierungstemperatur bis zur gewünschten OD₆₀₀ und der anschließenden Induktion lag bei 28,5 °C. Die Induktion erfolgte mit einer entsprechenden IPTG-Konzentration. Für die Aufnahme einer Wachstumskurve wurde die Proteinexpression in einem zusätzlichen Kolben nicht induziert. Es erfolgte nach der Induktion eine stündliche Probennahme (Volumen: 1 mL) und zusätzlich eine OD₆₀₀-Bestimmung über neun Stunden. Die Kultivierung wurde 20 Stunden nach Induktion beendet. Sowohl die zwischen- durch genommenen Proben als auch die Kulturbrühe wurden abzentrifugiert und die Zellpellets für weitere Analysen bei -20 °C gelagert.

Die Wachstumskurven der DoE-Experimente, die in Abbildung 3.4 gezeigt sind, weisen einen für Bakterien typischen sigmoiden Verlauf auf. Die Kulturen, die nach der Induktion bei 37 °C (Abbildung 3.4B) bzw. 28,5 °C (Abbildung 3.4C) kultiviert wurden, steigen zu ähnlichen Zeitpunkten mit vergleichbaren Steigun-

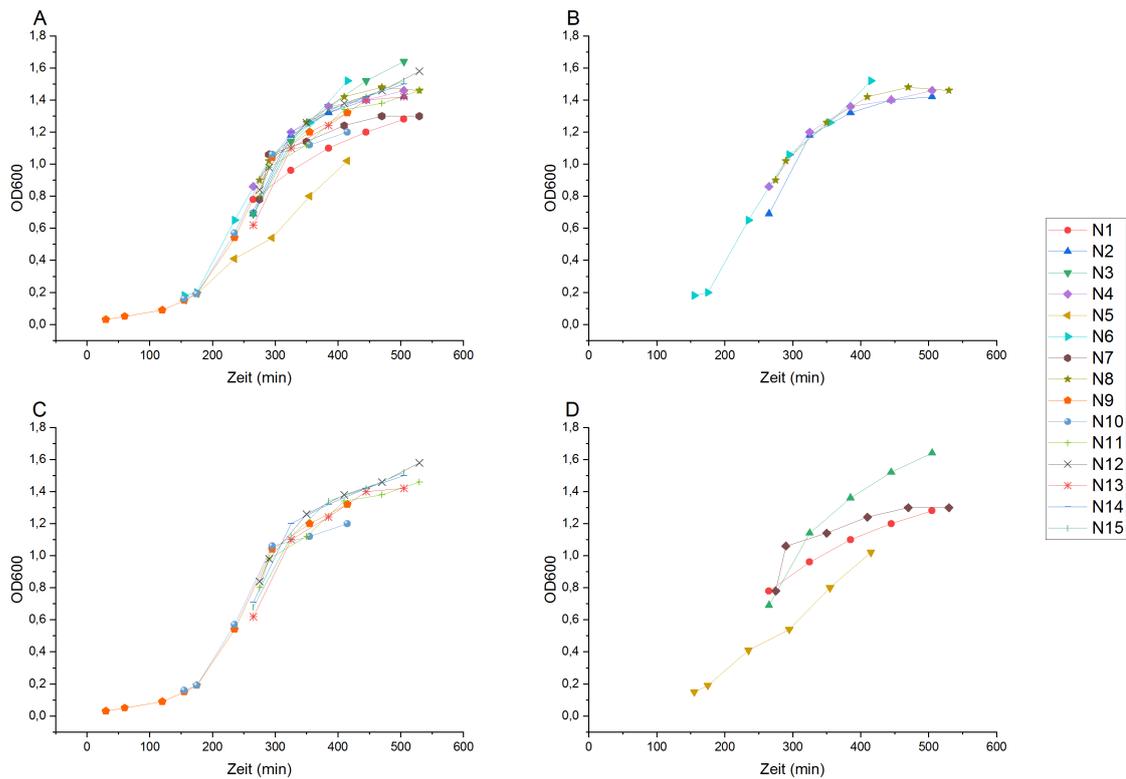


Abbildung 3.4: Wachstumskurven der verschiedenen Kultivierungsansätze N1 bis N15 (vgl. Tabelle C.1). Dargestellt sind alle Wachstumskurven im Vergleich (A) bzw. ein Vergleich der Wachstumskurven, deren Kulturen nach der Induktion bei 37 °C (B), 28,5 °C (C) und 20 °C (D) kultiviert wurden.

gen an. Sie erreichen außerdem ähnlich hohe OD_{600} -Werte. Im Gegenteil dazu flachen die Wachstumskurven der bei 20 °C kultivierten Bakterienkultur schon früher ab. Das Zellwachstum ist bei niedrigeren Temperaturen langsamer im Vergleich zu höheren Temperaturen. Die Kultur, die mit der höchsten IPTG-Konzentration induziert wurde, bildet eine Ausnahme. Sie erreicht im Vergleich mit allen Wachstumskurven die höchste optische Dichte. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur Literatur: Dort wird beschrieben, dass eine höhere IPTG-Konzentration zu einem verminderten Zellwachstum führt [61–63]. Ein Fehler bei der Durchführung der Kultivierung, beispielsweise der Einsatz einer geringeren IPTG-Konzentration als geplant, könnte für dieses Ergebnis verantwortlich. Die Überprüfung durch eine Wiederholung des Experiments wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Für die densitometrische Konzentrationsbestimmung wurden Proben, die vier Stunden nach der jeweiligen Induktion genommen wurden, ausgewählt. Zu die-

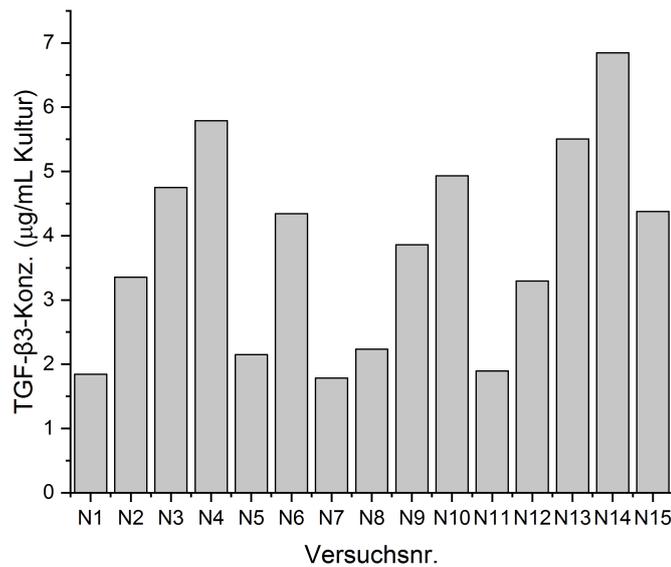


Abbildung 3.5: Densitometrisch ermittelte TGF-β3-Konzentrationen in μg pro mL Kultur.

sem Zeitpunkt befinden sich die Zellen hauptsächlich im Übergang vom exponentiellen Wachstum in die stationäre Phase und sollten eine aussagekräftige Menge TGF-β3 exprimiert haben. Die Proben wurden auf denselben OD₆₀₀-Wert verdünnt und nach dem Zellaufschluss zusammen mit einer BSA-Standardreihe auf SDS-Gele aufgetragen. Die Auswertung der Gele wurde mit dem 1D-Gelelektrophorese-Bildanalyse-Programm GelAnalyzer durchgeführt. Das Programm bestimmt die Farbdichte der BSA-Banden und trägt diese gegen die eingesetzte Proteinkonzentration auf. Mithilfe der Geradengleichung der Trendlinie und der Farbdichte der zu untersuchenden Proteinbanden kann die TGF-β3-Konzentration der jeweiligen Probe ermittelt werden. Die Proben wurden auf den gleichen OD₆₀₀-Wert normiert. Anschließend wurde die TGF-β3-Konzentration, bezogen auf das Kulturvolumen, berechnet (siehe Abbildung 3.5). Die niedrigsten erreichten TGF-β3-Konzentrationen (N1, N5, N7, N8, N11) liegen im Bereich von 1,8 bis 2,2 μg/mL Kultur. Die von den Zentralversuchen N13–N15 abgesehen höchste Konzentration wurde in Versuch N4 mit 5,8 μg/mL Kultur erreicht.

Anhand dieser Daten wurde mit MODDE[®] ein Modell entworfen, welches eine Aussage über zukünftig durchgeführte Experimente im untersuchten Versuchsraum zulässt und zur Bestimmung der optimalen Kultivierungsparameter für eine hohe TGF-β3-Ausbeute beiträgt (siehe Tabelle 3.2). Mithilfe der Regression der partiellen kleinsten Quadrate (*partial least square regression*, PLS) werden die signifikanten Einflussfaktoren unter Nutzung des Koeffizientendiagramms (sie-

he Abbildung C.1) identifiziert. Im Anschluss wurde die Gültigkeit des Modells anhand von Kenngrößen überprüft (siehe Tabelle 3.2 und Abschnitt B.6.3). Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt an, inwiefern das Regressionsmodell die Rohdaten wieder spiegelt, und sollte für eine minimale Anpassung einen Wert von $>0,5$ in einem Bereich von 0 bis 1 liegen. Der ermittelte Wert von 0,872 weist auf ein gutes Modell hin. Unter Berücksichtigung von Q^2 , der Vorhersagegüte, kann die Vorhersagbarkeit von zukünftigen Experimenten mithilfe des berechneten Regressionsmodells abgeschätzt werden. Der in diesem Versuch ermittelte Q^2 -Wert von 0,623 liegt oberhalb der minimalen Anforderung von 0,5. Die Differenz zwischen R^2 und Q^2 ergibt einen Wert von 0,249 und ist damit unterhalb des maximalen für eine gute Vorhersagegüte sprechenden Werts von 0,3. Die Modellvalidität beschreibt das Maß, in dem das Regressionsmodell für die Beschreibung des Systemverhaltens geeignet ist. Ist der Wert größer als 0,25, ist der Fehler des Modells im gleichen Rahmen wie der reine Fehler. Dies ist im berechneten Modell mit einem Wert von 0,97 der Fall. Die Reproduzierbarkeit lässt Aussagen über die Wiederholbarkeit der Experimente zu. Mit einem Wert von 0,59 liegt die Reproduzierbarkeit in diesem Versuch oberhalb der Minimalanforderung von 0,5 im Bereich zwischen 0 und 1 und somit in einem annehmbaren Rahmen [64].

Tabelle 3.2: Kenngrößen zur Einschätzung der Güte des aufgestellten Modells.

Kenngröße	Wert
Bestimmtheitsmaß R^2	0,872
Vorhersagegüte Q^2	0,623
$R^2 - Q^2$	0,249
Modellvalidität	0,97
Reproduzierbarkeit	0,59

Die Ergebnisse können durch MODDE[®] in 4D-Konturdiagrammen ausgegeben werden (siehe Abbildung 3.6). Es wird deutlich, dass die IPTG-Konzentration den größten Einfluss auf die TGF- β 3-Ausbeute hat. Die höchste Zielprotein-Konzentration wird bei Kultivierungstemperaturen zwischen 25 und 37 °C bei einer Induktions- OD_{600} in einem Bereich von 0,2 bis 0,7 mit dem Einsatz von 1 mM IPTG erreicht (siehe Abbildung 3.6C). Der Einsatz von 45 % weniger IPTG (0,55 mM) verringert die Zielprotein-Ausbeute um lediglich 17 % (siehe Abbildung 3.6B). Dabei sind die Bereiche von Kultivierungstemperatur und Induktions-

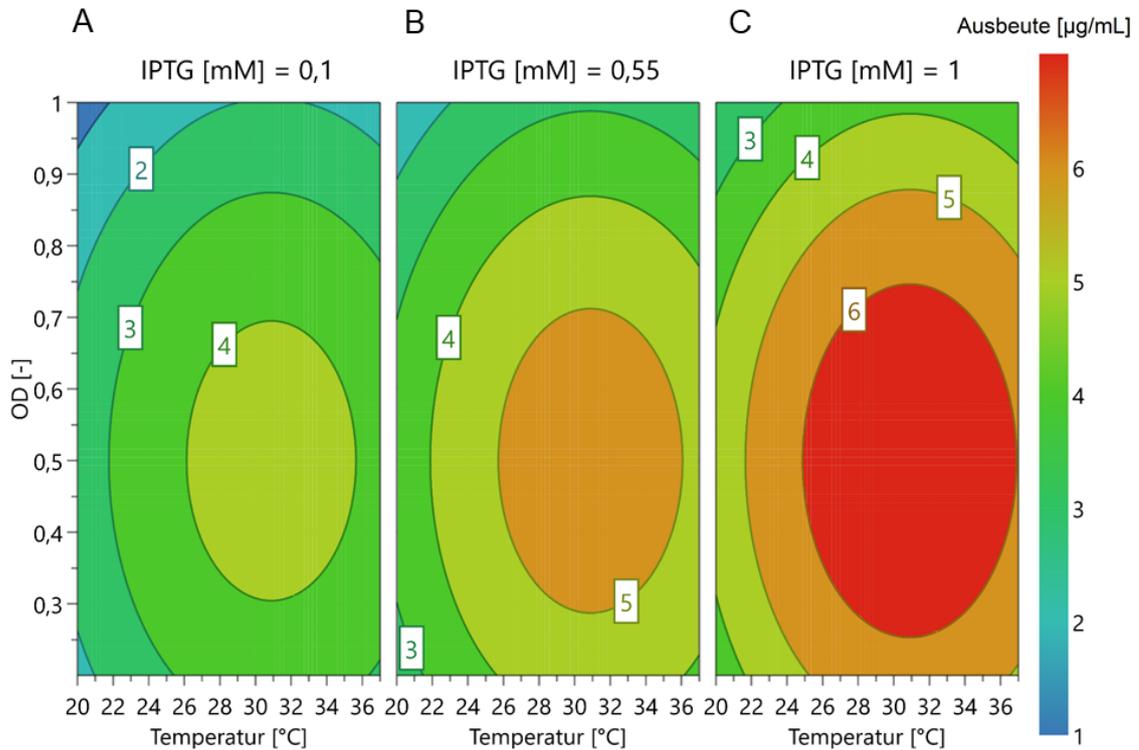


Abbildung 3.6: 4D-Konturdiagramm unter Anwendung des ermittelten Regressionsmodells. Aufgetragen sind Temperatur gegen Induktions-OD₆₀₀ bei IPTG-Konzentrationen von 0,1 mM (A), 0,55 mM (B) und 1 mM (C).

OD₆₀₀ jeweils kleiner als unter den zuvor beschriebenen Bedingungen, wären mit 26 bis 35 °C und OD₆₀₀-Werten von 0,3 bis 0,7 aber weiterhin sehr gut umsetzbar.

Ausgehend von den dargestellten Ergebnissen wurden die Parameter zur Produktion von TGF-β3-IBs festgelegt. In Hinblick auf die Kosten-Nutzung-Analyse des IPTGs wurde für die nächsten Versuche eine Konzentration von 0,5 mM gewählt. Als Induktionszeitpunkt wurde der OD₆₀₀-Bereich von 0,4 bis 0,6 festgelegt. Unter allen getesteten Kultivierungsbedingungen befinden sich die Bakterien in diesem Bereich im exponentiellen Wachstum (siehe Abbildung 3.4) und daher ist er für die Produktion eines rekombinanten Proteins gut geeignet. Als Kultivierungstemperatur wurden 32 °C gewählt, da bei diesem Wert auch bei geringeren IPTG-Konzentrationen noch ein Maximum an Ausbeute erzielt wird. Unter diesen Bedingungen kann eine Zielproteinkonzentration von über 5 µg/mL Kultur erwartet werden.

3.1.4 Versuche zur Solubilisierung der IBs

Das Zielprotein TGF- β 3 liegt mit dem gewählten *E. coli*-Stamm und den Kultivierungsbedingungen in Proteinaggregaten vor. Um das Zielprotein mit biologischer Aktivität einsetzen zu können, muss es zunächst in Lösung gebracht werden. Generell ist für eine Solubilisierung die Denaturierung der aggregierten Proteine nötig. Die verschiedenen Bindungskräfte, wie Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte und ionische oder hydrophobe Wechselwirkungen, können durch physikalische oder chemische Eingriffe gestört und die Aggregate dadurch aufgelöst werden.

Für die Solubilisierung der vorliegenden IBs wurde der Einsatz von Harnstoff getestet. Die chaotrope Verbindung verringert hydrophobe Effekte und führt zu einer Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen, wobei der genaue Mechanismus noch immer nicht eindeutig identifiziert wurde. Es wird vermutet, dass neben diesem indirekten Einfluss von Harnstoff auch eine direkte Interaktion mit dem Protein stattfindet [65]. Um eine Lösung des TGF- β 3-Proteins zu erreichen, wurden Versuche sowohl bei Raumtemperatur als auch mit Einfrier-Auftau-Zyklen nach Qi *et al.* durchgeführt (siehe Abschnitt B.2.3) [66]. Dabei konnte kaum bis kein lösliches Protein nachgewiesen werden (siehe Abschnitt C.3).

In einem zweiten Versuch wurde ein Essigsäure-haltiger Puffer eingesetzt und zwei Inkubationszeiten (10 Minuten und über Nacht) miteinander verglichen (siehe Abschnitt B.2.3) [67]. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 anhand des Gels einer SDS-PAGE zu sehen. Unter beiden getesteten Bedingungen können Banden auf der Höhe des Zielproteins (12,5 kDa) in jeweils beiden Fraktionen nachgewiesen werden. Die densitometrische Auswertung zeigt, dass die kürzer inkubierte Probe in der löslichen Fraktion 40 % des Zielproteins aufweist. Der Anteil solubilierten TGF- β 3s in der über Nacht inkubierten Probe ist mit 67 % deutlich höher.

Eine Solubilisierung des Zielproteins in einem Essigsäure-haltigen Puffer ist folglich möglich ist. Der Ansatz wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. In zukünftigen Versuchen sollte überprüft werden, ob die Löslichkeit nach einem Pufferwechsel weiterhin gegeben ist.

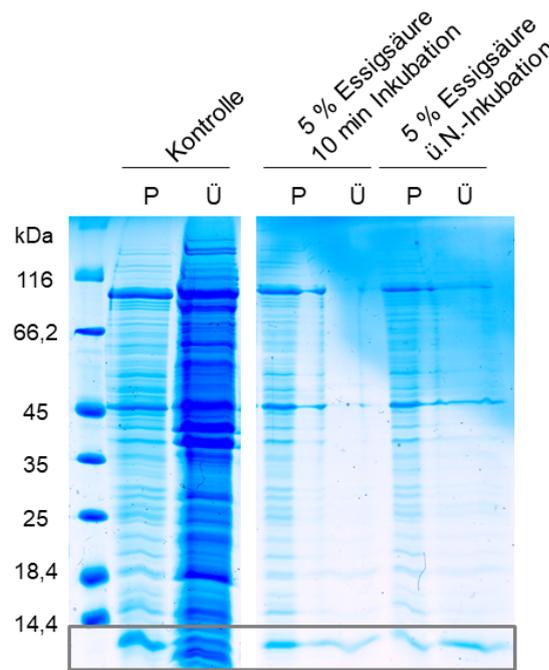


Abbildung 3.7: Gel der SDS-PAGE zur Überprüfung der Solubilisierungseigenschaften des Essigsäure-haltigen Puffers. Die Zellproben aus *E. coli* wurden mit BugBuster[®] aufgeschlossen und das Pellet anschließend mit dem Puffer versetzt. Aufgetragen sind die nicht-löslichen Fraktionen (P), die löslichen Fraktionen (Ü) sowie eine nicht-solubilierte Probe nach dem Zellaufschluss (Kontrolle); Coomassie-Färbung.

3.1.5 Alternativer *E. coli*-Stamm SHuffle[®]

In den vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass *E. coli* BL21(DE3) das Zielprotein TGF- β 3 als Monomer in IBs produziert. Der Einsatz des ausgewählten Stamms ist für die Bildung von Disulfidbrückenbindungen nicht optimal. Das bioaktive Zielprotein liegt als Homodimer vor, wobei die Monomere intermolekular über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. In einem nächsten Schritt wurde getestet, ob ein Wechsel des Produktionsstamms die Dimer-Ausbeute deutlich steigern kann.

Ausgewählt wurde der *E. coli*-Stamm SHuffle[®] (Fa. New England Biolabs, USA), da dieser so ausgelegt ist, dass auch Proteine mit vielen Disulfidbrücken korrekt gefaltet werden können [68]. Dafür exprimieren die Bakterien eine chromosomale Kopie der Disulfidbindungsisomerase DsbC. Diese unterstützt die Korrektur falsch-oxidierter Proteine in ihre korrekte Form. Das TGF- β 3-Plasmid wurde in den *E. coli*-Stamm SHuffle[®] eingebracht und dieser kultiviert. Kulturproben, die

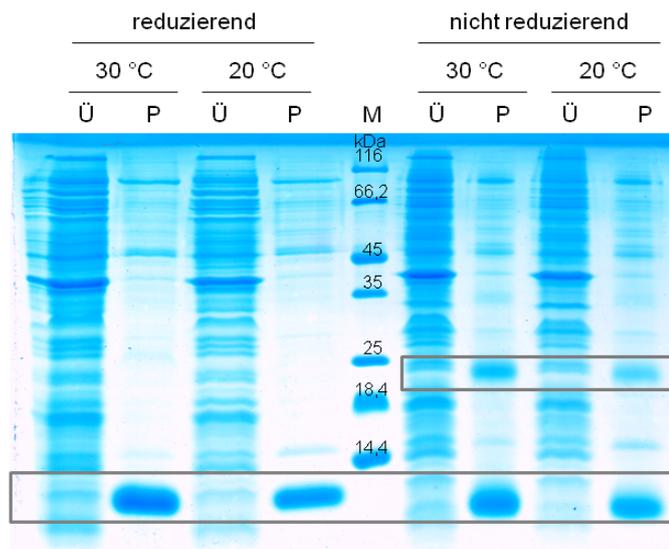


Abbildung 3.8: Nicht-reduzierendes SDS-Gel zur TGF- β 3-Expression im *E. coli*-Stamm SHuffle[®] bei 20 und 30 °C Kultivierungstemperatur. Die Proben wurden vier Stunden nach IPTG-Induktion genommen. Aufgetragen sind ein molekularer Größenstandard (M), die unlöslichen Fraktionen (P) sowie die löslichen Fraktionen (Ü); Coomassie-Färbung.

vier Stunden nach der Induktion entnommen und mit BugBuster[®] aufgeschlossen wurden, wurden elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abbildung 3.8). Dabei wurden ein reduzierender und ein nicht-reduzierender Probenpuffer eingesetzt. Letzterer dient dem Nachweis von Dimeren, da er nicht zu einer Spaltung der Disulfidbrücken führt. Die Verwendung eines reduzierenden SDS-Probenpuffers ergibt ein ähnliches Bandenmuster wie bei den Kultivierungen des *E. coli*-Stamms BL21(DE3). Das Zielprotein liegt unlöslich vor. Werden die Proben in einem nicht-reduzierenden Puffer aufgetragen, ist jeweils eine neue Bande in den nicht-löslichen Fraktionen auf der Höhe von etwa 25 kDa zu erkennen. Diese sprechen für die Bildung von dimerem TGF- β 3. Allerdings ist der Dimer-Anteil an der Gesamtmenge TGF- β 3 lediglich 28,3 % bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C bzw. 20,8 % bei 20 °C. Ein Großteil der Proteinausbeute müsste also nach einer Aufreinigung dennoch in einem zusätzlichen Schritt bei der korrekten Faltung unterstützt werden. Daher wurden keine weiteren Versuche in diese Richtung mehr unternommen, sondern stattdessen weitere Möglichkeiten zur Erhöhung der Löslichkeit gesucht.

3.1.6 Thioredoxin-Fusionsprotein zur Erhöhung der Löslichkeit

In den vorherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die Produktion von TGF- β 3 in *E. coli* BL21(DE3) möglich ist. Es werden unlösliche Proteinaggregate gebildet, die zu einem sehr großen Teil aus (fehlgefalteten) Monomeren bestehen. Mittels eines Essigsäure-haltigen Puffers konnte ein Teil dieser *Inclusion Bodies* solubilisiert werden. Es wurde eine alternative Methode gesucht, die die Löslichkeit des Proteins schon während der Expression erhöht. Neben dem Einbringen von Co-Chaperonen, die die Faltung der Proteine unterstützen sollen, gibt es die Möglichkeit ein löslichkeitunterstützendes Fusionsprotein zusammen mit dem Zielprotein zu exprimieren. Beliebte Fusionsproteine sind neben dem Maltose-bindenden Protein (MBP), dem *N-utilization substance protein A* (NusA), der Glutathion-S-Transferase (GST), Ubiquitin und dem kleinen Ubiquitinverwandten Modifikator (SUMO) das Thioredoxin 1 (TrxA).

Thioredoxin 1 aus *E. coli* ist an vielen Redox-Reaktionen beteiligt. Im aktiven Zentrum befindet sich ein Dithiol, welches zu einem Disulfid reversibel oxidiert werden kann und so Dithiol-Disulfid-Austauschreaktionen katalysiert. In der Biotechnologie wird das 109 Aminosäuren große Peptid als Fusionsprotein eingesetzt, denn es hat die Eigenschaft die Löslichkeit anderer Proteine heraufzusetzen [69]. Auch eine Coexpression von Thioredoxin kann zu diesem Ergebnis führen [70]. In dieser Arbeit wurde das als TrxA-Tag bezeichnete Fusionsprotein genutzt, um die Löslichkeit des Zielproteins TGF- β 3 bei der Produktion in *E. coli* zu erhöhen. Dafür wurde das *trxA*-Gen aus *E. coli* N-terminal an die TGF- β 3-Sequenz in den Vektor eingesetzt. Diese Konstellation wurde gewählt, da die Fusion mit Thioredoxin an den N-Terminus des Zielproteins die Translationseffizienz im Vergleich zu einer C-terminalen Fusion deutlich erhöht [71]. Kim *et. al* konnten so 2,8 mg bioaktives und tag-freies TGF- β 1 aus 100 mL Zellkultur aufreinigen [72].

Um die Aufreinigung des Zielproteins zu erleichtern, wurde ein Hexa-Polyhistidin-Tag zwischen *TrxA*- und TGF- β 3-Gen eingefügt. Durch dessen spezifische Bindungen an Kupfer- oder Nickelionen kann so mittels Affinitätschromatografie die Separation des Zielproteins erreicht werden. Zudem enthält der Vektor eine TEV-Peptidase-Schnittstelle, die die Abtrennung von TrxA- und Polyhistidin-Tag ermöglicht, da diese unter Umständen die korrekte Faltung oder die biologische Aktivität des Zielproteins beeinflussen können. Die TEV-Peptidase (*Tobacco*

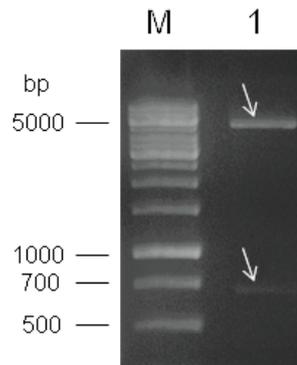


Abbildung 3.9: Agarosegel nach Restriktionsverdau. Aufgetragen sind ein DNA-Größenstandard (M) sowie eine Probe des Plasmids nach Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen XhoI und NcoI. Die DNA-Fragmente sind mit Pfeilen markiert.

Eth Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase) gehört zur Familie der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen und wird aufgrund ihrer hohen Sequenz-Spezifität (EN-LYFQ'G/S) häufig eingesetzt, um *in vivo* oder *in vitro* Fusionsproteine oder -Tags abzuspalten.

3.1.6.1 Molekularbiologische Arbeiten

Die Klonierung des Vektors wurde wie bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben durchgeführt. Es fand eine Überprüfung der Plasmidaufnahme in *E. coli* Top10 statt, indem das in *E. coli* vervielfältigte Plasmid aufgereinigt (siehe Abschnitt B.1.2.4) und mit den Restriktionsenzymen XhoI und NcoI verdaut wurde (siehe Abschnitt B.1.2.1). Die mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente sind in Abbildung 3.9 zu sehen. Die Restriktionsenzyme XhoI und NcoI haben das TrxA-TGF- β 3-Plasmid in zwei Fragmente geteilt. Das größere Fragment mit einer erwarteten Größe von 5643 bp ist deutlich besser zu erkennen, da sich an diesem während der Inkubation mehr Farbstoff angelagert hat. Die Bande des kleineren Fragments ist ebenfalls auf der erwarteten Höhe bei 710 bp zu finden. Das Plasmid konnte erfolgreich in *E. coli* Top10 vervielfältigt werden und weist ein Insert erwarteter Größe auf.

Anschließend wurde das Plasmid in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) eingebracht und über Nacht auf mit dem Selektionsmittel Ampicillin versetzten Agarplatten kultiviert. Die Plasmid-Aufnahme von drei ausgewählten Klonen wurde dann mit einer Kolonie-PCR überprüft. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.10 zu sehen.

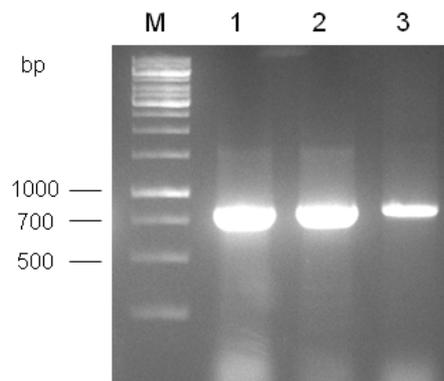


Abbildung 3.10: Agarosegel zum Nachweis der erfolgreichen Hitzeschocktransformation mittels Kolonie-PCR. Aufgetragen wurden ein DNA-Größenstandard (M) und die Amplifikate gepickter Klone (1-3).

Alle untersuchten Klone weisen eine Bande auf einer Höhe von etwa 750 bp auf. Da die theoretische Größe des Fragments 710 bp ist, kann daraus geschlossen werden, dass alle Klone die Plasmid-DNA aufgenommen haben. In der dritten Spur ist die Bande im Vergleich zu den anderen deutlich schmäler. Dies ist darauf zurückzuführen, dass weniger Ausgangsmaterial eingesetzt wurde. Für die weiteren Experimente wurde Klon 2 gewählt, Kryokulturen angelegt und die korrekte Aminosäuresequenz mittels Sequenzierung bestätigt. Diese stellte sicher, dass das Plasmid pET-16b-TrxA-TGF- β 3 nach den Klonierungsarbeiten noch immer das vollständige und unveränderte Insert beinhaltet.

3.1.6.2 Kultivierung

Mit dem ausgewählten Klon wurden Kultivierungen im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt. Zunächst wurde eine Kultivierungstemperatur von 37 °C ausgewählt und die Proteinexpression mit 1 mM IPTG induziert. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen, um per SDS-PAGE die Expression des TrxA-TGF- β 3-Fusionsproteins in löslicher oder unlöslicher Form nachweisen zu können. Die Proben wurden mithilfe des Proteinextraktionsreagenzes BugBuster[®] aufgeschlossen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Auf dem Gel der SDS-PAGE in Abbildung 3.11 sind die Überstände sowie die Pellets nach dem Zellaufschluss aufgetragen. Das lösliche Protein befindet sich im Überstand, das unlösliche Protein im Pellet. Die Proben vier Stunden nach IPTG-Induktion weisen auf einer Höhe zwischen 25 und 35 kDa eine deutliche Bande

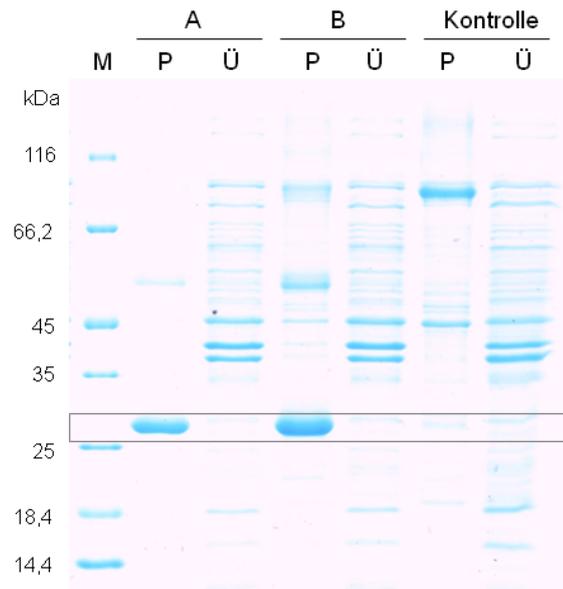


Abbildung 3.11: Reduzierendes SDS-Gel der Proben aus der Kultivierung bei 37 °C. Aufgetragen sind neben einem DNA-Größenstandard (M) die unlöslichen (P) und löslichen (Ü) Fraktionen zweier induzierter Kulturen (A und B) sowie einer nicht-induzierten Kultur als Kontrolle.

auf. Die theoretische Größe des monomeren TrxA-TGF- β 3 liegt bei etwa 26 kDa. Die nicht-induzierten Proben weisen auf dieser Höhe keine entsprechenden Banden auf. Dies zeigt, dass das Fusionsprotein bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C wie das unfusionierte Protein in Aggregaten vorliegt (siehe Abschnitt 3.1.2). Die Bandendicke lässt allerdings auf eine hohe Proteinexpression schließen.

Da niedrigere Inkubationstemperaturen dazu führen können, dass die Bakterien mehr Zeit für eine korrekte Faltung der Proteine haben und diese dann löslich vorliegen, wurde im Anschluss eine Kultivierung bei 20 °C durchgeführt. Es wurden 18 Stunden nach Induktion Zellproben genommen und die Proteine nach dem Zellaufschluss mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abbildung 3.12). Dabei wurden die Proben einmal mit einem reduzierenden und einmal mit einem nicht-reduzierenden Probenpuffer versetzt, um eine eventuelle Dimerisierung aufzeigen zu können. Die induzierten Proben weisen in beiden Puffern sowohl in der nicht-löslichen als auch in der löslichen Fraktion spezifische Banden auf einer Höhe von 26 kDa auf. In der Kontrollkultur sind keine entsprechenden Banden zu finden. Dies bedeutet, dass die Bakterien bei einer niedrigen Kultivierungstemperatur von 20 °C das Zielprotein löslich produzieren. Gleichzeitig ist keine

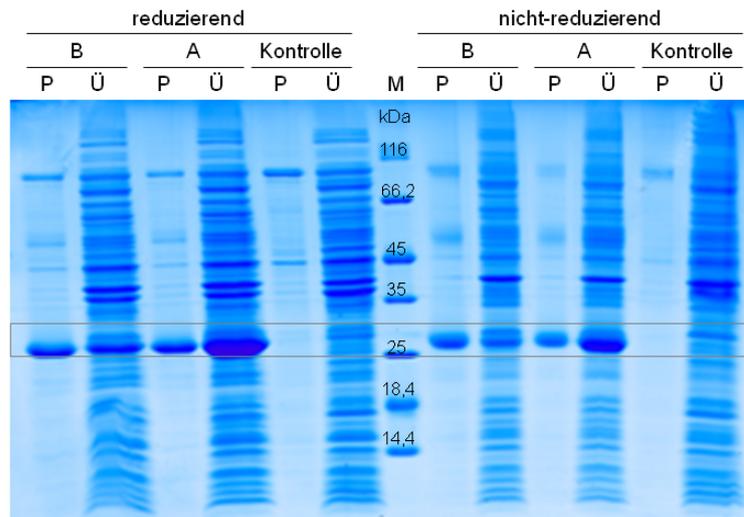


Abbildung 3.12: SDS-Gel der Proben aus der Kultivierung bei 20 °C, genommen 18 Stunden nach der IPTG-Induktion. Aufgetragen sind die unlöslichen (P) und löslichen (Ü) Fraktionen der induzierten Kultivierungen (A und B, Duplikate) sowie einer nicht-induzierten Kultivierung als Kontrolle unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen; Coomassie-Färbung.

unterschiedliche Verteilung der Banden des Zielproteins zu erkennen. Das spricht gegen die Bildung von Dimeren, die durch den Einsatz eines reduzierenden Puffers in die entsprechenden Monomere getrennt werden würden. Damit konnte gezeigt werden, dass das TrxA-TGF- β 3 bei 20 °C löslich produziert werden kann und dabei als Monomer vorliegt.

3.1.6.3 Zellaufschluss per Ultraschall

In den vorherigen Experimenten wurde für den Zellaufschluss nach der Kultivierung das Proteinextraktionsreagent BugBuster[®] eingesetzt. Dieses Reagenz vereinfacht den Aufschluss und ist für geringe Probenmengen sehr gut einsetzbar. Der Einsatz solcher Reagenzien ist allerdings oftmals problematisch, da diese einen Einfluss auf das Zielprotein haben können und die Abtrennung bei der Aufarbeitung schwierig sein kann. Im Folgenden wird überprüft, ob der mechanische Zellaufschluss per Ultraschall eine gute Alternative zur chemischen Aufschlussmethode darstellt. Um die Zelllyse zu erreichen, werden die Zellen in Intervallen energiereichen Ultraschallwellen ausgesetzt. Es entstehen Kavitationen, die nach kürzester Zeit in sich zusammenfallen und implodieren. Dadurch wird die Zellmembran geschädigt. Aufgrund der sich dabei entwickelnden Temperatur

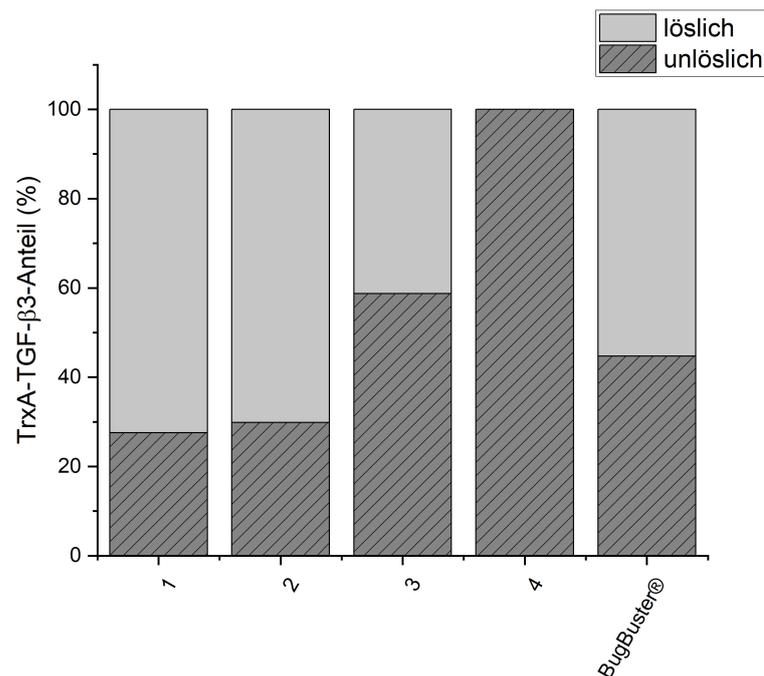


Abbildung 3.13: Vergleich des TrxA-TGF- β 3-Anteils in löslicher und unlöslicher Fraktion nach dem Ultraschall-Aufschluss in den getesteten Lysispuffern (vgl. Tabelle B.1).

müssen die Proben gekühlt werden, damit es zu keiner Proteindenaturierung kommt.

Die Wahl des Puffers, in dem das Protein während des Zellaufschlusses vorliegt, kann die Löslichkeit des Zielproteins beeinflussen. Um das TrxA-TGF- β 3 nach dem Zellaufschluss mit Ultraschall weiterhin löslich vorliegen zu haben, wurden vier Puffer mit unterschiedlicher Zusammensetzung und verschiedenen pH-Werten getestet (siehe Tabelle B.1). Basis von drei der vier Puffer sind 50 mM TRIS-HCl, ein vierter Puffer wurde mit 50 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) hergestellt. Es wurden verschiedene Additive hinzugefügt: Natriumchlorid sollte die Ionenstärke des Puffers aufrechterhalten, die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) Oxidationsschäden verhindern und Glycerol diente zur Stabilisierung des Proteins. Die Zellpellets wurden in den Puffern gelöst und, wie in Abschnitt B.2.2 beschrieben, aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Es erfolgte eine densitometrische Bestimmung der Zielproteinanteile in den löslichen und unlöslichen Fraktionen (siehe Abschnitt B.5.3.1).

Im weiteren Verlauf der Versuche wurde festgestellt, dass bei der Durchführung

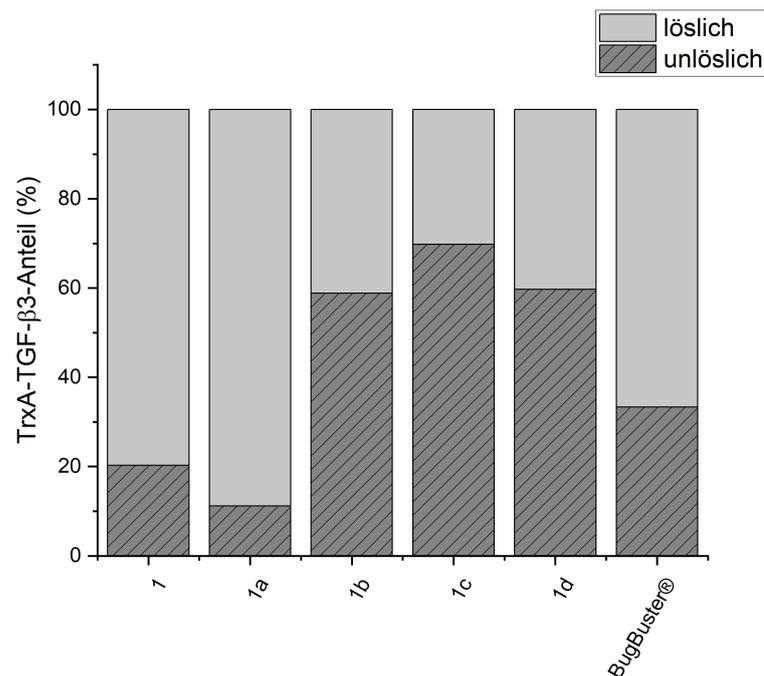


Abbildung 3.14: Vergleich des TrxA-TGF- β 3-Anteils in löslicher und unlöslicher Fraktion nach dem Aufschluss in dem Standard-Aufschlusspuffer mit verschiedenen Zusammensetzungen (siehe Tabelle B.2).

des oben beschriebenen Zellaufschlusses mit den verschiedenen Puffern ein systematischer Fehler auftrat. Es wurde ein Korrekturfaktor F_{korrr} ermittelt, der das Verhältnis zwischen den später durchgeführten und der ersten Bestimmung der löslichen Anteile des Zielproteins darstellt. Die Werte der löslichen Anteile wurden mit diesem Faktor multipliziert und die Werte der unlöslichen Anteile entsprechend angepasst. Eine detailliertere Beschreibung ist in Abschnitt C.2.1 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Es wird deutlich, dass Puffer 4 für den Zellaufschluss mit Ultraschall aufgrund fehlender Löslichkeit des Zielproteins nicht geeignet ist. Etwas besser schneidet bei diesem Vergleich Puffer 3 mit einem löslichen Zielproteinanteil von 41 % ab. Am besten wirkt sich die Nutzung der Puffer 1 und 2 auf die Löslichkeit des Zielproteins aus. Es liegen 70 bzw. 72,5 % des Zielproteins löslich vor. Im Vergleich dazu ist der Aufschluss mit BugBuster® weniger günstig. Es sind nur 55 % des TrxA-TGF- β 3s in der löslichen Fraktion zu finden.

Puffer 1 wurde für eine Optimierung ausgewählt und dessen Salzgehalt sowie pH-Wert variiert (siehe Tabelle B.2). Die Versuche wurden wie bereits beschrieben durchgeführt und die Ergebnisse ausgewertet. Aus Abbildung 3.14 geht hervor,

dass die Zugabe von Natriumchlorid zum Aufschlusspuffer (1c und 1d) keine erheblichen Verbesserungen der Löslichkeit im Vergleich zu BugBuster® (57 %) bringt. Mehr als 50 % des Zielproteins liegen in der unlöslichen Fraktion vor. Die beiden als 1 und 1a bezeichneten Varianten hingegen weisen 20 bzw. 11 % des TrxA-TGF- β 3 in der unlöslichen Fraktion auf. Der Unterschied der beiden Puffer ist der pH-Wert: Puffer 1 weist einen Wert von 7,5 auf, während Puffer 1a auf einen pH-Wert von 9 eingestellt wurde. Die Löslichkeit von TrxA-TGF- β 3 ist in dem Puffer mit höherem pH-Wert doppelt so hoch verglichen mit dem Puffer niedrigeren pH-Wertes. Diese Beobachtung konnte durch eine Wiederholung des Versuchs bestätigt werden (siehe Abbildung C.3). Der entscheidende Einfluss des pH-Werts ist auf den isoelektrischen Punkt (pI) des Zielproteins zurückzuführen. Der theoretische pI des TrxA-TGF- β 3 liegt bei 5,55 (ermittelt mit dem ExPaSy-Webtool ProtParam). Die Löslichkeit von Proteinen ist um ihren spezifischen isoelektrischen Punkt am geringsten und nimmt in beide Richtungen mit steigendem Abstand zu [73]. Mit der Zusammensetzung von Puffer 1 bzw. 1a wurde ein Aufschlusspuffer gefunden, mit dem nach dem Zellaufschluss mit Ultraschall eine hohe Konzentration des löslichen Zielproteins vorliegt, und der somit eine gute Alternative zu dem Proteinextraktionsreagent BugBuster® darstellt.

In Hinblick auf die Lagerung des Proteins nach dem Aufschluss wurde in einem weiteren Versuch untersucht, wie sich das Einfrieren der Proben auf die Löslichkeit des Zielproteins auswirkt. Dazu wurde die lösliche Fraktion von Puffer 1 aufgetaut, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das eventuell verbliebene, nicht lösliche Pellet wurde in Wasser suspendiert, die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend analysiert. Dabei wurde keine TrxA-TGF- β 3-Bande in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen. Der eingesetzte Puffer ist also auch für die Lagerung des Zielproteins bei -20 °C geeignet.

3.1.6.4 Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie

Das löslich produzierte Fusionsprotein TrxA-TGF- β 3 wurde nach dem Zellaufschluss in einem weiteren Schritt von den restlichen Proteinen abgetrennt. Dafür wurde der Hexa-Polyhistidin-Tag genutzt und eine Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) mit einer Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Matrix durchgeführt (siehe Abschnitt B.5.2.2). Die Histidin-Reste des Tags binden mit einer hohen Spezifität und Affinität an den freien Positionen der Nickel-Ionen

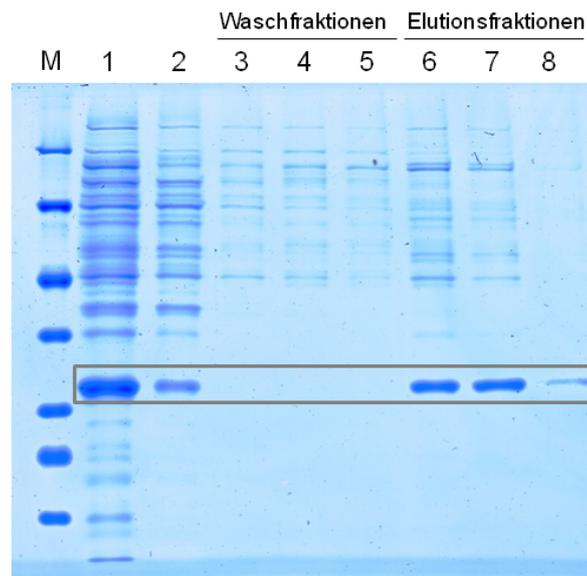


Abbildung 3.15: Gel einer SDS-PAGE von Proben nach einer Affinitätschromatographie. Aufgetragen sind ein Größenstandard (M), die auf die Säule gegebene Probe (1), der Durchfluss (2), die Waschfraktionen (3-5) und die Elutionsfraktionen (6-8), Coomassie-Färbung.

und bilden einen Chelatkomplex aus. Die Ablösung der gebundenen Proteine erfolgt durch das Spülen mit einem Imidazol-haltigen Puffer. Das Imidazol führt aufgrund höherer Affinität zu den Histidin-Resten zu einer Verdrängung des aufgereinigten Proteins.

Auf den Gelen der SDS-PAGE sind auf der Höhe des Zielproteins Banden in den Elutionsfraktionen sichtbar (siehe Abbildung 3.15). Die Aufreinigung mittels IMAC ist also möglich. Zusätzlich sind auf den Gelen auch noch weitere, größere Banden zu erkennen. Außerdem ist auch im Durchfluss ein Anteil von 25 bis 50 % des gesamten wiedergefundenen Zielproteinanteils nachweisbar. Ein Erklärungsansatz hierfür ist die Überladung der Säule. In einem weiteren Versuch zur Überprüfung dieser These wurde der Durchfluss eines Chromatographie-Durchlaufes, und damit weniger Zielprotein als zuvor, auf eine neue Säule aufgetragen. Sollte es sich um eine Überladung handeln, so müsste weniger Zielprotein im Durchfluss auffindbar sein als im ersten Durchlauf. Wie Tabelle 3.3 zu entnehmen ist, ist dies aber nicht der Fall: Der erneute Auftrag der nicht an der Säule gebundenen Fraktion führt zu einem ähnlichen Prozentsatz nicht gebundenen Zielproteins. Eine Überladung der Säule ist damit auszuschließen.

Eine andere Erklärung für die nicht komplette Bindung des Zielproteins an die

Tabelle 3.3: Vergleich des wiedergefundenen TrxA-TGF- β 3-Anteils bei einem Säulendurchlauf (A1) mit dem erneuten Auftragen des dabei aufgefangenen Durchflusses (A2).

Fraktion	TrxA-TGF- β 3-Anteil (%)	
	A1	A2
Durchfluss	25	31
Waschfraktion	I	0
	II	0
	III	0
Elutionsfraktion	I	34
	II	34
	III	7

Säule kann die Zusammensetzung des Equilibrierungspuffer sein [74]. Eine Optimierung für das Zielprotein sollte in weiteren, an dieser Stelle anknüpfenden Arbeiten umgesetzt werden. Dabei kann auch berücksichtigt werden, dass eine höhere Salzkonzentration als die vom Säulen-Hersteller empfohlenen 0,5 M NaCl (bis zu 1 M) schwachen elektrostatischen Interaktionen von anderen Proteinen mit dem Zielprotein vorbeugen könnte. Durch die Zugabe von Imidazol (bis zu 20 mM), den nichtionischen Detergenzen Triton X-100 und Tween 20 (bis zu 1 %) oder Ethanol (bis zu 20 %) kann außerdem die schwache Bindung anderer Proteine an die Säule verhindern werden [75]. Damit könnte die Menge nicht-spezifisch gebundener Proteine in den Elutionsfraktionen (siehe Abbildung 3.15) reduziert werden.

3.1.6.5 Weitere Aufreinigungsschritte

In einem nächsten Schritt sollte die Proteinkonzentration bestimmt werden. Die Imidazol-Konzentration des Elutionspuffers kann dabei die Messungen mit den Methoden der Wahl (Spektralphotometer NanoDrop[®] und Bradford-Assay) beeinflussen. Dieser Einflussfaktor sollte eliminiert werden. Dafür wurden die Proteinproben aus den drei Elutionsschritten der Affinitätschromatographie vereint und damit zwei Herangehensweisen getestet: Die Durchführung einer Dialyse

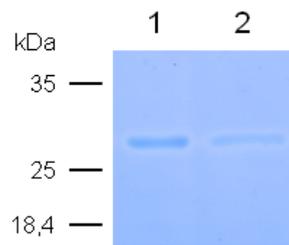


Abbildung 3.16: Gel der SDS-PAGE mit Dialyse-Proben. Aufgetragen sind jeweils eine Probe vor dem Dialyse-Start (1) sowie nach der Beendigung der Dialyse (2); Coomassie-Färbung.

(*cutoff* von 3 kDa, siehe Abschnitt B.5.2.3) sowie der Einsatz einer Ultrafiltrationseinheit (siehe Abschnitt B.5.2.4). Ultrafiltrationseinheiten erlauben eine Umpufferung durch das Abtrennen von im Vergleich zum Zielprotein sehr kleinen Molekülen. Außerdem ist eine Aufkonzentrierung der Probe möglich. Durch die Nutzung eines kleinen *cutoffs* von 10 kDa wurde überprüft, ob eine Umpufferung in einen Puffer ohne Imidazol erreicht werden kann.

Abbildung 3.16 zeigt die Proben, die vor und nach der Dialyse elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Im Vergleich zu der Probe, die zu Beginn der Dialyse genommen wurde, enthält die Endprobe nur noch etwa 30 % des löslichen Zielproteins. In der Literatur finden sich Hinweise dazu, dass die Kombination aus einem Hexa-Polyhistidin-markierten Protein und dem in dem Elutionspuffer enthaltenen Imidazol zu einer Stabilisierung des Proteins führen kann [76]. Dies könnte die verringerte nachgewiesene Menge erklären.

Ein ähnliches Ergebnis wurde durch den Einsatz einer Ultrafiltrationseinheit mit einem *cutoff* von 10 kDa erreicht. Mit jedem durchgeführten Zentrifugationsschritt verringerte sich die Proteinkonzentration im Rückstand. Gleichzeitig ist kein Zielprotein im Filtrat elektrophoretisch nachweisbar. Neben der bereits erwähnten Stabilisierung durch Imidazol kann in diesem Fall eine weitere Erklärung sein, dass sich ein Teil der (ausgefallenen) Proteine in den Poren verfängt und sich auch durch mehrfaches Spülen mit frischem Puffer nicht lösen lässt. Weitere Untersuchungen in diese Richtung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten kann eine schrittweise Reduktion von Imidazol sein, um dem Ausfall bei Dialyse und Ultrafiltration vorzubeugen.

3.1.7 Fazit

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Zielprotein TGF- β 3 in *E. coli* produziert. Dafür wurde zunächst eine Gensequenz auf Basis des humanen Zielproteins konstruiert, die für das Monomer codiert. Nach der erfolgreichen Transformation des *E. coli*-Stamms BL21(DE3) und dem elektrophoretischen Produktionsnachweis des monomeren Zielproteins wurden die Kultivierungsbedingungen mittels statistischer Versuchsplanung optimiert. Die dabei höchste erreichte TGF- β 3-Konzentration lag bei 5,8 mg/L Kultur. Es wurden eine Kultivierungstemperatur von 32 °C, eine Animpf-OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,6 sowie eine IPTG-Endkonzentration von 0,5 mM zur Induktion der Proteinexpression festgelegt und für die folgenden Versuche umgesetzt. Mit diesen Parametern kann eine Zielproteinkonzentration von mehr als 5 mg/L Kultur erwartet werden.

Im Folgenden wurde eine Solubilisierungsmethode der produzierten *Inclusion Bodies* gesucht und dafür zwei Methoden getestet. Der Einsatz des chaotropen Reagens Harnstoff führte nicht zu einer Solubilisierung. Mithilfe eines Essigsäurehaltigen Puffers konnten 67 % des Zielproteins in Lösung gebracht werden.

Das oben beschriebene Plasmid wurde in den für die Disulfidbrückenbildung optimierten Expressionsstamms *E. coli* SHuffle® eingebracht, um das Zielprotein als Dimer zu produzieren. Es wurde ein Dimer-Anteil von 28,3 % bei einer Kultivierungstemperatur von 30 °C erreicht, wobei die gesamte Zielproteinmenge unlöslich vorlag. Ein Großteil des Zielproteins wurde weiterhin als Monomer exprimiert und hätte nach der Aufreinigung bei der korrekten Faltung unterstützt werden müssen. Daher wurde dieser Ansatz verworfen und nach einer anderen Strategie gesucht, um die Löslichkeit des Zielproteins zu erhöhen.

Durch die Anpassung der Gensequenz wurde das Protein Thioredoxin A N-terminal an den Polyhistidin-Tag des TGF- β 3 fusioniert. Es konnte gezeigt werden, dass das monomere Zielprotein durch diese Modifikation bei einer Kultivierungstemperatur von 20 °C zu etwa 60 % in der löslichen Fraktion vorliegt. Anschließend wurde als Alternative zum chemischen Zellaufschluss mit dem Proteinextraktionsreagent BugBuster® der mechanische Zellaufschluss per Ultraschall mit verschiedenen Puffern getestet. Der von diesen am besten geeignete Puffer ist ein 50 mM Tris-HCl-Puffer mit 1 mM DTT, ohne den Zusatz von Natriumchlorid und mit einem pH-Wert von 9. Er führte zu einer Löslichkeit von

mindestens 90 % des Zielprotein. Im Folgenden eine Aufreinigung des konstruierten Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie mit einer NiNTA-Säule erreicht werden. Hierbei fiel auf, dass ein beträchtlicher Anteil des Zielproteins (30-50 %) im Durchfluss wiedergefunden wurde. Eine Überladung der Säule wurde ausgeschlossen. Eine Erklärungsmöglichkeit kann der für das Zielprotein TrxA-TGF- β 3 nicht optimale Equilibrierungspuffer sein.

Im letzten Abschnitt dieses Kapitels wurden Methoden zur Imidazol-Abtrennung aufgezeigt und getestet. Das im Elutionspuffer des Chromatographie-Puffers enthaltene Imidazol stört bei nachfolgenden Bestimmungen der Zielproteinkonzentration und sollte daher entfernt werden. Die Methoden Dialyse und Ultrafiltration führten allerdings nicht zu dem gewünschten Ergebnis, sondern begünstigten die Aggregation des Zielproteins.

3.2 Arbeiten in CHO-Zellen

In diesem Kapitel wird die Produktion des rekombinanten Zielproteins TGF- β 3 in den Säugetierzellen CHO getestet. Die verwendeten CHO-Zellen stammen aus der CHO-K1-Zelllinie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Noll (Universität Bielefeld) und sind an die serumsfreie Suspensionskultivierung adaptiert. Die Nutzung nicht-adhärenter Zellen hat den Vorteil, dass das Zellwachstum nicht durch die Oberfläche des Kultivierungsgefäß limitiert wird, sondern durch die Zellkonzentration im Medium. Dies ermöglicht eine einfache Maßstabsvergrößerung der Produktion des Zielproteins.

Mit stabil transfizierten CHO-Zelllinien konnten in einem Fed-Batch-Prozess bereits TGF- β 3-Konzentrationen von über 130 mg/L Kultur erreicht werden [77]. In dieser Arbeit erfolgte das Einbringen der Zielproteinsequenz über eine Polyethylenimin (PEI)-vermittelte transiente Transfektion (siehe Abschnitte 2.2.2.2 und B.3.2). Um die Methode genauer analysieren und charakterisieren zu können, wurden Vorversuche mit einem für das *Green Fluorescent Protein* (GFP) codierenden Plasmid gemacht. GFP kann aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaft mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden und besitzt mit 26,9 kDa eine ähnliche Größe wie das bioaktive Zielprotein TGF- β 3 (25 kDa). Im Anschluss

wurden auf Grundlage der Ergebnisse die Experimente mit den dafür konstruierten TGF- β 3-Plasmiden durchgeführt.

3.2.1 Transiente Transfektion mit GFP-Plasmiden

Die transienten Transfektionen von CHO-Zellen wurden mit PEI erreicht. Dabei wurden zwei Durchführungsvarianten aus früheren, am Institut für Technische Chemie durchgeführten Arbeiten miteinander verglichen [13, 78]. Die Varianten unterscheiden sich in der Zugabereihenfolge von PEI und Plasmid-DNA: Das so genannte einschrittige Protokoll (siehe Abschnitt B.3.2.1) sieht die aufeinanderfolgende Zugabe von DNA und PEI zur Zellsuspension vor, während im zweischrittigen Protokoll (siehe Abschnitt B.3.2.2) erst DNA und Polykation zusammen inkubiert und anschließend zu den Zellen gegeben werden (siehe Abbildung 3.17).

Für letztere Methode wurden DNA- und PEI-Lösung vermischt und nach Inkubationszeit von 5 bis 10 min in die Zellsuspension gegeben. Dieser Inkubationsschritt soll die Ausbildung von DNA-PEI-Komplexen ohne Störung von außen, wie beispielsweise durch die negativ geladenen Zellen, fördern. Bei der einschrittigen Variante wurde auf die Inkubation von Plasmid-DNA und PEI verzichtet. Stattdessen wurde die DNA direkt zu den Zellen gegeben. Anschließend wurde das PEI vorsichtig und tröpfchenweise oberhalb des Flüssigkeitsspiegels an die Wand des Reaktionsgefäßes pipettiert, sodass die Tropfen über Adhäsionskräfte an der Gefäßwand haften blieben. Dann erfolgte durch leichtes Schwenken die Vermischung mit der Zell-DNA-Suspension. Mit dieser Methode wird der Kontakt mit einer sehr hohen PEI-Konzentration, der die Zellen kurzzeitig ausgesetzt sind, möglichst gering gehalten. Alternativ kann das PEI tröpfchenweise unter Schwenken zur Zellsuspension gegeben werden. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen bei beiden Transfektionsvarianten auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/mL mit frischem Medium verdünnt.

In einem ersten Versuch wurden die beiden beschriebenen Methoden zunächst miteinander verglichen. Eingesetzt wurde das Plasmid pAcGFP1-N1, welches für GFP codiert. Zugleich wurden bei diesem Versuch auch Verhältnisse von 1:3 und 1:5 DNA zu PEI getestet. Das Verhältnis beeinflusst die Größe und Ladung der Komplexe. Große Komplexe können weniger gut von den Zellen aufgenommen

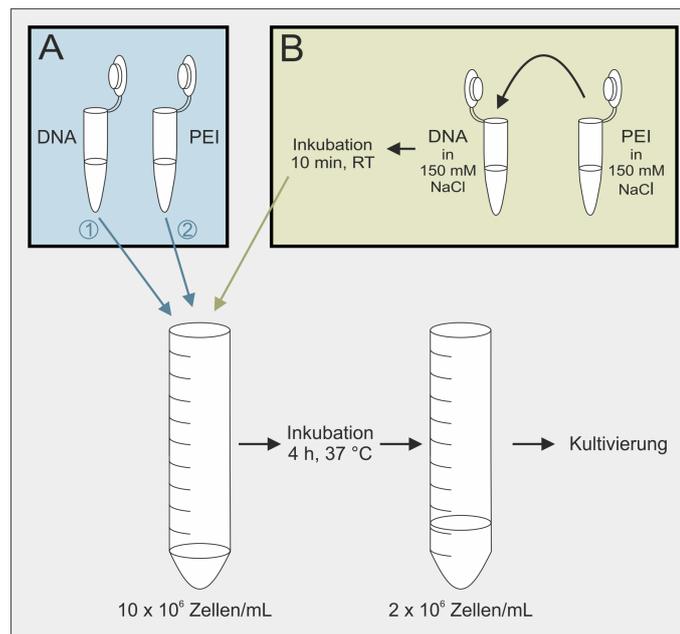


Abbildung 3.17: Schematischer Ablauf der transienten Transfektion mit den zwei unterschiedlichen Protokollen. A: Einschrittige Methode. DNA und PEI werden nacheinander (① und ②) zu der Zellsuspension gegeben. B: Zweistrittige Methode. Das PEI in 150 mM NaCl wird zur DNA, ebenfalls in 150 mM NaCl, gegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann in die Zelllösung pipettiert. Anschließend findet bei beiden Methoden eine Inkubation über 4 Stunden bei 37°C statt, es erfolgt eine Verdünnung der Zellen und die weitere Kultivierung bis 48 Stunden nach der Transfektion.

werden. Sie verlieren schnell ihre Struktur, wenn sie nicht ausreichend stabil sind, um dem niedrigen pH-Wert und den lysosomalen Enzymen in der Zelle standhalten zu können [44]. Damit wird die Transfektionseffizienz negativ beeinflusst. Die transfizierten Zellen wurden insgesamt 48 Stunden in den Bioreaktor-Gefäßen kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, Zellzahl und Viabilität bestimmt sowie Analysen der Proteinexpression durchgeführt.

3.2.1.1 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellviabilität ist ein wichtiger Anhaltspunkt bei der Kultivierung von Säugerzellen. Sie stellt den Anteil lebender Zellen in einer Zellpopulation dar und kann mit unterschiedlichen Methoden bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde dafür der automatische Zellzähler CEDEX genutzt (siehe Abschnitt B.3.1.2).

Der Vergleich der zwei oben beschriebenen Transfektionsmethoden zeigt in Bezug auf die Zellviabilitäten Unterschiede auf (siehe Abbildung 3.18). Es lässt sich gene-

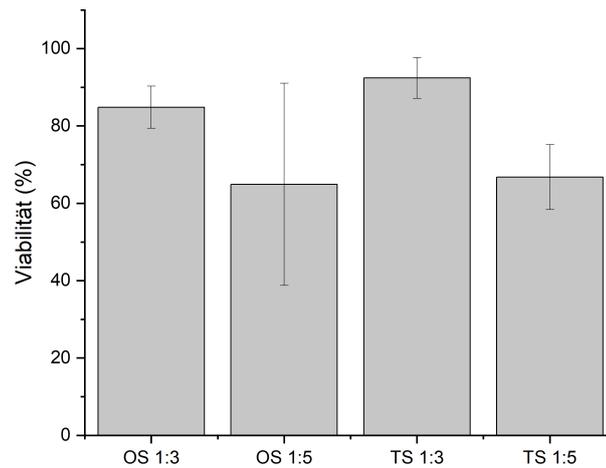


Abbildung 3.18: Durchschnittliche Zellviabilitäten von CHO-Zellen nach der Transfektion mit dem GFP-Plasmid pAcGFP1-N1. Dargestellt sind die Ergebnisse der ein- (OS) sowie zweischrittigen (TS) Transfektionsmethoden mit jeweils zwei verschiedenen DNA-PEI-Verhältnissen (1:3 und 1:5) von drei Kultivierungsansätzen nach 46 bis 48 Stunden Kultivierungszeit.

rell feststellen, dass die zweischrittige Transfektion die Zellviabilität weniger stark beeinflusst als die einschrittige Methode. Im Durchschnitt liegt diese um 7,6 (1:3) bzw. 1,9 Prozentpunkte (1:5) höher als die entsprechenden Ansätze, die mit der einschrittigen Methode durchgeführt wurden. Auch der Vergleich zwischen den beiden eingesetzten DNA-PEI-Verhältnissen zeigt Unterschiede auf. Eine niedrigere Konzentration von PEI beeinträchtigt bei beiden Transfektionsmethoden die Viabilität der Zellen weniger als eine hohe. Die einschrittig transfizierten Kulturen mit dem DNA-PEI-Verhältnis von 1:3 haben eine Viabilität von durchschnittlich 84,8 % und damit 19,9 % mehr lebende Zellen als mit einem Verhältnis von 1:5. Bei den zweischrittig transfizierten Kulturen liegt der Unterschied sogar bei 25,6 %.

Im Hinblick auf die Zellviabilität wirkt sich also ein kleineres Verhältnis von DNA zu PEI sowie die Nutzung der zweischrittigen Transfektionsmethode positiver auf die Zellen aus.

3.2.1.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Entscheidend hinsichtlich der Produktion eines rekombinanten Proteins ist die Transfektionseffizienz (TFE). Diese gibt an wie viele der lebenden Zellen das Zielprotein bilden. Mit dem GFP-Plasmid lässt sich die Transfektionseffizienz durchflusszytometrisch bestimmen (siehe Abschnitt B.3.3.1). Dabei wird die optische

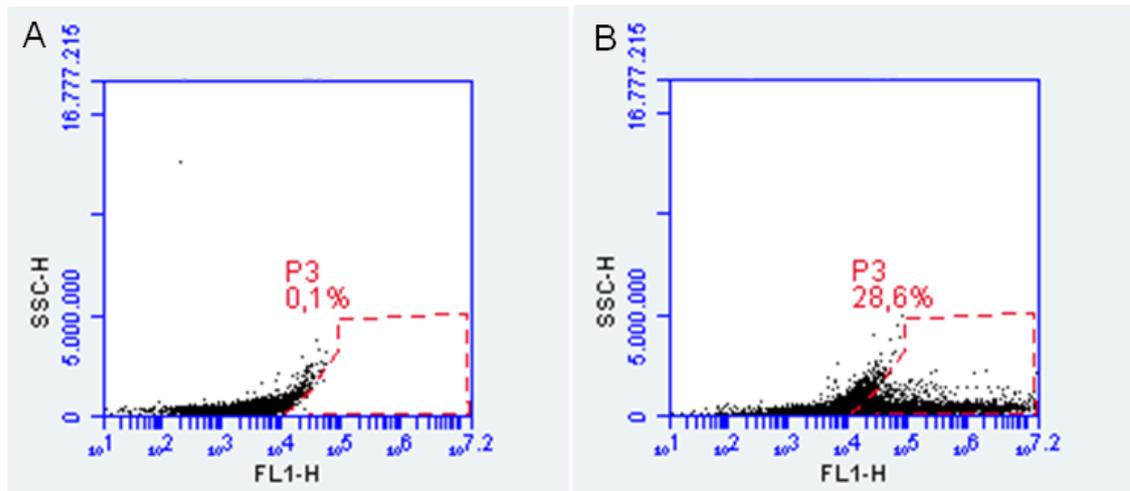


Abbildung 3.19: Histogramme mit durchflusszytometrischen Daten einer nicht transfizierten (A) und einer mit dem GFP-Plasmid pAcGFP1-N1 transfizierten CHO-Zellprobe (B). Aufgetragen ist die relative Fluoreszenz-Intensität des GFPs (FL1-H) gegen das detektierte Seitenstreulicht der einzelnen Zellen (SSC-H). Der rot umrandete Bereich P3 gibt den prozentualen Anteil der GFP-produzierenden, lebenden Zellen wieder und stellt damit die Transfektionseffizienz dar. Histogramme aus der Software des Durchflusszytometers BD Accuri™ C6 Plus.

Anregbarkeit des GFP genutzt. Bei einer Wellenlänge von 475 nm wird das Protein angeregt und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 505 nm. Die Emission wird von dem Durchflusszytometer detektiert. In einem Histogramm können die entsprechenden lebenden und GFP-produzierenden Zellen dargestellt werden (siehe Abbildung 3.19). Dafür ist der Vergleich mit einer nicht-transfizierten Probe notwendig, da die Zellen eine gewisse Eigenfluoreszenz haben. Es wird zunächst ein Bereich definiert, in dem keine nicht-transfizierten Zellen detektiert werden können. Dieses *gate* wird dann in dem Histogramm einer mit dem GFP-Plasmid transfizierten Probe angewendet und damit die Änderungen durch die GFP-Fluoreszenz sichtbar gemacht. Der Unterschied wird in dieser Arbeit als Transfektionseffizienz definiert.

Die durchflusszytometrische Auswertung des Vergleichs zwischen den beiden oben beschriebenen Transfektionsmethoden in Abbildung 3.20 weist Unterschiede auf. In allen Fällen, unabhängig davon, welche Transfektionsmethode durchgeführt wurde oder in welchem Verhältnis DNA und PEI eingesetzt wurden, ist über die Kultivierungsdauer ein Anstieg der GFP-produzierenden Zellen zu erkennen. Dies lässt sich durch den zeitlichen Ablauf der Proteinbildung erklären. Nach der erfolgreichen Aufnahme des Plasmids in die Zelle und anschließend

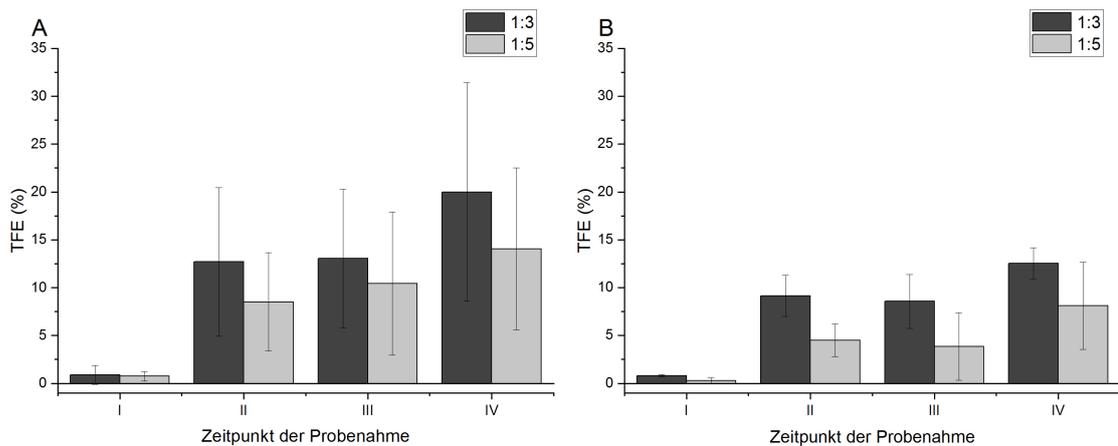


Abbildung 3.20: Durchschnittliche Transfektionseffizienz dreier Kultivierungsansätze zu verschiedenen Zeitpunkten während der Kultivierung nach der Transfektion mit dem GFP-Plasmid pAcGFP1-N1. Dargestellt sind die Transfektionseffizienzen (TFE) der einschrittigen (A) und der zweiseitigen Methode (B), durchgeführt mit DNA-PEI-Verhältnissen von 1:3 und 1:5. Die Proben wurden nach der Verdünnung mit frischem Medium nach vier Stunden (I), im Zeitraum zwischen 21 und 22 Stunden (II), nach 28 Stunden (III) und nach 46 bis 48 Stunden (IV) nach der Transfektion genommen.

in den Zellkern, folgt die Transkription und Translation. GFP durchläuft einen Reifungsprozess, der aus Faltung, Zyklisierung, Oxidation und Dehydrierung besteht [79]. All diese Prozesse führen dazu, dass die erfolgreiche Transfektion nur zeitlich versetzt auf die hier beschriebene Weise dargestellt werden kann.

Der Vergleich der beiden eingesetzten DNA-PEI-Verhältnisse bei der einschrittigen Transfektionsmethode (Abbildung 3.20A) zeigt den Trend, dass das Verhältnis von 1:3 zu einer höheren Transfektionseffizienz führt. Der Unterschied zu der mit einem größeren Verhältnis durchgeführten Kultivierung beträgt durchschnittlich 5,97%. Auch bei Anwendung des zweiseitigen Protokolls ergibt sich dieser Trend (Abbildung 3.20B). Die Endproben weisen hier einen durchschnittlichen Unterschied voneinander von 4,43% auf. Generell lässt sich feststellen, dass die Transfektionseffizienzen im Vergleich zu den später durchgeführten Transfektionen niedrig ist (siehe Abbildung 3.21). Die zum Ende der Kultivierung ermittelte durchschnittliche Transfektionseffizienz bei Durchführung der einschrittigen Methode liegt bei 20%. Bei der zweiseitigen Methode kann ein Wert von lediglich 12,53% festgestellt werden. Es ergibt sich also ein zu der Zellviabilität gegenläufiger Trend: Eine höhere Transfektionseffizienz korreliert mit einer niedrigeren Zellviabilität.

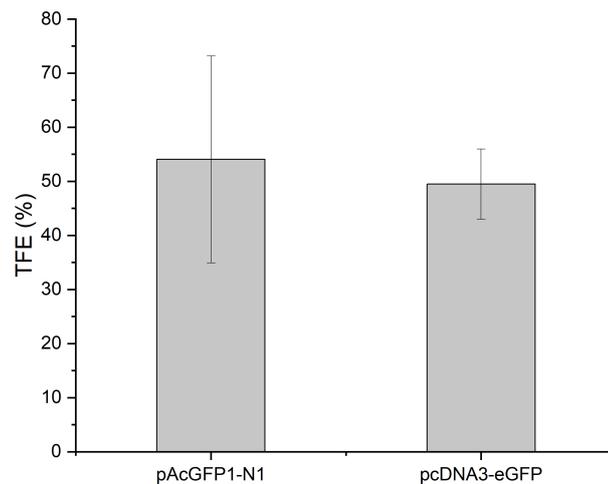


Abbildung 3.21: Transfektionseffizienzen (TFE) nach Transfektionsversuchen mit den Plasmiden pAcGFP1-N1 und pcDNA3-eGFP. n=6 bei pAcGFP1-N1, n=3 bei pcDNA3-eGFP.

Da eine höhere Transfektionseffizienz mit einer hohen Proteinproduktion zusammenhängt, wurde für alle nachfolgenden Versuche das einschrittige Protokoll gewählt. Im Laufe der Zeit wurde das Protokoll noch angepasst. So wurde beispielsweise eine zehnminütige Inkubationszeit der DNA mit den Zellen im ersten Teilschritt eingeführt.

3.2.1.3 GFP-Plasmid mit pcDNA3.1(+)-Rückgrat

In den später beschriebenen Versuchen zur Produktion von TGF- β 3 wurde ein Plasmid auf Basis des pcDNA3.1(+)-Vektors genutzt. Daher wurde zunächst untersucht, ob die CHO-Zelllinie in der Lage ist, den Vektor während einer Transfektion aufzunehmen und zu exprimieren. Hierfür wurde das Plasmid pcDNA3-eGFP genutzt, welches von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andrea Hoffmann (NIFE, Hannover, DE) zur Verfügung gestellt wurde und für das Protein *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) codiert. Das Plasmid hat eine Größe von etwa 6160 bp und ist damit im Vergleich zum Plasmid pAcGFP1-N1 um 30 % größer. Beide Plasmide wurden in Transfektionen eingesetzt und die Zellen anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

Abbildung 3.21 ist zu entnehmen, dass mit dem Plasmid pAcGFP-N1 durchschnittliche Transfektionseffizienzen von 54 % erreicht werden konnten. Das Plasmid pcDNA3-eGFP lässt den Nachweis von GFP bei 50 % der lebenden Zellen

zu. Es besteht zwischen den GFP-Plasmiden also kaum ein Unterschied hinsichtlich der Transfektionseffizienz. Auffällig ist hier wieder die breite Streuung der erzielten Ergebnisse. Die wiederholte Durchführung des Transfektionsprozesses durch den Experimentator und die damit steigende Erfahrung kann ein Erklärungsansatz dafür darstellen. Hierdurch wird deutlich, wie sensitiv der Prozess ist.

Die Ergebnisse zeigen, dass die CHO-Zellen das Plasmid mit dem pcDNA3.1(+)-Vektor-Rückgrat aufnehmen und das Zielprotein GFP exprimieren. Die Nutzung mit einer anderen Gensequenz sollte also möglich sein.

3.2.1.4 Immunodetektion des rekombinanten Proteins

Durch die vorangegangenen durchflusszytometrischen Analysen wurde angenommen, dass die Zellen GFP produzieren. Da das in CHO-Zellen exprimierte TGF- β 3 kann aufgrund fehlender Fluoreszenz nicht durchflusszytometrisch detektiert werden kann, muss eine andere Nachweismethode wie beispielsweise mittels Western Blot eingesetzt werden. Diese Methode wurde zunächst mit den mit dem GFP-Plasmid transfizierten Zellen durchgeführt (siehe Abschnitt B.5.1.4). Dazu wurden CHO-Zellproben 48 Stunden nach Durchführung der Transfektion lysiert. Um den Einfluss von Proteasen auf den Protein-Nachweis zu untersuchen, wurden einem Teil der Proben ein Protease-Inhibitor zugesetzt. Proteasen, die durch den Zellaufschluss mit den (Ziel-)Proteinen in Kontakt kommen, können diese abbauen und dadurch das Ergebnis verfälschen. Die lösliche Fraktion der aufgeschlossenen Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot mit Immunofärbung analysiert (siehe Abbildung 3.22). Jeweils eine Probe wurde als Positivkontrolle zusätzlich mit GFP versetzt wurde.

Der Western Blot zeigt Banden in den lysierten Proben auf der erwarteten Höhe von etwa 25 kDa. Dabei kann kein Einfluss durch die Behandlung mit Protease-Inhibitor festgestellt werden. Das in den Positivkontrollen eingesetzte GFP ist ein wenig größer als das von den CHO-Zellen produzierte Protein, zeigt aber zusätzlich, dass das Protein mit dieser Methode nachweisbar ist.

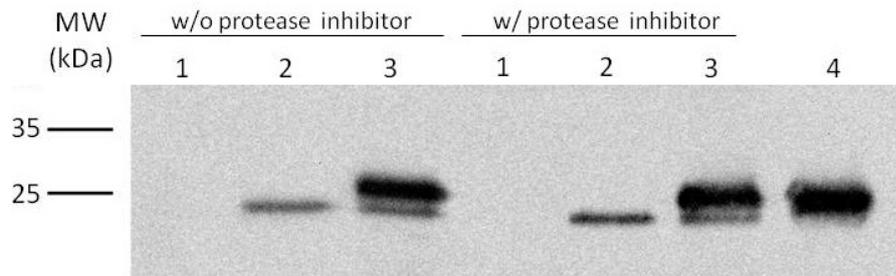


Abbildung 3.22: Western Blot auf Nitrocellulose-Membran. 1: Negativ-Kontrolle: Zelllysat nicht-transfizierte CHO-Zellen; 2: Zelllysat; 3: Zelllysat mit GFP-Standard versetzt; 4: GFP-Standard. links: ohne Protease-Inhibitor lysiert; rechts: mit Protease-Inhibitor lysiert.

3.2.2 Transiente Transfektion mit TGF- β 3-Plasmiden

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die transiente Transfektion eines GFP-produzierenden Plasmids in CHO-Zellen mit der einschrittigen Methode möglich ist. Um nun die Produktion des Zielproteins TGF- β 3 zu erreichen, wurden verschiedene Plasmide konstruiert und in Transfektionsversuchen eingesetzt.

3.2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten

Für die Arbeiten in den CHO-Zellen wurden insgesamt drei Plasmide mit zwei Sequenzvarianten konstruiert (siehe Tabelle A.9). Wie bereits bei den vorangegangenen *E. coli*-Versuchen basiert das TGF- β 3-Gen auf der NCBI-Sequenz NP_001316868.1 und wurde durch reverse Translation unter Berücksichtigung der humanen Codonverwendung für die CHO-Zellen angepasst. Die erste Variante stellt das mature Protein dar. Das zweite Konstrukt codiert zusätzlich für das Preprotein LAP. Hierdurch sollte die Produktion eines dimeren, bioaktiven TGF- β 3 erleichtert werden. Um dabei die korrekte Faltung des Proteins zu unterstützen, wurde an der 27. Stelle der Proteinsequenz das Cystein durch ein Serin ersetzt [1, 80]. Dadurch sollte die Wahrscheinlichkeit einer falschen Disulfidbrückenbildung zwischen dem LAP und einem Cystein des murenen Proteins verringert werden. Die Sequenzen wurden in die zwei Vektorsysteme pCSG-IBA102 und pcDNA3.1(+) eingebracht (siehe Tabelle A.9).

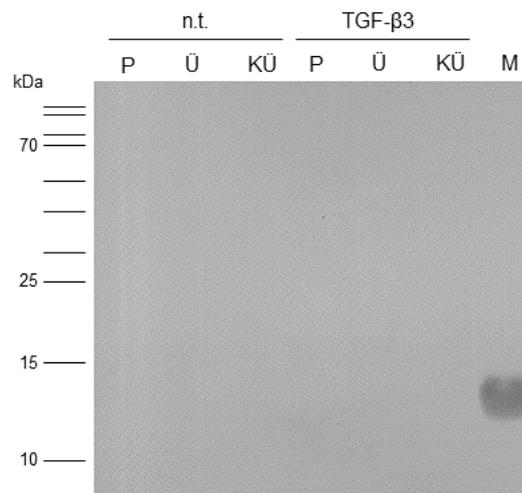


Abbildung 3.23: Western Blot auf PVDF-Membran mit Proben aus einer mit dem Plasmid pCSG-IBA102-LAP-TGF β 3 transfizierten Kultur. n.t.: nicht transfizierte Proben; P: Pellet, nicht lösliche Proteine; Ü: Überstand, lösliche Proteine; KÜ: Kulturüberstand; M: Positivkontrolle TGF- β 3 (hergestellt in *E. coli*).

3.2.2.2 Analyse

Zur Produktion von TGF- β 3 in CHO-Zellen wurden Transfektionen mit den verschiedenen Plasmiden wie oben beschrieben durchgeführt. Neben einer nicht-transfizierten Kultur wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz außerdem immer mindestens eine Kultur mit dem GFP-Plasmid transfiziert. Die Kultivierungen wurden nach 48 Stunden beendet und analysiert. Um die Produktion des Zielproteins nachweisen zu können, wurden Proben der Kultivierungen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot immunodetektiert.

Abbildung 3.23 zeigt einen beispielhaften Western Blot mit Proteinproben aus einer der durchgeführten Transfektionen mit dem Plasmid pCSG-IBA102-LAP-TGF β 3. Es ist lediglich der TGF- β 3-Standard als Bande zu sehen. In den restlichen Proben konnte kein TGF- β 3 nachgewiesen werden, weder in den Zellen noch im Kulturüberstand. Bei Transfektionen mit den anderen beiden Plasmiden wurde das gleiche Ergebnis erzielt.

Als TGF- β 3-Standard wurde das in dieser Arbeit in *E. coli* produzierte Protein eingesetzt. Daher wurde zunächst überprüft, ob der beim Western Blot zur Detektion eingesetzte Antikörper das in den CHO-Zellen produzierte Protein überhaupt binden kann oder ob es durch mögliche posttranslationale Modifikationen. Dafür

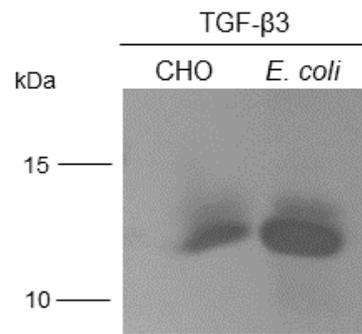


Abbildung 3.24: Western Blot auf PVDF-Membran mit rekombinantem TGF- β 3 aus CHO-Zellen und *E. coli* zur Überprüfung der Antikörper-Bindung.

wurden TGF- β 3-Proben, hergestellt in *E. coli* und CHO-Zellen, elektrophoretisch aufgetrennt und per Western Blot analysiert (siehe Abbildung 3.24). In den Spuren beider Proben ist jeweils eine Bande auf der erwarteten Höhe von 12,5 kDa sichtbar. Damit konnte gezeigt werden, dass die Methode prinzipiell funktioniert, der zur Detektion eingesetzte Antikörper intakt ist und auch in CHO-Zellen produziertes TGF- β 3 binden kann. Die genutzte Methode erklärt somit nicht den fehlenden Nachweis des Zielproteins nach vorangegangenen Transfektionen.

Im Anschluss wurden die eingesetzten Plasmide mit dem pCSG-IBA102-Rückgrat sequenziert. Hierbei wurde entdeckt, dass ein Fehler bei der Klonierung in das Plasmid (siehe Abschnitt B.1.2.2) aufgetreten ist und die Inserts nicht an der richtigen Stelle im Vektor nachgewiesen werden konnten. Dieser Befund ist allerdings keine Erklärung für die nicht detektierbare Expression nach der Transfektion mit dem Plasmid pcDNA3.1-TGF- β 3, dessen Sequenzierung keine Fehler aufwies.

3.2.3 Plasmidmarkierung mit dem Farbstoff Cy5

Da in den vorangegangenen Versuchen keine TGF- β 3-Expression nachgewiesen werden konnte, wurde im nächsten Schritt das Verhalten des Plasmids pcDNA3.1-TGF- β 3 und die Aufnahme in die Zellen während der transienten Transfektion überprüft. Dafür wurde eine Markierung des Plasmids mit dem Farbstoff Cy5 vorgenommen (siehe Abschnitt B.1.3) [81]. Zum Vergleich wurden Transfektionen mit dem für GFP codierenden Plasmid pAcGFP1-N1 durchgeführt, dessen Aufnahme in die Zellen, wie bereits in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben, über die Expression des Proteins leicht nachzuweisen ist.

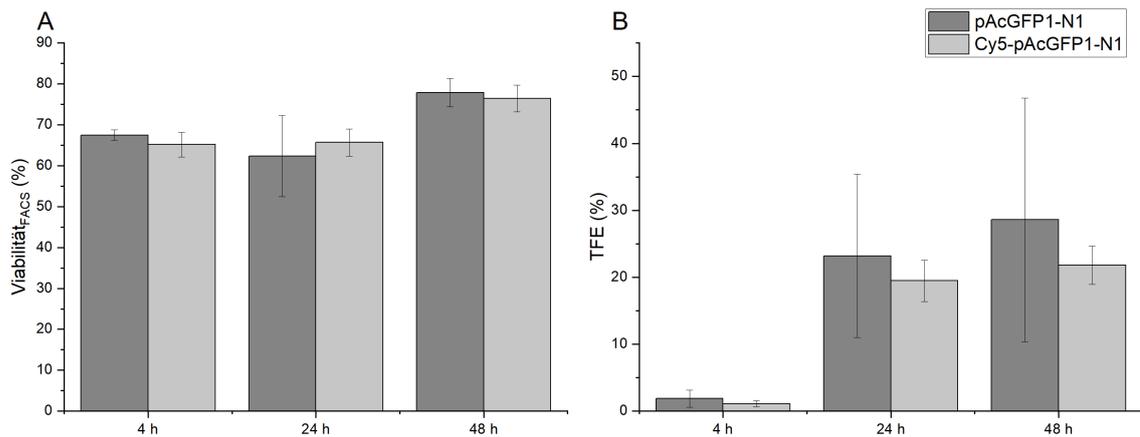


Abbildung 3.25: Vergleich der Viabilität_{FACS} (A) und Transfektionseffizienz (B) von transfizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion mit dem pAcGFP1-N1-Plasmid bzw. einer Cy5-markierten Variante, vermessen im FACS (n = 3).

Die beiden Plasmide wurden mithilfe eines Labeling-Kits mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Cy5 markiert (siehe Abschnitt B.1.3). Bei den transienten Transfektionen mit den Cy5-markierten Plasmiden wurde immer das gleiche Verhältnis von DNA und Zellen eingesetzt. Die Kulturen wurden zu drei Zeitpunkten (4, 24 und 44 Stunden nach der Transfektion) durchflusszytometrisch vermessen. Dabei konnte gleichzeitig die GFP-Expression überprüft und die Cy5-gelabelten Plasmide nachgewiesen werden. Die Analyse und Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt B.3.3.1) und Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abschnitt B.3.4).

3.2.3.1 Einfluss der Cy5-Markierung auf die Transfektion

Im Folgenden wird zunächst das Cy5-markierte GFP-Plasmid betrachtet. Um den Einfluss des Nukleinsäure-Labelings auf die Aufnahme und das Expressionsniveau zu überprüfen, wurde bei jeder durchgeführten Transfektion auch eine mit dem unmarkierten GFP-Plasmid transfizierte Kultur mitgeführt. Die Proben wurden unmittelbar nach der Probenahme am Durchflusszytometer vermessen und miteinander verglichen.

In Abbildung 3.25 sind der Anteil der bei der Auswertung berücksichtigten lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl (Viabilität_{FACS}, siehe Abschnitt B.3.3.2) sowie die Transfektionseffizienzen als Mittelwert über drei Transfektionen dargestellt. Die Viabilität_{FACS} liegt in jeder der Proben über 60 % bezogen auf die Gesamtzellzahl.

Die beiden nach 48 Stunden vermessenen Proben weisen eine Viabilität_{FACS} von 70 % auf. Die Menge exprimierten GFP, die die Transfektionseffizienz wiedergibt, steigt mit beiden eingesetzten GFP-Plasmiden über den untersuchten Zeitraum an. Nach vier Stunden konnte eine TFE von 1,8 % für das unmarkierte bzw. 1,1 % für das Cy5-markierte Plasmid bestimmt werden. Nach 24 Stunden ergeben sich Effizienzen von 23,2 % und 19,5 % und die Endproben nach 48 Stunden wiesen 28,6 % und 21,8 % auf. Es lässt sich bei dem markierten Plasmid eine leicht verringerte Transfektionseffizienz feststellen. Diese liegt allerdings noch innerhalb der Standardabweichung der nicht markierten Proben. Es lässt sich also beim Vergleich von markierten und unmarkierten GFP-Plasmid bei den ermittelten Ergebnissen kein deutlicher Unterschied ausmachen. Daher wurde ein Einfluss der Cy5-Markierung auf die Transfektion für die anschließenden Auswertungen ausgeschlossen.

3.2.3.2 Durchflusszytometrische Analyse

Im Folgenden wird nun die durchflusszytometrische Messung der Cy5-Fluoreszenz genauer betrachtet. Erwartet wurde, dass sich bei den Messungen zwei Populationen deutlich voneinander unterscheiden lassen: Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben und daher eine Cy5-Fluoreszenz aufweisen, und Zellen, die nicht transfiziert wurden und somit nicht mit dieser Wellenlänge fluoreszieren.

Abbildung 3.26 zeigt, dass entgegen dieser Erwartung bei den Messungen keine unterschiedlichen Teilpopulationen erkannt werden konnten. Mit beiden Plasmiden wiesen nach 4 und 24 Stunden beinahe die kompletten Populationen der bei der Auswertung berücksichtigten lebenden Zellen eine Cy5-Fluoreszenz auf. Eine Erklärung hierfür kann die Betrachtung der unterschiedlichen Ladungen liefern. Die DNA-PEI-Komplexe sind stark positiv geladen und werden von den negativ geladenen Zellmembranen angezogen. Dadurch setzen sich alle Komplexe auf den Zellen ab, wo sie allerdings nicht zwangsweise aufgenommen werden müssen. Auch über den Kultivierungsverlauf von 48 Stunden ist keine Trennung in zwei Teilpopulationen erkennbar (siehe Abbildung 3.26B–D). Es kommt lediglich zu einer leicht breiteren Streuung der Zellen. Dabei kommt ein Teil der Zellen in einen Bereich, der als „nicht markiert“ definiert wurde.

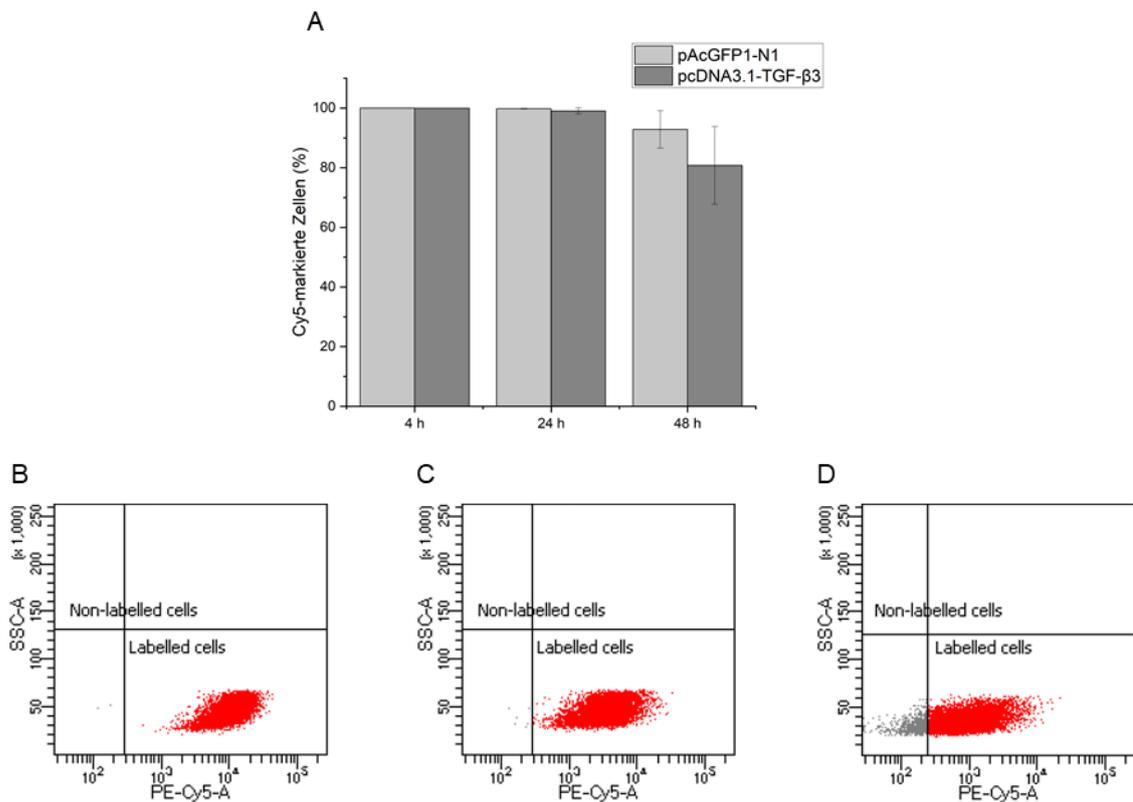


Abbildung 3.26: Bestimmung des Populationsanteils mit Cy5-Fluoreszenz nach der Transfektion mit dem Cy5-markierten Plasmid pAcGFP1-N1 bzw. pcDNA3.1-TGF-β3. B-D: Beispiel-Histogramme (FACS) nach B) 4, C) 24 und D) 48 Stunden nach einer Transfektion mit dem markierten Plasmid pAcGFP1-N1.

In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob eine Ablösung der DNA-PEI-Komplexe von den Zellen und somit eine Trennung in zwei Teilpopulationen erreicht werden kann. Dafür wurden verschiedene Waschschrte zwischen Probennahme und Vermessung am Durchflusszytometer miteinander verglichen. In Tabelle 3.4 sind die Ergebnisse dargestellt. Der Probennahme nach vier Stunden folgte ein Waschschrte mit PBS bzw. mit PBS und 0,001 % SDS [82]. Die ermittelten Labeffizienzen von 99,85 % und 99,95 % liegen sehr dicht beieinander und weisen außerdem keinen signifikanten Unterschied zu einer ungewaschenen Probe auf. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Proben einmal bzw. dreimal mit PBS gewaschen und erneut die Cy5-Labeffizienz bestimmt. Auch hierbei konnten keine Auswirkungen festgestellt werden. Der verringerte Cy5-markierte Populationsanteil nach 48 Stunden ist der oben beschriebenen Streuung der Zellen über die Kultivierungszeit geschuldet und lässt sich nicht auf die Waschschrte zurückführen.

Tabelle 3.4: Vergleich der Populationsanteile mit Cy5-Fluoreszenz nach Durchführung verschiedener Waschschritten vor der durchflusszytometrischen Analyse. Es wurden Proben nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion mit dem Cy5-markierten Plasmid pAcGFP1-N1 untersucht.

Waschpuffer	Waschschrritte	Populationsanteil mit Cy5-Fluoreszenz		
		4 h	24 h	48 h
PBS	1	99,95 %	97,85 %	76,6 %
PBS + 0,001 % SDS	1	99,85 %	-	-
PBS	3	-	97,05 %	74,2 %

3.2.3.3 Mikroskopische Aufnahmen

Aufgrund der GFP-Expression konnte bereits gezeigt werden, dass zumindest das Cy5-markierte Plasmid pAcGFP1-N1 von den Zellen aufgenommen werden und dort weiter prozessiert werden kann (siehe Abbildung 3.25). Der Anteil der Zellen, die die Cy5-markierten Plasmide aufgenommen haben, konnte dabei allerdings nicht bestimmt werden. Mithilfe mikroskopischer Aufnahmen wurde im Folgenden überprüft, ob die Lokalisierung der markierten Plasmide an oder innerhalb der Zellen möglich ist.

Dafür wurden Proben zu drei Zeitpunkten nach der Transfektion genommen, mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert (siehe Abschnitt B.3.4.1) und anschließend unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (*Confocal Laser Scanning Microscope*, CLSM) betrachtet. Dadurch sollten Rückschlüsse auf die Lokalisation der Plasmide innerhalb der Zellen gezogen werden können. Da die Aufnahme der Plasmide in den Nucleus hierbei von Interesse ist, wurden die Zellkerne mithilfe einer DAPI-Färbung sichtbar gemacht (siehe Abschnitt B.3.4.2). Die Ergebnisse für das GFP-Plasmid sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

Zunächst ist auch wie beim Durchflusszytometer unter dem Mikroskop über den Zeitraum von 44 Stunden die Zunahme der GFP-Produktion zu erkennen (vergleiche Abbildung 3.25). Während nach 24 Stunden einige Zellen bereits eine leichte grüne Fluoreszenz aufweisen, sind nach 44 Stunden Kultivierungsdauer mehrere sehr intensiv grün fluoreszierende Zellen sichtbar. Auch die rote Fluoreszenz des Cy5-gelabelten Plasmids ist zu erkennen. Auf den Durchlichtbildern in Abbildung 3.27 ist zu sehen, dass sich ein Teil des Plasmids an der Zelloberfläche

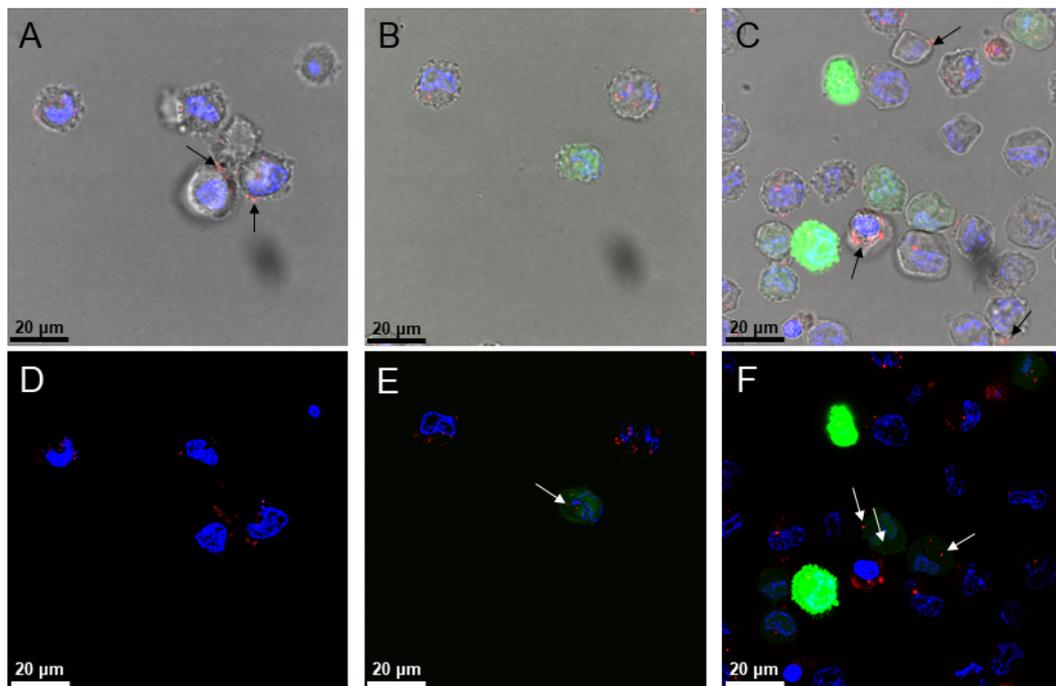


Abbildung 3.27: CLSM-Aufnahmen der mit dem Cy5-gelabelten Plasmid pAcGFP1-N1 transfizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion. A und D: 4 h, B und E: 24 h, C und F: 44 h, wobei A bis C Durchlichtbilder sind. Schwarze Pfeile weisen auf Cy5-Fluoreszenz auf der Zelloberfläche hin, weiße Pfeile markieren Zellen mit einer geringen Anzahl an Cy5-Fluoreszenz-Spots bei gleichzeitiger GFP-Expression.

befindet (siehe schwarze Pfeile). Dies unterstützt die Theorie, dass nicht aufgenommenes Plasmid an der Zellmembran haftet und dort zum Teil auch über die Zeit der Kultivierung verbleibt. Aufgrund der Zweidimensionalität der Bilder ist eine gesicherte Aussage hinsichtlich der Aufnahme in die Zellen schwierig, da die rote Fluoreszenz ebenso von auf der Zelle in Aufnahme-Richtung haftendem Plasmid stammen könnte. Erkennbar ist aber, dass GFP-produzierende Zellen nur einige wenige Punkte mit Cy5-Fluoreszenz aufweisen (siehe weiße Pfeile), wohingegen nicht grün fluoreszierende Zellen teilweise eine vermehrte oder aber auch gar keine Cy5-Fluoreszenz mehr zeigen.

In Abbildung 3.28 sind CSLM-Aufnahmen von Zellen zu sehen, die mit dem Cy5-markierten Plasmid pcDNA3.1-TGF- β 3 transfiziert wurden. Das Verhalten dieses Plasmids ist mit dem Cy5-markierten GFP-Plasmid vergleichbar. Einige Zellen zeigen über die Kultivierungszeit nur Cy5-Fluoreszenz auf der Zelloberfläche (siehe schwarze Pfeile). Andere weisen schon nach 24 Stunden wenige oder gar keine Cy5-Fluoreszenz-Spots auf.

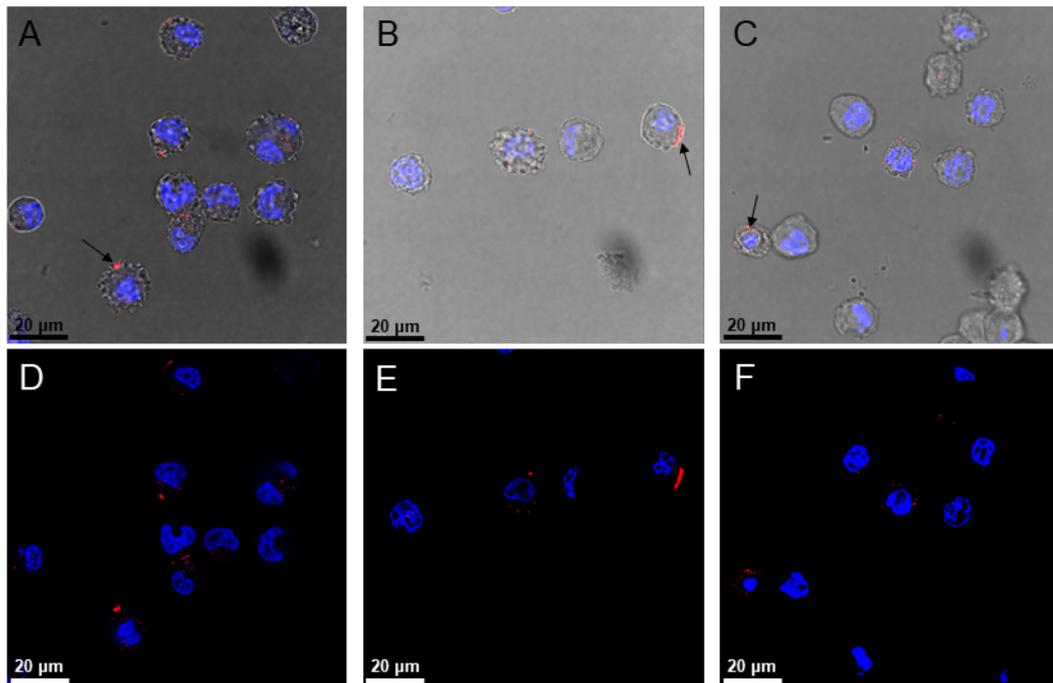


Abbildung 3.28: CLSM-Aufnahmen der mit dem Cy5-gelabelten Plasmid pcDNA3.1-TGF- β 3 transfizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion. A und D: 4 h, B und E: 24 h, C und F: 44 h, wobei A bis C Durchlichtbilder sind. Schwarze Pfeile weisen auf Cy5-Fluoreszenz auf der Zelloberfläche hin.

Die in diesem Unterkapitel beschriebenen Versuche und ihre Ergebnisse lassen erkennen, dass sich die Plasmidmarkierung, wie sie in dieser Arbeit getestet wurden, nicht dazu nutzen lässt, die Plasmidaufnahme in die Zellen direkt nach der Transfektion nachzuweisen. Sie haben aber gezeigt, dass sich die beiden Plasmide pAcGFP1-N1 und pcDNA3.1-TGF- β 3 sehr ähnlich verhalten. Da das Protein GFP produziert wird, kann ein Zusammenhang von der Plasmidaufnahme und der fehlenden Expression des Zielproteins TGF- β 3 vermutlich ausgeschlossen werden. Ein neuen Ansatzpunkt ist auf Ebene der DNA-Sequenz des Plasmids zu suchen.

3.2.4 Fazit

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Herstellung von TGF- β 3 in CHO-Zellen. Es wurden zunächst Versuche mit dem Modellprotein GFP gemacht, um eine geeignete Durchführung der PEI-vermittelten transienten Transfektion

sowie deren Effizienz ermitteln zu können. Aufgrund der höheren Transfektionseffizienz wurde die oben beschriebene einschrittige Methode der zweischrittigen vorgezogen und in den nachfolgenden Versuchen angewendet. Im Vergleich zu Literaturwerten von 50–65 % sind die zunächst erreichten Transfektionseffizienzen von durchschnittlich 20 % mit dem einschrittigen und 12,53 % mit dem zweischrittigen Verfahren sehr gering [38, 83, 84]. Transfektionsexperimente, die im späteren Verlauf durchgeführt wurden, weisen Transfektionseffizienzen von über 50 % auf. Dieser Umstand zeigt, wie sensitiv der Prozess auf die Erfahrung des Experimentators reagieren kann. Dabei sind unter anderem die generelle Handhabung der Zellen, eine möglichst kurze Zeitspanne, die sich die Zellen außerhalb des Inkubators befinden, und die zügige, aber exakte Durchführung der Transfektion an sich von Bedeutung.

Zur Herstellung von rekombinantem TGF- β 3 wurden Transfektionen mit verschiedenen, für TGF- β 3 codierenden Plasmiden durchgeführt und analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass mit keinem der eingesetzten Plasmide eine TGF- β 3-Produktion erreicht werden konnte. Durch die Sequenzierung der eingesetzten Plasmide auf Basis des Expressionsvektors pCSG-IBA102 wurde im Nachhinein festgestellt, dass bei der Klonierung der Plasmide die für das Zielprotein codierende Gensequenz nicht an der richtigen Stelle nachweisbar war. Allerdings hat auch der Einsatz des Plasmids pcDNA3.1-TGF- β 3, dessen Sequenzierung keine Fehler aufzeigte, nicht zu einem Nachweis des Zielproteins geführt.

Um ausschließen zu können, dass hierfür die Plasmidaufnahme in die Zelle zugrunde liegt, wurden Transfektionen mit Cy5-markierten Plasmiden durchgeführt, um eine Lokalisierung zu ermöglichen. Dafür wurden das TGF- β 3-Plasmid pcDNA3.1-TGF- β 3 und das GFP-Plasmid pAcGFP1-N1 verwendet. Beide Plasmide verhielten sich bei der durchflusszytometrischen Analyse sowie der mikroskopischen Überprüfung gleich. Daraus lässt sich schließen, dass die Transfektion an sich nicht Grund für die mangelnde Expression des Zielproteins ist. Über die Aufnahme der Plasmide in die Zellen lässt sich keine Aussage treffen, da die kompletten Populationen, die für die Analyse der durchflusszytometrischen Daten betrachtet wurden, Cy5-Fluoreszenz aufwiesen. Auch durch Waschschrte konnte keine Separation in Teilpopulationen erreicht werden. Die mikroskopischen Aufnahmen der transfizierten Zellen ließen aufgrund der Zweidimensionalität keine eindeutige Aussage zu, ob sich die Plasmide außen an der Zellmembran oder im Cytoplasma befanden. Eine konkrete Lokalisation der mar-

kierten DNA in oder auf der Zelle kann in zukünftigen Arbeiten die Erstellung von optischen Serienschnitten unter dem Mikroskop ermöglichen. Hierbei wird durch die Bewegung des Objektivs die Schärfenebene stufenweise verstellt und somit die Zelle in ihrer Dreidimensionalität abgebildet.

3.3 Arbeiten in HEK293-Zellen

Human embryonic kidney (HEK)-Zellen stellen eine Alternative zu CHO-Zellen als Expressionsorganismus für rekombinate Proteine dar. Sie zählen neben den CHO-Zellen zu den dafür in Forschung und Industrie am häufigsten eingesetzten Zelllinien [85–87]. Genauso wie CHO-Zellen können sie in einer Einzellsuspensionskultur mit hohen Zelldichten ($> 5 \times 10^6$ Zellen/mL) kultiviert und gut transient transfiziert werden [83].

In dieser Arbeit wurden neben den Experimenten zur Herstellung rekombinanter TGF- β 3 in *E. coli* und CHO-Zellen auch Versuche mit HEK293-Zellen durchgeführt. Dafür wurde das MEXi-293E-System von der Firma IBA GmbH ausgewählt. Die Zelllinie ist an das Wachstum in Suspension adaptiert und kann rekombinante Proteine mit einer hohen Ausbeute produzieren [88]. Wie die im vorherigen Kapitel beschriebene Transfektion der CHO-Zellen werden auch die eingesetzten HEK293-Zellen mittels PEI transfiziert.

Als Produktionsgrundlage wurde das Plasmid pCSG-IBA102-TGF β 3 eingesetzt (siehe Abschnitt 3.2.2.1). Aufgrund der oben beschriebenen Sequenzierungsergebnisse wurde die für TGF- β 3 codierende Gensequenz erneut in den Expressionsvektor kloniert (siehe B.1.2.2). Die Klonierung sowie die Transfektionen und anschließenden Kultivierungen wurden, wie in Abschnitt B.4 beschrieben, durch die Firma IBA GmbH realisiert.

3.3.1 Transiente Transfektion mit pCSG-IBA102-TGF- β 3

Die HEK293-Zellen wurden entsprechend der Herstellerangaben mit dem Plasmid pCSG-IBA102-TGF- β 3 transfiziert. Nach einer Kultivierungszeit von vier Tagen wurden Zellproben entnommen und lysiert (siehe B.4.3). Proben des Kulturüberstands sowie der löslichen und unlöslichen Proben nach dem Zellaufschluss

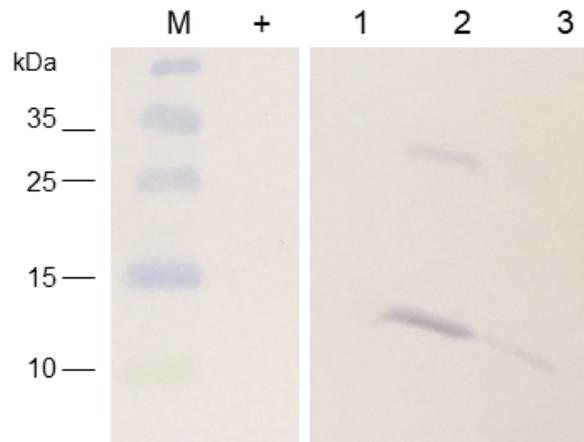


Abbildung 3.29: Western Blot von HEK-Proben nach dem Zellaufschluss. 1: Kulturüberstand, 2: unlösliche Fraktion, 3: lösliche Fraktion, M: molekularer Größenstandard, +: TGF- β 3 aus *E. coli*, ohne TwinStrep[®]-Tag. Eingesetzter Antikörper: Anti-StrepTac[®].

wurden elektrophoretisch aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt (siehe Abbildung 3.29). Die Anfärbung des Zielproteins erfolgte über die Bindung eines gegen den Twin-Strep-Tag[®] gerichteten Antikörpers.

Auf dem Blot sind zwei Banden in der unlöslichen Fraktion zu erkennen. Die Bande zwischen 10 und 17 kDa entspricht dabei dem monomeren TGF- β 3, während die Bande auf einer Höhe von etwa 28 kDa das dimere Protein abbildet. Der densitometrisch bestimmte Anteil des Dimers liegt bei 21 %. Die lösliche Fraktion weist ebenfalls eine dünne Bande auf einer Höhe zwischen 10 und 17 kDa auf. In der Spur der TGF- β 3-Probe ist keine Bande zu sehen, da das eingesetzte Protein keinen entsprechenden Tag hat. Ein weiterer Western Blot mit gleichem Probenauftrag und dem Einsatz des Anti-TGF- β 3-Antikörpers konnte zwar das eingesetzte TGF- β 3 („+“) nachweisen, allerdings nicht das Protein im Lysat der Zellproben. Der Twin-Strep-Tag[®] ist also für den entsprechenden Antikörper zugänglich, die Bindungsstelle für den Anti-TGF- β 3-Antikörper hingegen nicht. Eine mögliche Erklärung dafür könnte eine sterische Hinderung durch die Faltung des exprimierten Zielproteins oder durch nicht bekannte zusätzliche Modifikationen durch die HEK293-Zellen sein. Eine genauere Untersuchung wurde in dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht realisiert. Da dieser Ansatz aber vielversprechende Teilergebnisse geliefert hat, lohnt es sich jedoch weitere Versuche in diese Richtung zu unternehmen.

3.3.2 Fazit

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Herstellung von rekombinanten TGF- β 3 in HEK293-Zellen. Der Einsatz des Plasmids pCSG-IBA102-TGF- β 3 bei der transienten Transfektion führte zu einer Expression des Zielproteins. Der Nachweis erfolgte mittels eines Western Blots und zeigte, dass der Großteil des Zielproteins unlöslich innerhalb der Zellen vorlag. Neben dem Monomer konnte auch ein Anteil von 21 % des Dimers gefunden werden. Die Transfektion von HEK293-Zellen stellt einen erfolgsversprechenden Ansatz dar.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Ansätze für die Herstellung des Wachstumsfaktors TGF- β 3 für den Einsatz in einem medizinischen Implantat evaluiert. Dafür wurden das Bakterium *E. coli* und die Säugetierzelllinien CHO-K1 und HEK293 als Expressionsorganismen ausgewählt und Plasmide mit verschiedenen für das Zielprotein codierenden Gensequenzen konstruiert.

In *E. coli* konnte das Zielprotein als Monomer in Proteinaggregaten exprimiert werden. Mithilfe statistischer Versuchsplanung wurden die Kultivierungsparameter Temperatur, Animpf-OD₆₀₀ und IPTG-Konzentration zur Induktion für eine hohe Proteinausbeute optimiert. Mit einer Kultivierungstemperatur von 32 °C und der Induktion mit 0,5 mM IPTG in einem OD₆₀₀-Bereich von 0,2 bis 0,6 kann eine Zielproteinkonzentration größer als 5 mg/L Kultur erreicht werden. Die unlöslichen *Inclusion bodies* konnten mit Essigsäure-haltigem Puffer zu 67 % resolubilisiert werden. In einem alternativen Ansatz wurde zur Erhöhung der Löslichkeit und Verhinderung der Aggregation das Fusionsprotein Thioredoxin A zusammen mit einem His-Tag eingesetzt. Dies führte dazu, dass das Zielprotein zu 60 % löslich vorlag. Der Zellaufschluss wurde zunächst in kleinem Maßstab mit dem Extraktionsreagenz durchgeführt. Um größere Ansätze kostengünstiger aufschließen zu können, wurden unterschiedliche Puffer getestet. Eine geeignete Pufferzusammensetzung (50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 9) wurde gefunden und für die weiteren Versuche eingesetzt. Das Zielprotein konnte anschließend über eine Nickel-NTA-Säule aufgereinigt werden.

Als Alternative zur Produktion in Bakterien wurde im zweiten Teil der Arbeit die Produktion in CHO-K1-Zellen getestet. Die transiente Transfektion mit verschiedenen Plasmiden wurde mit PEI erreicht. Mithilfe eines für das fluoreszierende Modellprotein GFP codierenden Plasmids wurden zwei Durchführungsvarianten miteinander verglichen und die einschrittige Methode mit einer höheren Transfektionseffizienz von 20 % für die Transfektionen mit den TGF- β 3-Plasmiden aus-

gewählt. Es konnte allerdings keine Expression des Zielproteins nachgewiesen werden. Eine Sequenzierung zeigte im Nachhinein bei den Plasmiden mit pCSG-IBA102-Rückgrat Fehler in der DNA-Sequenz auf, die eine Expression des Zielproteins unmöglich machten. Die Markierung des Plasmids pcDNA3.1-TGF- β 3 mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy5 zeigte, dass sich das Plasmid in der durchflusszytometrischen und mikroskopischen Auswertung wie das zum Vergleich eingesetzte GFP-Plasmid pAcGFP1-N1 verhielt. Die Gründe für die fehlende Expression sind also auch hier auf Ebene der Gensequenz zu finden.

Im dritten Teil der Arbeit wurde das Potential von HEK293-Zellen als Expressionsorganismus von TGF- β 3 untersucht. Der Einsatz eines neuklonierten Plasmids führte zu einer Expression des Zielproteins. Ein Großteil wurde nach dem Zellaufschluss in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen, wovon wiederum ein Teil als Dimer vorlag. Ein geringer Anteil wurde in der löslichen Fraktion gefunden. Eine Sekretion in das Kulturmedium konnte nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 4.1: Übersicht der erreichten Ziele durch die in dieser Arbeit evaluierten Ansätze zur Produktion von rekombinanten TGF- β 3.

* = mit Fusionsprotein TrxA.

	<i>E. coli</i>	CHO-K1	HEK293
Expression von TGF- β 3	+	-	+
TGF- β 3 liegt			
... (teilweise) löslich vor.	+	-	(+)
... (teilweise) als Dimer vor.	-	-	(+)
... im Kulturmedium vor.	-	-	-
Chromatographische Aufreinigung	+	-	-

Der Vergleich aller Ansätze zeigt, dass der Einsatz von HEK293-Zellen als Expressionsorganismus am vielversprechendsten ist, denn das Zielprotein TGF- β 3 konnte in dimerer Form nachgewiesen werden. Da das Dimer allerdings in der unlöslichen Fraktion vorliegt, ist eine Solubilisierung notwendig, bevor die weitere chromatographische Aufreinigung stattfinden kann. Die Produktion in *E. coli* stellt eine Alternative dar. Sind die zusätzlichen Schritte wie die Dimerisierung optimiert, kann der Einsatz des Bakteriums kostengünstiger sein.

Die Herstellung von TGF- β 3 in CHO-K1-Zellen konnte in dieser Arbeit nicht erreicht werden. Das für die Transfektionen in den HEK293-Zellen neu synthetisier-

te Plasmid pCSG-IBA102-TGF- β 3 wurde nicht in die CHO-K1-Zellen eingebracht, sollte aber aufgrund des positiven Ergebnisses in HEK293-Zellen in zukünftigen Arbeiten nachgeholt werden. Auch die Plasmidvariante mit der LAP-Sequenz sollte erneut evaluiert werden, da das LAP die richtige Faltung unterstützen kann. Eine Aktivierung des Proteins kann durch eine Enzymverdau, beispielsweise mit Calpain II, Plasmin oder Cathepsin, erzielt werden [80].

Um bei den Säugetierzellen die Sekretion auf einem hohen Niveau zu erreichen, kann statt des hier eingesetzten Sekretionssignal des pCSG-IBA102-Plasmids das Signalpeptid aus der V-J2-C-Region der κ -Kette des Maus-Ig genutzt werden [80]. Durch die Optimierung des Signals für die Nutzung in HEK-Zellen kann die Ausbeute an löslichem Protein im Medium weiter gesteigert werden [89].

Generell stellte die Löslichkeit des Zielproteins bei allen erfolgreichen Produktionsansätzen die größte Herausforderung dar. Die Optimierung des Puffers für den Zellaufschluss von *E. coli* machte deutlich, dass die Pufferbestandteile dabei eine sehr wichtige Rolle spielt. In zukünftigen Arbeiten sollten daher die Zusammensetzung der eingesetzten Puffer angepasst werden. Eine Solubilisierung mit Guanidinhydrochlorid anstelle von Harnstoff zusammen mit Detergenzien wie SDS oder Cetyltrimethylammoniumchlorid (CTAC) wäre denkbar [90]. Zusätzlich können reduzierende Agenzien wie β -Mercaptoethanol, DTT oder Cystein verhindern, dass sich nicht-native intra- oder intermolekulare Disulfidbrücken ausbilden [91].

Durch die Nutzung des Fusionproteins Thioredoxin wurde das Problem mit der Löslichkeit in *E. coli* umgangen, nach der chromatographischen Aufreinigung fiel das Protein nach der Entfernung des Imidazols allerdings ebenfalls aus. Die Optimierung des Austauschpuffers in Hinblick auf Detergenzien, pH-Wert und Elektrolytkonzentration kann in zukünftigen Versuchen angestrebt werden. Der Einsatz einer Gelfiltrationschromatographie in Form einer Entsalzungssäule wäre ein weiterer Ansatzpunkt, wobei auch hier ein geeigneter Puffer eingesetzt werden muss. Außerdem sollte die Abspaltung des Fusionsproteins Thioredoxin an der TEV-Protease-Schnittstelle unter Verwendung der entsprechenden Protease untersucht werden. Dabei besteht die Möglichkeit die Abspaltung durchzuführen, während das Protein an der oben eingesetzten Nickel-NTA-Säule gebunden ist. Die Trennung vom Fusionsprotein kann allerdings zu einer Fällung des TGF- β 3 führen. Daher ist auch hierbei die Pufferzusammensetzung zu beachten.

Im Anschluss an die Solubilisierung muss eine passende Rückfaltungsmethode gefunden werden, um richtig gefaltetes und bioaktives Zielprotein zu erhalten. Die Faltung könnte in einem Dimethylsulfoxid (DMSO)- oder Dimethylformamid (DMF)-haltigen Puffer durchgeführt werden [67].

Sobald das Zielprotein in der aufgereinigten Form vorliegt, kann die korrekte Peptidsequenz mittels massenspektrometrischer Proteinanalytik überprüft werden. Im Anschluss sollte dann die biologische Aktivität getestet werden. Dafür können mesenchymale Stromazellen in einer dreidimensionalen Pellet-Kultur eingesetzt werden. Ist biologische Aktivität vorhanden, kann nach der Zugabe des rekombinanten TGF- β 3 die Differenzierung zu Knorpelzellen beobachtet werden [92]. Dabei könnte das in *E. coli* hergestellte Protein sowohl mit als auch ohne Fusionsprotein getestet werden. Mit einem Vergleich gegen andere auf dem Markt befindlichen TGF- β 3-Produkte aus verschiedenen Produktionsorganismen lässt sich der Grad der biologischen Aktivität einschätzen.

Nach dem erfolgreichen Nachweis der Bioaktivität ist die medizinische Anwendung in dem von der DFG-Forschergruppe 2180 entwickelten gradierten, zellfreien Implantat möglich. Durch die Einkapselung in Nanopartikel kann eine langsame Freisetzung erreicht werden, durch die die Chondrogenese körpereigener Zellen des Patienten gefördert und damit die Wiederherstellung des verletzten Sehnen-Knochen-Übergangs unterstützt wird [92].

A Materialien

A.1 Verbrauchsmaterialien

Chromatographie-Säulen HisPur™ Ni-NTA Spin Columns, 0,2 mL resin bed	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Chromatographie-Säule Strep- Tactin® XT Superflow, 0,2 mL resin bed	IBA GmbH, Göttingen, DE
Dialysemembran, 3,5 kDa MWCO	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Einmal-Handschuhe	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Einweg-Überziehschutzärmel PE	Franz Mensch GmbH, Buchloe, DE
Einwegspritzen HSW Norm-ject® LuerLock (2 mL, 20 mL)	Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, DE
Erlenmeyerkolben, Polycarbonat mit Belüftungsdeckel (125 mL, 250 mL)	Corning Inc., New York, USA
Filtereinheit MiniSart®	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Filtereinheit Millex®-GV 0,22 µm	Merck, Darmstadt, DE
Immun-Blot® PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Kimtech Science* Labortücher	Kimberly-Clark Professional*, Ko- blenz, DE
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE

Petrischale 94/16 mm	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUT
Pipettenspitzen 10, 200 und 1000 µL	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Pipetten, 2, 5, 10 und 50 mL, steril	Corning Inc., New York, USA
TubeSpin [®] bioreactor 50	TPP, Trasadingen, CH
Western Blotting Filterpapier, extra dick	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellfilter Falcon [™] Cell Strainer 40 µL	Corning Inc., New York, USA

A.2 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese-System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Analysenwaage AC 210 S	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Analysenwaage CP Autoklav Systec V 150	Systec, Linden, DE
Durchflusszytometer BD Accuri [™] C6	BD Biosciences, San Jose, USA
Durchflusszytometer FACS Aria [™] III	BD Biosciences, San Jose, USA
Durchlichtmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Erlenmeyerkolben mit Schikane, 100 mL, 500 mL	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, DE
Fluoreszenzmikroskop Olympus IX50	Olympus Corporation, Tokyo, JPN
Glasflaschen Schott Duran [®]	Schott AG, Mainz, DE
Inkubator HERAcell 240, CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inkubationsschüttler KS 4000 I control	IKA, Staufen, DE

Inkubationsschüttler Vertomat [®] BS-1	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Inkubationsschüttler New Brunswick [™] Innova [®] 44	Eppendorf, Hamburg, DE
Imager ChemoStar 6.0 ECL	Intras, Göttingen, DE
Konfokalmikroskop Leica TCS SP8	XLeica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Messzylinder, diverse Größen	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
NanoDrop [™] 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Meter Metrohm 605	Deutsche METROHM GmbH & Co. KG, Filderstadt, DE
pH-Meter HI 211	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, DE
Pipetten	Brand, Wertheim, DE
Pipettierhilfe Accujet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
Proteingelstation Mini-PROTEAN [®] Tetra handcast system	Bio-Rad, München, DE
Reinstwasseranlage, Arium 611	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instruments, Garbsen, DE
Scanner Perfection V750 Pro	Epson, Suwa, JP
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spektralphotometer NanoDrop 1000	PeqLab-Biotechnologie, Erlangen, DE
Thermocycler	VWR International, Darmstadt, DE
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, DE

Ultraschallsonde, Labsonic	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, DE
Western Blot, Trans-Blot* SD	Bio-Rad, München, DE
Wasserbad WNB 29	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Zellzähler CEDEX	Roche Innovatis AG, Penzberg, DE
Zentrifuge für 1,5 und 2 mL Gefäße, Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge für 15 und 30 mL Gefäße, X3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

A.3 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, CH
Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Biotin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka, Buchs, CH
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dithiotreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DMSO	Merck, Darmstadt, DE
EDTA	Fluka, Buchs, CH
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt, DE
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Formaldehyd	AppliChem, Darmstadt, DE

Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Harnstoff	Fluka, Buchs, CH
HCl	Fluka, Buchs, CH
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Imidazol	Merck, Darmstadt, DE
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	VWR, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
Luminol	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Magermilchpulver	BD, Franklin Lanes, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid	Fluka, Buchs, CH
Natriumdesoxycholat	AppliChem, Darmstadt, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt, DE
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polysorbat 20 (Tween [®] 20)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rotiphorese Gel 40	Carl Roth, Karlsruhe, DE
ROTI [®] GelStain	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Silbernitrat	AppliChem, Darmstadt, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka, Buchs, CH
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris Base)	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Tris-(hydroxymethyl)- aminomethanhydrochlorid (Tris HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, DE

A.4 Puffer, Lösungen und Medien

A.4.1 Puffer und Lösungen

IB-Waschpuffer	20 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X-100
Ni-NTA-Aufreinigung: Elutionspuffer	25 mM Imidazol in PBS, pH 7,4
Ni-NTA-Aufreinigung: Equilibrierungspuffer	20 mM Natriumphosphat 10 mM Imidazol in PBS pH 7,4
Ni-NTA-Aufreinigung: Waschpuffer	25 mM Imidazol in PBS, pH 7,4
PBS-Puffer	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 8
Restriktionsverdau: Puffer	FastDigest® Green Buffer 10x (Ther- mo Fisher Scientific, Waltham, USA)
SDS-Probenpuffer*	20 mM TRIS-HCl, 2mM EDTA 5 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 10 % Glycerin, 0,02 % Bromphenol- blau

Solubilisierungspuffer Essigsäure	20 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 1 mM PMSF 1 % PMSF nach Suspension der Probe: 10 % Essigsäure (5%) pH 2.5
Solubilisierungspuffer Harnstoff	2 M bzw. 6 M Harnstoff in PBS
StrepTactin [®] -Aufreinigung: Puffer W	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8 sterilfiltriert
StrepTactin [®] -Aufreinigung: Puffer BXT	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM Biotin pH 8 sterilfiltriert
TAE-Puffer	40 mM TRIS 1 mM EDTA 20 mM Essigsäure pH 8,5
TBS-Puffer	50 mM TRIS 150 mM NaCl pH 7,6
TGS-Puffer	25 mM TRIS 192 mM Glycin 20 % Methanol 0,1 % SDS
Western Blot: Block-Puffer	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST
Western Blot: Transferpuffer	25 mM Tris 200 mM Glycin 5% Methanol

1,5 % Agarosegel

1,5 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer

A.4.4 Färbelösungen

Coomassie-Färbelösung	367 mL ddH ₂ O 48 mL Phosphorsäure (85 %) 40,8 g Ammoniumsulfat 490 mg Coomassie G-250 82 mL Methanol
DAPI-Färbepuffer	100 mM Tris, pH 7 150 mM Natriumchlorid 1 mM Calciumchlorid 0,5 mM Magnesiumchlorid 0,1 % Nonidet-P40 sterilfiltrieren
DAPI-Färbelösung	500 µL/mL DAPI in ddH ₂ O
ECL-Entwicklerlösung A	100 mM TRIS-HCl 0,4 mM p-Coumarinsäure 2,5 mM Luminol
ECL-Entwicklerlösung B	100 mM Tris-HCl pH 8 0,018 % (v/v) ddH ₂ O ₂
Silberfärbung: Fixierer/Entfärber	50 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Silberfärbung: <i>Farmers Reducer</i>	0,1 % Kaliumhexacyanoferrat(III), 0,1 % Natriumthiosulfat in ddH ₂ O

A.4.5 Zellfixierlösung

4%-Formaldehydlösung 40 g Paraformaldehyd mit PBS ad 1 L, pH 6,9

A.5 Protein- und Nukleinsäuresequenzen

Die nachfolgenden Nukleinsäuresequenzen wurden nach Beendigung der theoretischen Konstruktion von der Firma Life Technologies GmbH (Darmstadt, DE) synthetisiert.

A.5.1 Proteinsequenz

A.5.1.1 TGF- β 3

Alle Nukleinsäuresequenzen des TGF- β 3-Proteins in dieser Arbeit basieren auf der folgenden Proteinsequenz des humanen TGF- β 3-Proteins mit der NCBI RefSeq: NP_001316868.1. In schwarz ist die Sequenz des maturen Proteins dargestellt, in beige die des LAP.

```
lstcttldfg hikkrveai rgqilsklrl tspeptvmt hvpyqvlaly nstrelleem
hgereegctq enteseyyak eihkfdmiqq laehnelavc pkgitskvfr fnvssveknr
tnlfraefrv lrvnpsskr neqrielfqi lrpdehiakq ryiggknlpt rgtawlsfd
vtdtvrewll rresnlglei sihcpchtfq pngdilenih evmeikfkgv dneddhgrgd
lgrlkkqkdh hnphlilmmi pphrldnpgg ggqrkkrald tnycfrnlee nccvrplyid
frqdlgwkwv hepkygyanf csgpcpylrs adthstvlg lyntlnpeas aspccvpqdl
epltilyyvg rtpkveqlsn mvvksckcs
```

Die reverse Translation der Protein- in die folgenden Gensequenzen wurde unter Berücksichtigung der Codonverwendung von *E. coli* bzw. CHO-Zellen durchgeführt. Dies ist notwendig, da sich die Häufigkeitsverteilung der Codons in verschiedenen Organismen unterscheiden kann und nur eine optimale Verwendung zu einer schnellen und fehlerfreien Translation im Zielorganismus führt.

A.5.1.2 Thioredoxin A

Die folgende Aminosäuresequenz (NCBI RefSeq: VWQ03443.1) wurde unter Berücksichtigung der Codonverwendung von *E. coli* für die reverse Transkription in die genutzte Nukleinsäuresequenz eingesetzt.

msdkiihltd dsfddvlka dgailvdfwa ewcgpckmia pildeiadey qgkltvakln
idqnpgtapk ygirgiptll lfkngevaak kvgalskgql kefldanla

A.5.2 Nukleinsäuresequenzen für *E. coli*

A.5.2.1 TGF- β 3-Insert

Die rot markierten Restriktionsschnittstellen der Restriktionsenzyme NcoI und XhoI wurden genutzt, um die Klonierung in den Expressionsvektor pET-16b zu ermöglichen.

CTCGAGGGAT **CCATGG**CACT GGATACCAAT TATTGTTTTT GCAACCTGGA AGAAAATTGT
TGTGTTTCGTC CGCTGTATAT TGATTTTCGT CAGGATCTGG GTTGAAAATG GGTGCATGAA
CCGAAAGGTT ATTATGCCAA TTTTGTAGC GGTCCTGTGC CGTATCTGCG TAGTGCAGAT
ACCACCCATA GCACCGTTCT GGGTCTGTAT AATACCCTGA ATCCGGAAGC AAGCGCAAGC
CCGTGTTGCG TTCCGCAGGA CCTGGAACCG CTGACCATTG TGTATTATGT TGGTCGTACC
CCGAAAGTTG AACAGCTGAG CAATATGGTT GTTAAAAGCT GCAAATGCAG CTAAGGATCC
CTCGAG

A.5.2.2 TrxA-TGF- β 3-Insert

Die Gensequenz zur Expression des TrxA-TGF- β 3-Fusionproteins wurde mithilfe der rot markierten Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme NcoI (CCATGG) und XhoI (CTCGAG) in den Vektor pET-16b eingefügt.

CCATGGGAGAG CGATAAAATT ATTCATCTGA CCGATGATAG CTTTGATACC GATGTTCTGA
AAGCAGATGG TGCAATTCTG GTTGATTTTT GGCAGAATG GTGTGGTCCG TGTAATATGA
TTGCACCGAT TCTGGATGAA ATTGCAGATG AATATCAGGG TAAACTGACC GTTGCAAAAC
TGAATATTGA TCAGAATCCG GGTACCGCAC CGAAATATGG TATTCGTGGT ATTCCGACCC
TGCTGCTGTT TAAAAATGGT GAAGTTGCAG CAACCAAAGT TGGTGCCTG AGCAAAGGTC
AGCTGAAAGA ATTTCTGGAT GCAAATCTGG CACATCACCA TCACCATCAC **GAGAATCTTT**
ATTTTCAGGG CGCACTGGAT ACCAATTATT GTTTTCGTAA TCTGGAAGAA AATTGTTGTG
TTCGTCCGCT GTATATTGAT TTTCGTCAGG ATCTGGGTTG GAAATGGGTT CATGAACCGA
AAGGTTATTA TGCAATTTTT TGTAGCGGTC CGTGTCCGTA TCTGCGTAGC GCAGATACCA
CCCATAGCAC CGTCTGGGT CTGTATAATA CCCTGAATCC GGAAGCAAGC GCAAGCCCGT

GTTGTGTTCC GCAGGATCTG GAACCGCTGA CCATTCTGTA TTATGTTGGT CGTACCCCGA
 AAGTTGAACA GCTGAGCAAT ATGGTTGTTA AAAGCTGTAA ATGTAGCTAA **CTCGAG**

Das Insert beinhaltet neben der Sequenz für TGF- β 3 (schwarz) und TrxA (blau) einen Hexa-Polyhistidin-Tag (violett) sowie eine TEV-Schnittstelle (orange), um mithilfe einer TEV-Protease das mature TGF- β 3 abspalten zu können.

A.5.2.3 Primer für Kolonie-PCR

Für die Durchführung der Kolonie-PCR (B.1.2.5) wurden folgende Primer genutzt. Die Amplifikatlänge betrug 479 bp.

forward CTTTCGGGCTTTGTTAGCAG
reverse TCCCGCGAAATTAATACGAC

A.5.3 Nukleinsäuresequenzen für Säugetierzellen

Für die Herstellung des rekombinanten TGF- β 3s in Säugetierzellen wurden verschiedene Vektoren erstellt, deren Aufbau Tabelle A.9 zu entnehmen ist.

Tabelle A.9: Übersicht der eingesetzten TGF- β 3-Plasmide für die Transfektionen in Säugetierzellen.

* = im Vektor-Rückgrat enthalten.

Vektor-Rückgrat	Zielprotein	Sekretionssignal	Aufreinigungstag
pcDNA3.1(+)	TGF- β 3	β -Trace-Protein	-
pCSG-IBA102	TGF- β 3	BM40*	Twin-Strep-Tag [®] *
pCSG-IBA102	LAP-TGF- β 3	BM40*	Twin-Strep-Tag [®] *

A.5.3.1 TGF- β 3-Insert für pcDNA3.1(+)

Das Insert für die Klonierung in das pcDNA3.1(+)-Plasmid wurde mit folgender Sequenz mithilfe der rot markierten Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme NcoI (CCATGG) und XhoI (CTCGAG) synthetisiert.

GGATCCGCCA **CCATGGCTAC** **TCATCACACG** **CTGTGGATGG** **GA****CTGGTCCT** **GCTGGGGCTG**
CTGGGCGGCC **TACAGGCAGC** **CCTGGACACC** **AACTACTGCT** **TCAGAAACCT** **GGAGGAGAAC**
TGCTGCGTGA **GACCCCTGTA** **CATCGACTTC** **AGACAGGACC** **TGGGCTGGAA** **GTGGGTGCAC**
GAGCCCAAGG **GCTACTACGC** **CAACTTCTGC** **AGCGGCCCT** **GCCCCTACCT** **GAGAAGCGCC**
GACACCACCC **ACAGCACCGT** **GCTGGGCCTG** **TACAACACCC** **TGAACCCCGA** **GGCCAGCGCC**
AGCCCCTGCT **GCGTGCCCCA** **GGACCTGGAG** **CCCCTGACCA** **TCCTGTACTA** **CGTGGGCAGA**
ACCCCAAGG **TGGAGCAGCT** **GAGCAACATG** **GTGGTGAAGA** **GCTGCAAGTG** **CAGCTGAG**
GAG

Auf die in blau dargestellte Kozak-Sequenz folgt in violett die Sequenz des Sekretionssignals aus dem β -Trace-Protein (basierend auf der NCBI RefSeq P41222.1) sowie die des TGF- β 3.

A.5.3.2 TGF- β 3-Insert für pCSG-IBA102

Die folgende Gensequenz wurde für die StarGateTM-Klonierung (B.1.2.2) in den pCSG-IBA102-Vektor genutzt.

GCTTCAGAAA **CCTGGAGGAG** **AACTGCTGCG** **TGAGACCCCT** **GTACATCGAC** **TTCAGACAGG**
ACCTGGGCTG **GAAGTGGGTG** **CACGAGCCCA** **AGGGCTACTA** **CGCCAACTTC** **TGCAGCGGCC**
CCTGCCCTA **CCTGAGAAGC** **GCCGACACCA** **CCCACAGCAC** **CGTGCTGGGC** **CTGTACAACA**
CCCTGAACCC **CGAGGCCAGC** **GCCAGCCCCT** **GCTGCGTGCC** **CCAGGACCTG** **GAGCCCCTGA**
CCATCCTGTA **CTACGTGGGC** **AGAACCCCCA** **AGGTGGAGCA** **GCTGAGCAAC** **ATGGTGGTGA**
AGAGCTGCAA **GTGCAGCTGA**

A.5.3.3 LAP-TGF- β 3-Insert für pCSG-IBA102

Die folgende Gensequenz wurde für die StarGateTM-Klonierung (B.1.2.2) in den pCSG-IBA102-Vektor genutzt. Die braunmarkierte Sequenz codiert für das LAP, die schwarze für TGF- β 3.

CTGAGCACCA **GCACCACCCT** **GGA****CTTCGGC** **CACATCAAGA** **AGAAGAGAGT** **GGAGGCCATC**
AGAGGCCAGA **TCCTGAGCAA** **GCTGAGACTG** **ACCAGCCCCC** **CCGAGCCCAC** **CGTGATGACC**
CACGTGCCCT **ACCAGGTGCT** **GGCCCTGTAC** **AACAGCACCA** **GAGAGCTGCT** **GGAGGAGATG**
CACGGCGAGA **GAGAGGAGGG** **CTGCACCCAG** **GAGAACACCG** **AGAGCGAGTA** **CTACGCCAAG**
GAGATCCACA **AGTTCGACAT** **GATCCAGGGC** **CTGGCCGAGC** **ACAACGAGCT** **GGCCGTGTGC**

CCCAAGGGCA TCACCAGCAA GGTGTTTCTAGA TTCAACGTGA GCAGCGTGGA GAAGAACAGA
 ACCAACCTGT TCAGAGCCGA GTTCAGAGTG CTGAGAGTGC CCAACCCCG CAGCAAGAGA
 AACGAGCAGA GAATCGAGCT GTTCCAGATC CTGAGACCCG ACGAGCACAT CGCCAAGCAG
 AGATACATCG GCGGCAAGAA CCTGCCACC AGAGGCACCG CCGAGTGGCT GAGCTTCGAC
 GTGACCGACA CCGTGAGAGA GTGGCTGCTG AGAAGAGAGA GCAACCTGGG CCTGGAGATC
 AGCATCCACT GCCCTGCCA CACCTTCCAG CCCAACGGCG ACATCCTGGA GAACATCCAC
 GAGGTGATGG AGATCAAGTT CAAGGGCGTG GACAACGAGG ACGACCACGG CAGAGGCGAC
 CTGGGCAGAC TGAAGAAGCA GAAGGACCAC CACAACCCCG ACCTGATCCT GATGATGATC
 CCCCCCACA GACTGGACAA CCCCAGCCAG GCGGCCAGA GAAAGAAGAG AGCCCTGGAC
 ACCAACTACT GCTTCAGAAA CCTGGAGGAG AACTGCTGCG TGAGACCCCT GTACATCGAC
 TTCAGACAGG ACCTGGGCTG GAAGTGGGTG CACGAGCCCA AGGGCTACTA CGCCAACCTC
 TGCAGCGGCC CCTGCCCTA CCTGAGAAGC GCCGACACCA CCCACAGCAC CGTGCTGGGC
 CTGTACAACA CCCTGAACCC CGAGGCCAGC GCCAGCCCCT GCTGCGTGCC CCAGGACCTG
 GAGCCCCTGA CCATCCTGTA CTACGTGGGC AGAACCCCA AGGTGGAGCA GCTGAGCAAC
 ATGGTGGTGA AGAGCTGCAA GTGCAGCTGA

A.5.3.4 Primer für StarGate™-Klonierung

Die Primer wurden mit der rot markierten Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym Esp3I (CGTCTCN') konstruiert und bei der StarGate™-Klonierung (B.1.2.2) eingesetzt.

Tabelle A.11: Eingesetzte Primer für die StarGate™-Klonierung in den Vektor pCSG-IBA102.

Insert	Richtung	Sequenz
LAP-TGF-β3	<i>forward</i>	AGCGCGTCTCCAATGCTGAGCACCAGCACCACC
TGF-β3	<i>forward</i>	AGCGCGTCTCCAATGGCCCTGGACACCAACTACT
beide	<i>reverse</i>	AGCGCGTCTCCTCCCGCTGCACTTGCAGCTCTTCA

A.6 Biomoleküle, Plasmide und Zellen

A.6.1 Biomoleküle

Anti-eGFP (Hase, IgG, CAB4211)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Hase (Ziege, IgG, 4750.1)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Anti-StrepTac [®] (HRP-Konjugat, 2-1502-001)	IBA GmbH, Göttingen, DE
Anti-TGF- β 3 (Ziege, IgG, AB-244-NA)	R&D systems, Minneapolis, USA
Anti-Ziege (Maus, IgG, HRP-Konjugat, HAF017)	R&D systems, Minneapolis, MN
dNTPs	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler [™] 1 kb DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler [™] 100 b DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler [™] Unstained Protein Ladder (#26614, 10-200 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler [™] Stained Protein Ladder (#26616, 10-170 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce [™] Unstained Protein MW Marker (#26610, 14-116 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Polymerase GoTaq	Promega, Fitchburg, USA
Polymerase AccuPrime [™] <i>Pfx</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Restriktionsenzym Esp3I FastDigest [®]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Restriktionsenzym NcoI FastDigest [®]	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Restriktionsenzym XhoI FastDigest®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
rLysozym™	Merck, Darmstadt, DE
StarGate™ ESG/CSG-Primer-for	IBA GmbH, Göttingen, DE
StarGate™ ESG/CSG-Primer-rev	IBA GmbH, Göttingen, DE
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TGF-β3 (aus CHO)	ProSpec-Tany TechnoGene Ltd, Ness Ziona, ISR
TGF-β3 (aus <i>E. coli</i>)	Cell Guidance Systems Ltd, Cambridge, UK

A.6.2 Vektoren

pAcGFP1-N1	4726 bp	Takara Bio Inc., Kusatsu, JP
pcDNA3.1-GFP	6163 bp*	AK Hoffmann, NIFE
pcDNA3.1-TGF-β3	5786 bp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pET-16b	5711 bp	Merck, Darmstadt, DE
pET-16b-TGF-β3	5993 bp	Lena Stuckenberg, Institut für Technische Chemie
pET-16b-TrxA-TGF-β3	6353 bp	Lena Stuckenberg, Institut für Technische Chemie
pCSG-IBA102	11007 bp	IBA GmbH, Göttingen, DE
pCSG-IBA102-TGF-β3	10653 bp	Lena Stuckenberg, Institut für Technische Chemie
pCSG-IBA102-LAP-TGF-β3	11484 bp	Lena Stuckenberg, Institut für Technische Chemie

* = geschätzt, da keine Vektorkarte vorhanden

A.6.3 Zellen

CHO K12	AK Noll, Universität Bielefeld, DE
<i>E. coli</i> Top10	IBA GmbH, Göttingen, DE
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	New England Biolabs, Ipswich, USA
MEXi293E-Zellen	IBA GmbH, Göttingen, DE
SHuffle® T7 Express Competent <i>E. coli</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA

A.7 Reaktionskits

LabelIT® Nucleic Acid Labeling Kit, Cy® 5	Mirus Bio LLC, Madison, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, DE
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, DE
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE

B Methoden

B.1 Molekularbiologische Methoden

B.1.1 Allgemeine Methoden

B.1.1.1 Nukleinsäure-Quantifizierung mittels NanoDrop®

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen wurde mit dem Mikrovolumen-Spektrophotometer NanoDrop®-ND 1000 durchgeführt. Dieses Photometer bestimmt die Lichtadsorption in kleinsten Volumina (1-2 μL). Für die initiale Inbetriebnahme wurden 2 μL dest. Wasser auf den Probenhalter pipettiert. Anschließend wurde der Nullpunkt mit dem verwendeten Puffer aufgenommen. Die Proben konnten dann vermessen und die Messwerte ausgegeben werden.

B.1.1.2 Agarosegel-Elektrophorese

Eine Agarosegel-Elektrophorese wird genutzt, um Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe voneinander trennen und die Größe bestimmen zu können. Dafür wird ein Gel aus Agarose hergestellt und ein elektrisches Feld angelegt. Die DNA wandern aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode. Eine Auftrennung wird dadurch erreicht, dass kleinere Moleküle sich schneller als größere durch die Poren des Gels bewegen können. Mithilfe eines interkalierenden Farbstoffs wie Ethidiumbromid, der sich während der Elektrophorese in die DNA einlagert, können die aufgetrennten Banden anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Ein Vergleich mit einem DNA-Gemisch bekannter Größen ermöglicht die Größenbestimmung der aufgetrennten Probe.

Es wurde ein 1,5%iges Agarosegel gegossen. Dafür wurden 1,5 g Agarose mit 100 mL Wasser in der Mikrowelle bei 700 Watt für 2 min aufgeköcht. Anschließend wurden 4 µL ROTI® GelStain hinzugegeben, gemischt und die Lösung in der Kammer gegossen. Nachdem sich das Gel verfestigt hatte, wurde es mit den zu untersuchenden Proben (je 20 µL) beladen. Außerdem wurden zwei DNA-Marker (GeneRuler™ 1 kb und 100 b) 1:1 mit 5x Puffer gemischt und ein Volumen von 6 µL aufgetragen. Die DNA-Proben wurden in TAE-Laufpuffer 40 min bei 100 V aufgetrennt und das Gel anschließend für die Auswertung unter einer UV-Lampe fotografiert.

B.1.1.3 DNA-Gelextraktion

Für die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel wurde die gewünschte DNA-Bande mittels Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde mit dem Qiagen Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden, DE) nach Herstellerangaben durchgeführt.

B.1.2 Klonierung

B.1.2.1 Restriktionsverdau und Ligation

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzyme ermöglicht das Ausschneiden bestimmter Nukleinsäuresequenzen, beispielsweise zur Übertragung in einen anderen Plasmid. Restriktionsenzyme binden an eine für sie spezifische DNA-Sequenz, durchtrennen diese und das Plasmid wird in zwei Fragmente geteilt. Mithilfe einer anschließenden Ligation können diese und andere mit den gleichen Enzymen geschnittene Fragmente zusammengefügt werden.

Das Plasmid mit dem *TGF-β3*-Gen und der ausgewählte Expressionsvektor wurden zunächst enzymatisch gespalten. Das Reaktionsgemisch hatte folgende Zusammensetzung:

2 μ L FastDigest[®] Green Buffer
2 μ L DNA
1 μ L XhoI FastDigest[®]
1 μ L NcoI FastDigest[®]
ad 20 μ L mit nukleasefreiem H₂O

Im nächsten Schritt wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (B.1.1.2) mit den Proben des Ligationsansatzes durchgeführt. Die Bande des geschnittenen Expressionsvektors (5643 bp) und die der Gensequenz für TGF- β 3 (350 bp) wurden anschließend aus dem Gel extrahiert (B.1.1.3).

Mit den aufgereinigten Sequenzen wurde anschließend eine Ligation durchgeführt. Dafür wurde folgendes Reaktionsgemisch genutzt:

1,183 μ L TGF- β 3
2,98 μ L pET-16b
2 μ L Puffer
1 μ L T4-Ligase
ad 20 μ L H₂O

Im Anschluss wurde eine Hitzeschock-Transformation (B.1.2.3) durchgeführt.

B.1.2.2 StarGate[™]-Klonierung

Mithilfe der StarGate[™]-Verfahren der Firma IBA GmbH wurden die entsprechenden TGF- β 3-Gensequenzen (A.5.3.2 und A.5.3.3) in den Expressionsvektor pCSG-IBA102 eingebracht (A.9). Dabei wurden nach Angaben des Herstellers für das direkte Einklonieren in das Plasmid vorgegangen.

B.1.2.3 Transformation mittels Hitzeschock

Das Einbringen von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Zellen wird mittels Hitzeschock erreicht. Nach der Transformation werden die Bakterien auf einem Antibiotikum-haltigen Medium ausgestrichen. Es entsteht ein Selektionsdruck, durch den sich nur Bakterien vermehren können, die das Plasmid mit dem

entsprechenden Resistenzgen aufgenommen haben. Die zu transformierenden Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Ein Volumen von 50 μL Bakterien-suspension wurden mit 5 μL Plasmid-DNA versetzt, vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock im Wasserbad für 5 min bei 37 °C. Die Zellsuspension wurde vorsichtig gemischt und für 5 min auf Eis gekühlt. Dann erfolgte eine 10-fache Verdünnung mit LB (*lysogeny broth*)- bzw. TB (*terrific growth*)-Medium (A.4.2) und die Bakterien-suspension wurde für 45 min bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Suspension wurde in verschiedenen Verdünnungen auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten (B.2.1.2) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

B.1.2.4 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation wurde mit Kits der Firma Qiagen (Hilden, DE) durchgeführt, die auf der alkalischen Lyse basieren. Die Bakterienzellen werden aufgeschlossen und die chromosomale DNA zerstört. Durch den Einsatz von RNase wird störende RNA entfernt. Die Plasmid-DNA bleibt erhalten und wird in konzentrierter Form separiert. Zur Aufreinigung einer kleinen Menge Plasmid-DNA wurde eine Vorkultur (B.2.1.3) und das QIAprep Spin Miniprep Kit genutzt. Für die größeren Kulturvolumina einer nicht-induzierten Hauptkultur (B.2.1.4) wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit eingesetzt. Die Durchführung fand entsprechend der den Kits beiliegenden Hersteller-Protokolle statt. Die aufgereinigten Plasmide wurde in Wasser gelöst und bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

B.1.2.5 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR (Polymerase-Kettenreaktion) wird genutzt, um ein Plasmid in einer Bakterienkolonie mit dem Einsatz zweier spezifischer Primer nachzuweisen. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA durch Hitze denaturiert und liegt einzelsträngig vor. Die Primer binden in der Anlagerungsphase bei einer Primer-spezifischen Temperatur an den komplementären Teil der Einzelstränge und flankieren die nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz. Im Elongationsschritt synthetisiert eine thermostabile Polymerase von dem Primers aus den weiteren komplementären Strang. Durch die Wiederholung dieser Schritte wird

die Menge der nachzuweisenden Plasmid-DNA potenziert und kann abschließend mit einer Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Es wurden zunächst Reaktionsgefäße mit 50 µL RNase-freiem Wasser gefüllt. Mit einer Impföse wurden Kolonien gepickt, auf einer neuen Agarplatte verstrichen und dann im vorbereiteten Wasser abgespült. Anschließend wurden die Proben im Thermocycler für 5 min bei 95 °C aufgekocht und für 1 min auf Eis gestellt. Der Mastermix wurde x-fach angesetzt, wobei x die Anzahl der Kolonien ist.

10 µL	5x GoTaq® Reaction Buffer
4 µL	dNTP-Mix (10 µM)
2 µL	Primer-Mix (2 µM)
0,25 µL	GoTaq® Polymerase
22,75 µL	RNase-freies Wasser
10 µL	Bakteriensuspension

Als Negativkontroll-Probe wurde Wasser anstelle der DNA eingesetzt. Das PCR-Programm für die Kolonie-PCR lautet wie folgt:

Initiale Denaturierung	95 °C, 5 min
<i>35 Wiederholungen</i>	
Denaturierung	95 °C, 30 sec
Primer-Anlagerung	59 - 62 °C (Primer-abhängig), 30 sec
Elongation	72 °C, 1 min
Abschließende Elongation	72 °C, 7 min

Die Proben wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (B.1.1.2) nachgewiesen.

B.1.3 Plasmid-Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5

Plasmide wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert. Dieser Farbstoff geht eine Reaktion mit den Alkylresten der Nukleinbasen ein. Das Reaktionsschema ist in Abbildung B.1 dargestellt. Mit einer Anregungswellenlänge von

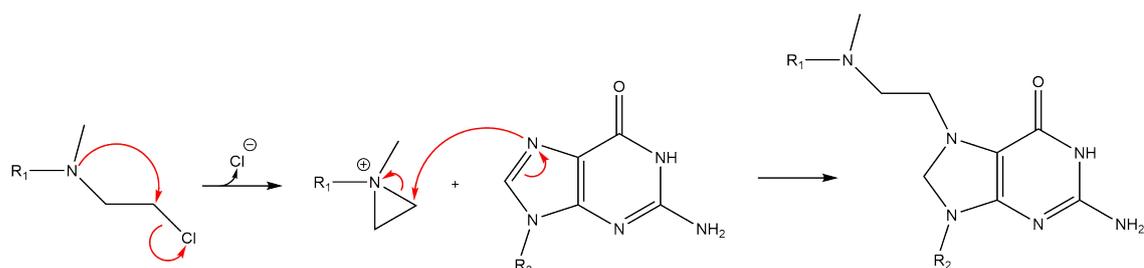


Abbildung B.1: Reaktionsschema der reaktiven Gruppe des Label-IT[®]-Reagenzes mit einem reaktiven Heteroatom innerhalb einer Nukleinsäure, in diesem Beispiel dem N⁷-Atom eines Guanins. Angepasst aus [93].

649 nm und einer Emission bei $\lambda = 670$ nm ist der Farbstoff im roten Farbspektrum angesiedelt und damit gut von dem grün fluoreszierenden GFP zu unterscheiden (siehe Abbildung B.4). Entsprechend den Hersteller-Empfehlungen für den *in vivo*-Einsatz der markierten Plasmide wurde ein Verhältnis von 0,1:1 (v/w) LabelIT[®]-Reagenz zu Plasmid-DNA eingesetzt. Das Verhältnis von Cy5 zu Basen, also die Fluoreszenzmarker-Dichte, wurde mittels NanoDrop[®] bestimmt (siehe Kapitel B.1.3.1). Im Durchschnitt wurden acht Cy5-Moleküle pro Plasmid eingesetzt.

Zunächst wurde ein Ansatz mit folgender Zusammensetzung in einem 0,2- μ L-Reaktionsgefäß hergestellt:

20 μ g	pDNA
5 μ L	Labeling Buffer A
2 μ L	LabelIT-Reagenz
ad 50 μ L	H ₂ O (nuklease-frei)

Der Ansatz wurde für 60-90 min bei 37 °C inkubiert. Alle 30 min wurde der Reaktionsansatz anzentrifugiert, um Evaporationseffekte zu minimieren und die Konzentration der Reaktionskomponenten zu erhalten. Der Reaktionsansatz wurde dann in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß überführt und mit nuklease-freiem Wasser auf 100 μ L aufgefüllt. Anschließend wurde mit 10 mL einer fünfmolaren Natriumchloridlösung und 240 μ L 100 % Ethanol eine Fällung durchgeführt. Dadurch wurde die Trennung von nicht gebundenen Fluoreszenzmarkern erreicht. Es erfolgte eine Zentrifugation mit 14000 rcf bei 4 °C für 30 min. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 500 μ L 70 % Ethanol (Raumtemperatur) resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurde der

Überstand wiederum verworfen, das Reaktionsgefäß umgekehrt auf ein Labortuch gestellt und trocknen gelassen. Anschließend wurde die markierte DNA in 150 μL nuklease-freiem Wasser aufgenommen.

B.1.3.1 Bestimmung der Fluoreszenzmarker-Dichte

Nach der Markierung der pDNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 wird zunächst die Nukleinsäure-Konzentration bestimmt. Dafür wird die Absorption A_{260} bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels NanoDrop[®] gemessen. Da der Farbstoff ebenfalls zur Absorption beiträgt, wird ein Korrekturfaktor $C.F._{260}$ mit einem konstanten Wert von 0,05 eingesetzt. Die Bestimmung der Absorption des Farbstoffes (A_{dye}) findet bei der spezifischen maximalen Extinktionswellenlänge statt. Im Falle des verwendeten Cy5-Farbstoffes liegt diese bei $\lambda = 649$ nm.

$$A_{base} = A_{260} - (A_{dye} * C.F._{260}) \quad (\text{B.1})$$

Im Folgenden wird das Verhältnis von Basen und Farbstoffmolekülen berechnet. Die Extinktionskoeffizienten des Farbstoffes ($\epsilon_{dye}(\text{Cy5}) = 250000 \text{ M cm}^{-1}$) und der pDNA ($\epsilon_{base}(\text{dsDNA}) = 6600 \text{ M cm}^{-1}$) werden dabei berücksichtigt.

$$base : dye = \frac{A_{base} * \epsilon_{dye}}{A_{dye} * \epsilon_{base}} \quad (\text{B.2})$$

B.2 Proteinexpression und -aufreinigung in *E. coli*

B.2.1 Kultivierung

B.2.1.1 Herstellung von Medien und Agarplatten

LB- und TB-Medien wurden wie in Abschnitt A.4.2 aufgelistet hergestellt und autoklaviert. Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurden, nach dem Abkühlen des Mediums auf etwa 60 °C, 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Ampicillin (Stammlösung 25 mg/mL) hinzugegeben. Anschließend wurden die Platten gegossen (ca. 20 mL) und härteten beim Abkühlen aus. Die Platten wurden bis zur weiteren Verwendung verschlossen und auf dem Deckel liegend bei 4 °C gelagert.

B.2.1.2 Kultivierung auf LB-Agarplatten

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden 100 μL einer Bakteriensuspension in unterschiedlichen Verdünnungen mithilfe eines Drigalskispatels auf LB-Agarplatten verstrichen. Anschließend wurden sie auf dem Deckel liegend über Nacht bei 37 °C inkubiert und am folgenden Tag analysiert. Platten mit Bakterienkolonien wurden verschlossen und auf dem Deckel liegend bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert.

B.2.1.3 Anlegen einer Vorkultur

Zur Kultivierung wurde zunächst eine Vorkultur angelegt. Dafür wurden mithilfe einer Impföse ein wenig Material einer noch gefrorenen Glycerin-Gefrierkultur (B.2.1.5) oder eine Kolonie von einer LB-Agarplatte (B.2.1.2) abgenommen und in ein mit 5 mL Medium und 75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Ampicillin gefülltes 50-mL-Falkon überführt. Nach der Kultivierung über Nacht bei 37 °C und 180 rpm wurde die Vorkultur zum Animpfen der Hauptkultur genutzt.

B.2.1.4 Kultivierung im Schüttelkolben

Ein Volumen von 160 mL frischem Medium mit 75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ Ampicillin wurde in einem 500-mL-Schüttelkolben mit einer Vorkultur (B.2.1.3) angeimpft, sodass die Start- OD_{600} 0,03 beträgt. Die Kultivierung fand bei 32 °C und 180 rpm statt. Die Proteinexpression wurde bei einer OD_{600} zwischen 0,4 und 1 mit einer Endkonzentration von 0,5 bzw. 1 mM IPTG induziert. Die Kultivierung wurde nach spätestens 24 Stunden beendet.

B.2.1.5 Anlegen einer Gefrierkultur

Für eine Übernachtskultur einer Bakterienkolonie wurden 20 mL steriles Medium und Ampicillin (75 $\mu\text{L}/\text{mL}$) in einen 125 mL-Schüttelkolben gefüllt und mit einer Impföse eine Kolonie von einer LB-Agarplatte ins Medium übertragen. Die Kultur wurde bei 37 °C und 150 rpm über Nacht kultiviert.

Aus einer Vorkultur wurden je 500 μL mit dem gleichen Volumen Glycerol (25 %) in einem 1,5-mL-Reaktionsgefäß gemischt und für 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

B.2.2 Zellaufschluss

B.2.2.1 Protein-Extraktionsreagenz BugBuster®

Der Zellaufschluss mit dem Protein-Extraktionsreagenz BugBuster® ist für den schnellen Aufschluss kleiner Probenvolumina ($>1\text{ mL}$) geeignet. Zur Vorbereitung wurden 2 mL der Arbeitslösung mit 1 μL Benzonase und 2 μL rLysozym versetzt. Die gewünschte Zellmenge wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Volumen der Arbeitslösung wurde so gewählt, dass die OD_{600} nach der Resuspension des Pellets zwischen 15 und 20 liegt. Die Lösung wurde anschließend im Thermomixer 20–30 min bei $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 350 rpm geschüttelt. Die Zellsuspension wurde bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $21000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand mit dem löslichen Zielprotein für nachfolgende Schritte genutzt.

B.2.2.2 Zellaufschluss mit Ultraschall

Die Zellyse mit einer Ultraschalltauchsonde ist eine mechanische Zellaufschlussmethode, bei der die Zellen in kurzen Intervallen energiereichen Ultraschallwellen ausgesetzt werden. Es entstehen Kavitationen, die implodieren und dabei die Zellmembran schädigen. Ein Volumen von 500 μL der aufzuschließende Kulturprobe wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 μL Aufschlusspuffer (Tabellen B.1 und B.2) gelöst und mit 5 μL Lysozym (1 mg/mL) versetzt. Die Probe wurde anschließend auf Eis in vier Zyklen mit Ultraschall (Dauer: 1,5 min, Amplitude: 100 %, Pulsmodus: 0,6) aufgeschlossen. Zwischen den Zyklen wurde die Probe für mindestens 1 min abgekühlt, um eine Proteindenaturierung zu vermeiden.

Tabelle B.1: Zusammensetzung der getesteten Puffer für den Zellaufschluss mit Ultraschall. Puffer 1-3 beinhalten 50 mM TRIS-HCl, Puffer 4 stattdessen 50 mM MOPS.

Puffer	NaCl (mM)	DTT (mM)	Glycerol (%)	MgCl ₂ (mM)	pH-Wert
1	100	1	-	-	7,5
2	100	1	5	-	7,5
3	100	-	5	-	7,5
4	-	1	10	10	7,5

Tabelle B.2: Getestete Zusammensetzungen auf Basis von Puffer 1. Alle Puffer beinhalten 50 mM TRIS-HCl und 1 mM DTT.

Puffer	NaCl (mM)	pH-Wert
1	-	7,5
1a	-	9
1b	300	7,5
1c	300	9
1d	150	8,25

B.2.3 Solubilisierung

Um nach dem Zellaufschluss nicht-lösliches Protein zu solubilisieren, wurden verschiedene Methoden getestet. Die nach den Kultivierungen für weitere Analysen gelagerten Pellets wurden mit dem Protein-Extraktionsreagent BugBuster[®] aufgeschlossen (B.2.2.1). Die nicht-lösliche Fraktion wurde nach einem Zentrifugationsschritt in 100 µL Solubilisierungspuffer (A.4.1) resuspendiert. Eine Kontrollprobe wurde statt mit einem Solubilisierungspuffer mit Wasser versetzt. Für einen Einfrier-Auftau-Zyklus wurden die Proben bei -20 °C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag bei Raumtemperatur aufgetaut. Fand die Solubilisierung bei Raumtemperatur statt, wurden die Proben für 10 min bzw. über Nacht auf einem Rollmischer inkubiert. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und die Fraktionen elektrophoretisch aufgetrennt (B.5.1.1).

B.3 Proteinexpression und -aufreinigung in CHO

B.3.1 Kultivierung

Damit für die Versuche jederzeit Zellen zur Verfügung stehen, wurden die CHO-K1-Zellen durchgehend in Kultur gehalten. Das eingesetzte CHOmacs-Medium wurde mit L-Glutamin versetzt und bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde es im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und 25 mL in ein schikanierten 125-mL-Erlenmeyerkolben mit Filterschraubverschluss vorgelegt. Dann wurden Zellen hinzugegeben, sodass eine Zelldichte von $0,4 \times 10^6$ Zellen/mL erreicht wurde. Alle Kultivierungen wurde in einem Inkubationsschrank auf einem Orbitalerschüttler mit 160 rpm bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre durchgeführt.

B.3.1.1 Subkultivierung

Für das Wachstum und den Erhalt der Zellviabilität wurde das Medium regelmäßig ausgetauscht, da einige Bestandteile über die Kultivierungszeit von den Zellen verstoffwechselt werden oder zerfallen. Alle drei bis vier Tage oder bei Erreichen einer Zellzahl von über 8 Mio. Zellen/mL wurde die Kultur passagiert, also mit frischem Medium auf die Anfangszelldichte von $0,4 \times 10^6$ Zellen/mL verdünnt. Dafür wurde die Zelldichte bestimmt und berechnet, wie viel Zellsuspension für einen neuen Kulturansatz benötigt wird. Das entsprechende Volumen wurde entnommen, 5 min bei $200 \times g$ abzentrifugiert und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die restlichen Zellen wurden für Versuche oder das Anlegen einer Arbeitszellbank (B.3.1.3) eingesetzt oder verworfen.

B.3.1.2 Zellzahlbestimmung mit CEDEX

Um den Wachstumsverlauf der Kultur und die Zellviabilität bestimmen zu können, wurde mit dem automatischen Zellzähler CEDEX (Roche Innovatis AG, Penzberg, DE) eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Das Gerät analysiert die

Proben, nachdem es eine Lebend-Tot-Färbung mit dem Farbstoff Trypanblau vorgenommen hat: Nur tote und perforierte Zellen nehmen den Farbstoff auf. Anschließend analysiert das Gerät Mikroskopbilder der Zellen mithilfe eines Algorithmus und gibt die Zellzahl sowie die -viabilität aus. Zellaggregate werden dabei erkannt und von der Wertung ausgeschlossen. Außerdem wurde die Zellviabilität zusätzlich durchflusszytometrisch bestimmt. Lebende und tote Zellen unterscheiden sich in ihrer äußeren Erscheinung, reflektieren das Licht daher anders und werden in den Histogrammen des Durchflusszytometers in zwei Teilpopulationen dargestellt. Neben der Gesamtzellzahl wurden auch die Lebendzellzahl sowie die Viabilität in Prozent ausgegeben.

Die zu vermessene Zellprobe wurde bei einem Probenvolumen < 1 mL mit sterilfiltriertem PBS auf 1 mL aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde in ein Probenröhrchen überführt und am Gerät vermessen.

B.3.1.3 Kryokonservierung

Zur Herstellung einer Arbeitszellbank und zur Stammerhaltung wurden Zellen mit einer möglichst niedrigen Passage kryokonserviert. Sie hatten dabei eine Viabilität über 98 % und befanden sich im exponentiellen Wachstum. Die Zellzahl wurde bestimmt und die benötigte Menge an Zellsuspension für eine Konzentration von 10^7 Zellen pro Kryogefäß bei $200 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Gefriermedium (Medium mit 10 % DMSO) resuspendiert, sodass die oben genannte Konzentration erreicht wurde. Je 1,6 mL Suspension wurde in vorbereitete Kryoröhrchen verteilt und die Röhrchen in eine vorgekühlte Einfrierbox gestellt. Die Box wurde über Nacht bei -80°C gelagert und die Kryoröhrchen am nächsten Tag in einen Kryocontainer mit flüssigem Stickstoff überführt.

B.3.1.4 Revitalisierung

Um die Zellen zu revitalisieren, wurde ein Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im 37°C warmen Wasserbad unter schwenken aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 5 mL kaltem Medium (4°C) aufgenommen und dann bei $200 \times g$ für 5 min zentrifugiert, um das im Gefriermedium enthaltene

DMSO zu entfernen. Das Pellet wurde in warmem Medium (37 °C) aufgenommen und in einen 250-mL-Schüttelkolben überführt.

B.3.2 PEI-vermittelte transiente Transfektion

Für die PEI-vermittelte transiente Transfektion von CHO-Zellen wurde am Tag vor der Transfektion eine Vorkultur mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/mL angelegt (B.3.1.1). Das Volumen wurde entsprechend der Anzahl geplanter Transfektionsansätze mit jeweils 10×10^6 Zellen/mL und der Annahme, dass sich die Zellzahl innerhalb eines Tages verdoppelt, gewählt. Am folgenden Tag konnten dann die Transfektionsversuche durchgeführt werden. Dazu wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf die gewünschte Konzentration von 10×10^6 Zellen/mL aufkonzentriert. Dafür wurde die entsprechende Menge Zellen in ein 50-mL-Zentrifugationsröhrchen mit Belüftungsverschlusskappe überführt und für 5 min bei $200 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem Volumen von 1 mL frischem, warmen Medium aufgenommen. Um eine Vereinzlung der Zellen zu erreichen, wurde die Zellsuspension für 30 bis 60 min in den Inkubator gestellt. Dafür und für alle folgenden Schritte wurde ein Gestell (siehe Abbildung B.2) genutzt, in dem die Röhrchen in einem 45°-Winkel standen. Damit wurde ein Sedimentieren der Zellen verhindert.



Abbildung B.2: Gestell für die Bioreaktor-Röhrchen.

Anschließend wurde die Transfektion entsprechend Abschnitt B.3.2.1 oder B.3.2.2 durchgeführt. Die entsprechenden DNA-Mengen sind Tabelle B.3 zu entnehmen.

Tabelle B.3: Auflistung der verschiedenen Plasmide und der in den Transfektionen eingesetzten Mengen. Pro Transfektionsansatz mit 10×10^6 Zellen wurden etwa $51,625 \times 10^{11}$ Plasmide eingesetzt.

Plasmid	Moleküle/ μg	eingesetzte Menge (μg)
pAcGFP1-N1	$4,13 \times 10^{11}$	12,50
pCSG-IBA102-TGFb3	$9,15 \times 10^{10}$	56,42
pCSG-IBA102-LAP-TGFb3	$8,49 \times 10^{10}$	60,74
pcDNA3.1-GFP	$1,58 \times 10^{11}$	32,68
pcDNA3.1-TGFb3	$1,68 \times 10^{11}$	30,73

Nach einer Inkubation von vier Stunden im Inkubator wurden die Transfektionsansätze auf 1×10^6 Zellen/mL verdünnt und 48 Stunden kultiviert. Es erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten Probenentnahmen für Analysen wie Zellzahlbestimmung (B.3.1.2) oder durchflusszytometrische Analysen (B.3.3.2).

B.3.2.1 Einschrittiges Protokoll

Die Plasmid-DNA wurde entsprechend Tabelle B.3 zur Zellsuspension gegeben und für 10 min im Inkubator inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von PEI (Stammlösung 1 mg/mL). Dafür wurden $37,5 \mu\text{L}$ an den Rand des Röhrchens, oberhalb des Flüssigkeitsspiegels, pipettiert und anschließend durch Schwenken mit der Zellsuspension vermischt. Dieses Vorgehen soll verhindern, dass Zellen kurzzeitig mit einer sehr hohen Konzentration des toxischen PEIs in Kontakt kommen.

B.3.2.2 Zweischnittiges Protokoll

Bei dem zweischnittigen Protokoll wurden pro Transfektionsansatz $37,5 \mu\text{g}$ PEI und Plasmid-DNA entsprechend Tabelle B.3 in je $50 \mu\text{L}$ 150 mM NaCl-Lösung gegeben, miteinander vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser

Inkubationsschritt soll Einflüsse von außen, wie die negative Ladung von Zellen, auf die DNA-PEI-Komplexbildung minimieren. Anschließend wurde die DNA-PEI-Lösung tröpfchenweise unter Schwenken der Gefäßes zur Zellsuspension gegeben.

B.3.3 Zellanalyseverfahren

B.3.3.1 Durchflusszytometrie

Mithilfe eines Durchflusszytometers können chemische und physikalische Eigenschaften von Zellpopulationen oder Partikeln analysiert werden. Die zu untersuchenden Zellen oder Partikel werden mit einem Trägerfluid in das Durchflusszytometer eingebracht und dort in einzelne Tropfen unterteilt. Idealerweise enthält ein solcher Tropfen maximal eine Zelle oder einen Partikel, auf den ein Laser gerichtet ist. Anhand des Streulichts können Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Zelle oder des Partikels gemacht werden. Das Vorwärtstreulicht ermöglicht Aussagen über die Größe, das Seitwärtstreulicht über die Granularität. Über Fluoreszenzdioden können gleichzeitig verschiedene Fluoreszenzmarker angeregt werden und mithilfe von Filtern für unterschiedliche Wellenlängen Daten aufgenommen werden.

Die ermittelten Werte werden in Histogrammen und Dot-Plots dargestellt. Anhand der Werthäufungen in unterschiedlichen Bereichen ist es möglich, Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden. So können tote von lebenden Zellen differenziert oder verschiedene Zellarten aufgetrennt werden (siehe Abbildung B.3A)).

Mit einem sortierenden System lassen sich die Zellen zusätzlich nach vom Benutzer ausgewählten Eigenschaften (wie Fluoreszenz oder Zugehörigkeit zu einer bestimmten Teilpopulation) getrennt auffangen, anschließend separiert analysieren oder sogar weiter kultivieren. Die Aufteilung wird durch einen elektrostatischen Sortiermechanismus erreicht. Die abzutrennenden Zellen werden, nachdem sie die Durchflussmesszelle verlassen haben, durch eine Elektrode polarisiert und fallen anschließend durch ein elektrisches Feld, das die Separation von den restlichen, nicht polarisierten Zellen ermöglicht (siehe Abbildung B.3B). Der Begriff FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) wird häufig als Synonym für sortierende

Systeme genutzt, ist aber eigentlich ein Produktname der Firma Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland).

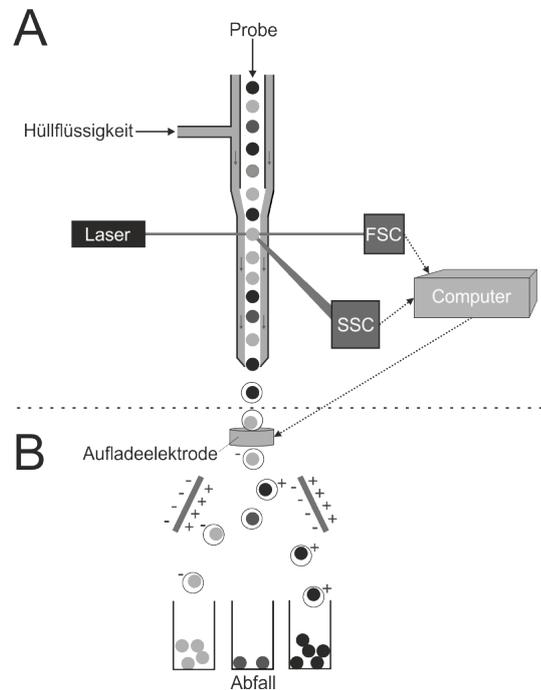


Abbildung B.3: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers. **A:** Einfaches Durchflusszytometer. Die Probe wird in einem Strom aus Hüllflüssigkeit zum Laser geleitet. Dort wird mit Photodioden das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht sowie emittierte Fluoreszenz detektiert und an eine Computereinheit weitergeleitet. **B:** Zusätzliche Einheit, die eine Sortierung der Zellen nach ihren Eigenschaften erlaubt. Anhand der zuvor detektierten Daten und den Einstellungen des Anwenders können die nur eine Zelle enthaltenen Tropfen durch eine Aufladelektrode polarisiert werden und fallen anschließend durch ein elektrisches Feld. Dabei werden sie beim Fall entsprechend ihrer Ladung abgelenkt und in unterschiedlichen Gefäßen aufgefangen. Angepasst aus [94, 95].

B.3.3.2 Probenvermessung

Die Zellprobe einer Kultivierung mit einem Volumen von 500 μL wurde mittels eines Zellsiebs (70 μm) gefiltert und in ein Rundbodenröhrchen überführt. Die Proben wurden anschließend mit dem BD FACSAria™ Fusion oder dem BD Accuri™ C6 vermessen.

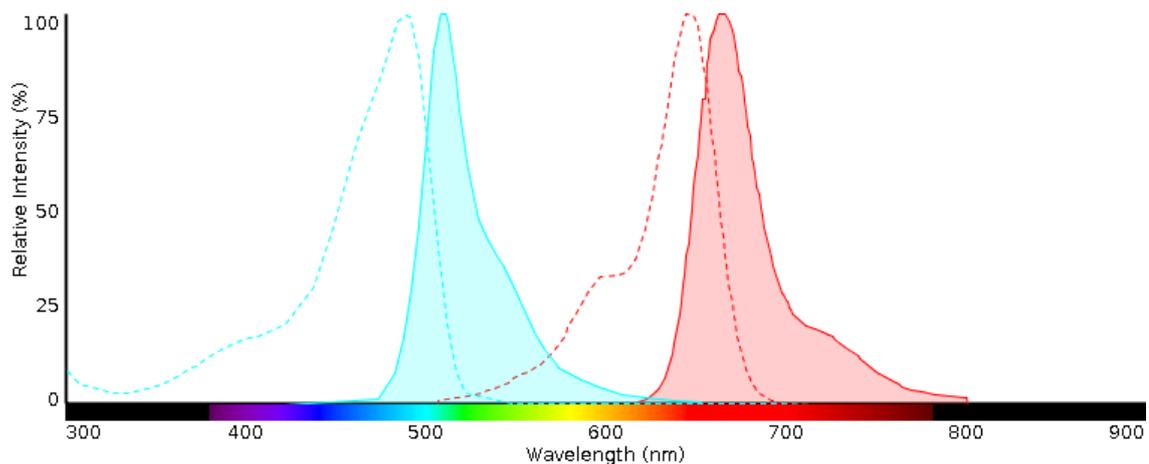


Abbildung B.4: Extinktions- und Emissionsspektren von eGFP (hellblau) und Cy5 (rot). Die durchgängigen Linien stellen die Emissionsspektren dar, während die gestrichelten Linien die Extinktionsspektren zeigen [96].

B.3.3.3 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der zu den Geräten gehörigen Software. Im Folgenden werden die genutzten Strategien und Methoden erläutert.

Gating

Ein wichtiger Aspekt der Auswertung ist das sogenannte Gating. Dabei werden Regionen markiert, in denen sich Populationen mit gleichen Eigenschaften wie beispielsweise Größe, Granularität oder Fluoreszenz befinden. Signale, die von Zellagglomeraten oder Zellebris stammen, und die Auswertung verfälschen würden, werden dadurch von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Für das erste *gate* wurde ein Dot-Plot betrachtet, in dem die Höhe des Vorwärts- gegen die Höhe des Seitwärtsstreuung aufgetragen wurde. Die Granularität der Zellen kann einen Hinweis auf die Zellviabilität geben und mittels Apoptose-Nekrose-Assays, die in den Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnte ein gut abgegrenzter Bereich lebender Zellen ermittelt und das erste *gate* gesetzt werden.

Double Discrimination (DD)

Um sicher zu stellen, dass ausschließlich einzelne Zellen gewertet werden, wird häufig außerdem die *Double Discrimination*-Methode angewendet. Der Ausschluss erfolgt in Dot-Plots, die die Breite gegen die Höhe des Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreuung des ersten *gates* zeigen. Doppelte Zellen haben zwar die gleiche Höhe wie einfache, weisen allerdings doppelte Flächen- und Breitenwerte auf. Durch

ein weiteres *Gating* werden diese Doubletten von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Die so ausgewählten Zellen geben die Viabilität_{FACS} wieder.

Bestimmung der Transfektionseffizienz

Die Transfektionseffizienz gibt den prozentualen Anteil derjenigen Zellen wieder, die lebend sind und das Fluoreszenzprotein GFP produzieren. Der Vergleich zwischen transfizierten und nicht-transfizierten (Referenz-)Zellpopulationen ermöglicht es, eine Aussage über die Effizienz einer Transfektion machen zu können. Dafür werden zunächst mit den Daten der Referenzpopulation wie beschrieben *gates* gesetzt. Auf Grundlage der DD wird ein weiterer Dot-Plot erstellt, in dem die Höhe des Fluoreszenzsignals (FITC-H) gegen die Höhe des Seitwärtsstreulichts (SSC-H) aufgetragen wird, und ein weiteres *gate* um die komplette Zellpopulation gesetzt. Dieselben *gates* werden dann auf die Daten der transfizierten Zellen angewendet und so der Unterschied zwischen beiden Populationen dargestellt. Der Anteil Zellen, der sich im FITC-H/SSC-H-Dot-Plot außerhalb des zuvor gesetzten *gates* befindet, wird durch ein weiteres *gate* ermittelt und beschreibt die Transfektionseffizienz.

B.3.4 Mikroskopie

Die Zellproben der durchgeführten Kultivierungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop und teilweise mit einem konfokalen Lasermikroskop untersucht. Dafür wurden die Zellen optional fixiert (B.3.4.1) und der Zellkern mit DAPI angefärbt (B.3.4.2).

B.3.4.1 Zellfixierung

Wenn Zellproben nicht unmittelbar nach der Entnahme analysiert werden konnten, wurde mit einer Zellfixierung der aktuelle Zellzustand erhalten. Die Fixierung wurde mit einer 4%igen Formaldehyd-Lösung durchgeführt. Dafür wurden 1×10^6 Zellen in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 200 *ref* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1 mL PBS gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in der Fixierlösung resuspendiert. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und zweimaliger Zentrifugation wurde der

Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL PBS gewaschen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in einem geeigneten Volumen PBS resuspendiert und anschließend lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

B.3.4.2 Zellkernfärbung mit DAPI

Der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wird dafür genutzt, die DNA von Zellen anzufärben und so den Zellkern fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen. Der Farbstoff interkaliert in Adenosin/Thymin (AT)-Bereiche doppelsträngiger DNA und fluoresziert in dieser Verbindung bläulich, mit einem Emmisionsmaximum von 461 nm und einem Absorptionsmaximum von 358 nm. Bei den durchgeführten Transfektionsversuchen mit Cy5-markierter Plasmid-DNA hilft er dabei Rückschlüsse auf die Lokalisierung der Plasmide ziehen zu können. Für die Färbung wurden zunächst die DAPI-Stammlösung (500 µg/mL) mit dem DAPI-Färbepuffer auf eine Konzentration von 0,05 µg/mL verdünnt. Eine Probe mit fixierten Zellen wurde für 5 min bei 200 × g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 mL DAPI-Lösung resuspendiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in einem geeigneten Volumen PBS resuspendiert. Die Proben wurden lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

B.4 Proteinexpression und -aufreinigung in HEK-Zellen

Die für diese Arbeit durchgeführten Kultivierungen und Transfektionen mit suspensionsadaptierten HEK293-Zellen (MEXi-293E) wurden durch die Firma IBA GmbH (Göttingen, DE) realisiert.

B.4.1 Kultivierung

Die MEXi293E-Zellen wurden durchgehend in MEXi-Kulturmedium im Schüttelkolben kultiviert. Entsprechend der Herstellerangaben fanden die Kultivierungen

bei 37 °C, 5 % CO₂ und 125 rpm statt. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage subkultiviert, um die logarithmische Wachstumsphase mit 0,3 bis 3 × 10⁶ Zellen/mL aufrechtzuerhalten.

B.4.2 PEI-vermittelte transiente Transfektion

Die MEXi293E-Zellen wurden nach Herstellerangaben in vorgewärmtes MEXi-TM Transfektionsmedium mit einer Konzentration von 1,5 × 10⁶ Zellen/mL und bei einer Viabilität > 90 % überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit einer finalen Konzentration von 1,5 µg/mL direkt zu den Zellen gegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde PEI mit einer finalen Konzentration von 5,5 µg/mL hinzugegeben und die Suspension für 3,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit MEXi-CM Kulturmedium 1:2 verdünnt und weiter kultiviert. Nach vier Tagen wurde die Kultivierung beendet.

B.4.3 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Ein Zellpellet wurde in Aufschlusspuffer (A.4.1) resuspendiert, wobei das Volumen entsprechend des vorherigen Volumens gewählt wurde. Die Probe wurde anschließend auf Eis in drei Zyklen mit Ultraschall (Dauer: 20 sec, Amplitude: 30 %) aufgeschlossen. Zwischen den Zyklen wurde die Probe für mindestens 20 sec abgekühlt, um eine Proteindenaturierung durch Hitze zu vermeiden.

B.5 Proteinanalytik

B.5.1 Allgemeine Methoden

B.5.1.1 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der verschiedenen Proteine einer Probe wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Das im Probenpuffer vorhandene Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an die Proteine

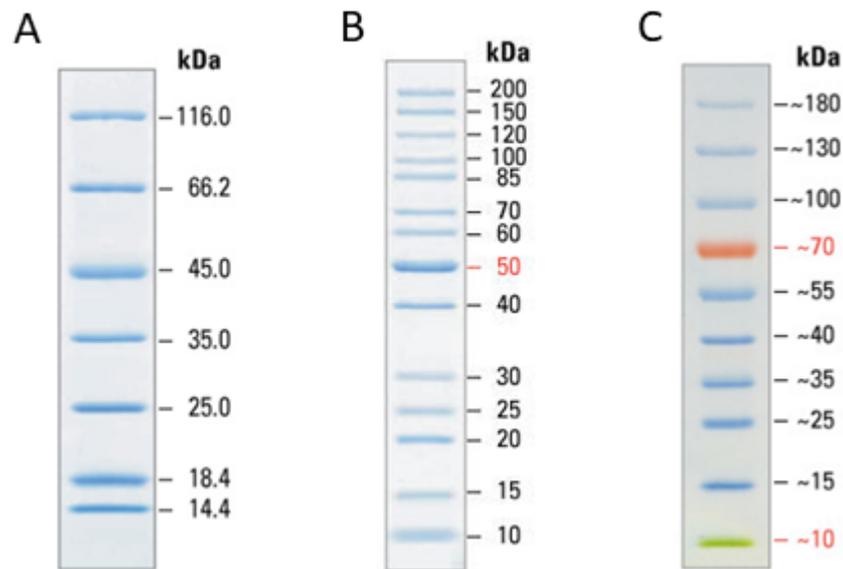


Abbildung B.5: Eingesetzte Protein-Größenstandards für die SDS-PAGE. A: Pierce™ Unstained Protein MW Marker (#26610, 14-116 kDa), B: PageRuler™ Unstained Protein Ladder (#26614, 10-200 kDa), C: PageRuler™ Stained Protein Ladder (#26616, 10-170 kDa).

an und schirmt deren Eigenladung ab, sodass alle Proteine die gleiche negative Ladungsverteilung aufweisen. Durch Aufkochen der Probe werden die Proteine denaturiert und beim Einsatz eines reduzierenden Pufferbestandteils wie β -Mercaptoethanol auch die vorhandenen Disulfidbrückenbindungen aufgelöst. Die Probe wird auf das Gel aufgetragen und ein elektrisches Feld angelegt. Im oberen Teil des Gels, dem weitmaschigeren Sammelgel, werden die Proteine bei ihrer Wanderung Richtung Anode zunächst durch das sich langsam bewegende Glycin gesammelt und bilden damit eine scharfe Bande. Die Auftrennung erfolgt dann im engmaschigeren Trenngel mit einem höheren pH-Wert. Aufgrund der pH-Änderung wird Glycin zum Glycinat-Anion, bewegt sich nun schneller durch das Gel und lässt die Proteine hinter sich. Entsprechend des Molekulargewichts werden nun die Proteine aufgetrennt, wobei sich kleinere Moleküle schneller durch die Poren des Gels Richtung Anode bewegen.

Die Gele wurden entsprechend der Herstellerangaben mit dem Mini-PROTEAN® Tetra Handcast System und den Gelzusammensetzungen aus A.4.3 hergestellt und direkt verwendet oder bei 4 °C in feuchte Tücher eingeschlagen für mehrere Tage gelagert. Die für die SDS-PAGE vorgesehenen Proben wurden mit dem gleichen Volumen 2x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurden sie in die Taschen des Gel pipettiert (je 7 μ L).

Außerdem wurde ein molekularer Größenstandard (je 3 μL , siehe Abbildung B.5) aufgetragen. Die Gelektrophorese wurde zunächst für 15 min mit 100 V durchgeführt; in dieser Zeit durchlaufen die Proben das Sammelgel. Anschließend wurde die Spannung auf 180 V erhöht und die Elektrophorese beendet, sobald die blaue Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Im Anschluss wurde eine Coomassie- (B.5.1.2) oder Silberfärbung (B.5.1.3) durchgeführt oder die Proteinbanden für einen Western Blot (B.5.1.4) auf eine Membran übertragen.

B.5.1.2 Coomassie-Färbung

Eine Möglichkeit die Proteine sichtbar zu machen, ist die Färbung mit dem Farbstoff Coomassie. Dafür wurde das Gel nach der Beendigung der SDS-PAGE mit ddH₂O gespült und dann über Nacht in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Am darauffolgenden Tag wurde die Lösung entsorgt und der Gelhintergrund in mehrfachen Schritten durch Schwenken in ddH₂O entfärbt. Das Gel konnte anschließend mithilfe eines Flachbettscanners dokumentiert werden.

B.5.1.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung stellt eine sehr sensitive Methode der Proteinfärbung dar. Hierbei binden Silberionen an den Seitenketten der Proteine und werden anschließend zu elementarem Silber reduziert, wodurch die Banden sichtbar werden. Das Gel wurde zunächst für 20 min in der Fixierlösung geschwenkt und anschließend zweimal kurz mit ddH₂O gewaschen. Es wurde dann für 2,5 min in *Farmers Reducer* inkubiert und bis zur kompletten Entfärbung in ddH₂O geschwenkt. Die darauffolgende Inkubation in Silberlösung fand für 30 min statt, anschließend wurde das Gel erneut kurz (30 sec) in ddH₂O gewaschen. Das Gel wurde dann in Na₂CO₃-Lösung gelegt und die Entwicklung der Banden mit Formaldehyd gestartet. Die Färbung wurde mit Essigsäurelösung gestoppt, sobald die Banden sichtbar wurden. Das Gel konnte dann mithilfe eines Flachbettscanners dokumentiert werden.

B.5.1.4 Western Blot mit Immunodetektion

Ein Western Blot ermöglicht die genaue Detektion von bestimmten Proteinen mittels spezifischer Antikörper. Dazu werden die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine zunächst auf eine PVDF- oder eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierfür wurde die Membran sowie zwei Blotpapiere entsprechend der Gelgröße zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde 5 min in reinem Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer für 15 min inkubiert. Das Gel wurde ebenfalls kurz in Transferpuffer gelegt, ebenso wie die Blotpapiere. Für den Blotvorgang wurden Blotpapier, Membran, Gel und Blotpapier übereinander geschichtet in die Blotapparatur gelegt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran fand bei 15 V über 50 min statt. Anschließend wurden die unbesetzten Stellen auf der Membran entweder über Nacht bei 4 °C oder bei Raumtemperatur über 2 h mit den Proteinen aus dem Block-Puffer (A.4) besetzt. Die Membran wurde dann dreimal für 5–10 min mit PBST (A.4) gewaschen. Für die spezifische Antikörperfärbung wurde die Membran in ein 50-mL-Falkon gelegt und mit einer Lösung aus 4 µL des entsprechenden primären Antikörpers (A.6.1) und 4 mL einer 1:1-Lösung von PBST und Block-Puffer für eine Stunde auf einem Rollmischer inkubiert. Dann wurde die Membran dreimal mit PBST gewaschen. Die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (A.6.1) in 4 mL PBST-Block-Lösung (1:1) wurde erfolgte erneut auf dem Rollmischer. Der Waschschrift mit PBST wurde wiederum dreimal für 5-10 min wiederholt. Entsprechend des eingesetzten sekundären Antikörpers konnten die Banden anschließend mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) bzw. mittels Elektrochemolumineszenz (ECL) nachgewiesen werden. Für den Nachweis mit TMB wurde die Membran mit 1 mL TMB gespült, bis Banden sichtbar wurden. Anschließend wurde die Membran durch Druckluft getrocknet und mit einem Flachbettscanner dokumentiert. Für die ECL-Reaktion wurden die Lösungen A und B in einem Mischverhältnis von 1:2 auf den Blot gegeben und konnten nach kurzer Zeit mit dem Imager detektiert werden.

B.5.2 Proteinisolierung

B.5.2.1 TCA-Fällung

Um Proteine aus dem Kulturüberstand und dem von CHO-Zellen zu fällen, wurde eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Dadurch sollten auch kleine Konzentrationen des Zielprotein TGF- β 3 wiedergefunden werden können. Eine Probe mit einem Volumen von 1 mL wurde mit 10 μ L Natriumdeoxycholat (Stammlösung: 20 mg/mL) versetzt und 10 min inkubiert. Anschließend wurden 100 μ L TCA (Stammlösung: 1 g/mL) hinzugegeben und für 2 h auf Eis inkubiert. Dann wurde eine Zentrifugation mit 13,3 rpm für 20 min bei 8 °C durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit eiskaltem 80% Aceton (v/v) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei 37 °C getrocknet. Es folgte eine Resuspension in 25 μ L PBS. Die Proben wurden dann über eine SDS-PAGE analysiert oder für die weitere Analyse eingefroren.

B.5.2.2 Proteinaufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Das Zielprotein TrxA-TGF- β 3 enthält einen Hexa-Polyhistidin-Tag (A.5.2.2) und kann damit mittels einer Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Histidin-Reste bilden mit Nickel Chelate aus und bleiben dadurch an der Säule hängen. Die Bindung ist sehr spezifisch und reversibel. Die Elution erfolgt über eine Konkurrenzreaktion mit Imidazol, welches an das Nickel bindet und damit die Proteine verdrängt.

Die Proteinaufreinigung wurde mit HisPurTM Ni-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Zentrifugationssäule entsprechend den Angaben des Herstellers unter nativen Bedingungen (A.4.1) durchgeführt.

B.5.2.3 Dialyse

Eine Dialyse wird eingesetzt, um den Puffer bzw. Pufferbestandteile, wie Ionen oder kleine Moleküle, einer (Protein-)Probe auszutauschen. Dabei wird der Effekt der Osmose genutzt. Die Elutionsproben eines Chromatographie-Durchlaufs (B.5.2.2) wurden vereint und ein Volumen von 1 mL in einen zuvor mit Wasser

und PBS gespülten Dialyseschlauch (*cutoff* 3 kDa) gefüllt. Anschließend wurde der Schlauch für drei Tage in ein deutlich größeres Volumen PBS (1 L) gelegt und bei 4 °C unter leichtem Rühren des PBSs darin geschwenkt. Im Anschluss wurde die Proteinprobe in ein Reaktionsgefäß überführt und mittels SDS-PAGE (B.5.1.1) analysiert.

B.5.2.4 Ultrafiltration

Die Methode der Ultrafiltration ermöglicht die Aufkonzentrierung sowie eine Umpufferung einer Lösung. Die Probe wird in eine Ultrafiltrationseinheit pipettiert und zentrifugiert. Dabei hält eine Membran Moleküle oberhalb einer bestimmten Porengröße davon ab, in den unteren Teil der Ultrafiltrationseinheit zu gelangen und es findet eine Aufkonzentrierung statt. Wird im Wechsel ein neuer Puffer hinzugefügt und erneut zentrifugiert, kann eine Umpufferung erreicht werden.

Die Elutionsproben eines Chromatographie-Durchlaufs (B.5.2.2) wurden vereint und ein Volumen von 500 µL in die Ultrafiltrationseinheit Vivaspin™ 500 (Sartorius GmbH) pipettiert. Es erfolgte eine Zentrifugation (2 min, 700 × g). Anschließend wurden der Rückstand sowie das Filtrat in Reaktionsgefäße überführt und mittels SDS-PAGE (B.5.1.1) analysiert.

B.5.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

B.5.3.1 Densitometrische Konzentrationsbestimmung

Um die Proteinkonzentration einer Probe densitometrisch zu bestimmen, wurde eine BSA-Standardreihe mit Konzentrationen zwischen 25 und 500 µg/mL ange-setzt. In die Taschen eines SDS-Gels wurden Standardreihe und zu untersuchende Proben aufgetragen, die Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden anschließend mit Coomassie angefärbt. Das eingescannte Gel wurde dann mit dem Programm GelAnalyzer analysiert. Die Bandenintensität des BSA-Standards wurde festgestellt und eine Kalibrationskurve erstellt. Anhand dieser wurde dann die Konzentration der zu untersuchenden Proben bestimmt, indem die Bandenintensität des Zielproteins bestimmt wurde.

Mit dieser Methode ist es außerdem möglich, den prozentualen Anteil eines Proteins in einer Probe zu bestimmen. Dafür wird die Intensität der Zielprotein-Bande im Verhältnis zur kompletten Probenspur bestimmt.

B.5.3.2 Bradford-Assay

Das Bradford-Assay ermöglicht die Konzentrationsbestimmung eines Proteins mittels des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250. Sobald der Farbstoff eine Bindung mit einem Protein eingeht, verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 470 auf 595 nm, bedingt durch den Übergang von der kationischen in die anionische Form.

In eine 96-well-Platte werden je 10 μL Probe bzw. verschiedene Konzentrationen eines BSA-Standards pipettiert. Anschließend werden 300 μL Bradford-Lösung hinzugegeben, danach wird die Platte sofort in ein Photometer gestellt und dort für 2 min schüttelnd und dann 10 min ruhend inkubiert. Dann wird die Absorption gemessen.

B.6 Statistische Versuchsplanung

Mithilfe der statistischen Versuchsplanung (*Design of Experiments*, DoE) ist es möglich, den Einfluss von mehreren Faktoren auf einen Bioprozess gleichzeitig zu ermitteln. Soll der Einfluss von drei Faktoren auf das Versuchsergebnis untersucht werden, wird ein dreidimensionaler Raum wie ein Würfel aufgespannt. Als Grundlage für die Versuche können unterschiedliche Designs ausgewählt werden, anhand derer die Versuche geplant und durchgeführt werden. Es wird zwischen teilfaktoriellen, vollfaktoriellen und zentral zusammengesetzte Versuchsdesigns unterschieden. Das in dieser Arbeit verwendete Design ist das Box-Behnken-Modell, neben den drei Zentralversuchen im Mittelpunkt des Würfels jeweils einen Versuch an den Verbindungslinien zwischen den Würfecken vorsieht. Die Zentralversuche stellen die Reproduzierbarkeit dar und werden zur statistischen Absicherung durchgeführt.

B.6.1 Rohdatenanalyse

Die Analyse der Versuche setzt eine Normalverteilung der Ergebnisse voraus. Diese kann mithilfe von Histogrammen überprüft werden und gegebenenfalls mittels Transformation erreicht werden [64].

B.6.2 Regressionsanalyse

Um die linearen Zusammenhänge der einzelnen Faktoren zu ermitteln und ein Modell aufzustellen, wird eine multiple lineare Regression (MLR) mit Gleichung B.3 genutzt.

$$y_m = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i * x_i + \sum_{1 \leq i < j}^n b_{ij} * x_i * x_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} * x_i^2 + \epsilon \quad (\text{B.3})$$

- y_m berechnete Systemantwort
- b_0 Grundsystemantwort, Offset
- b_i interpolierter Regressionsfaktor zu Einflussgröße i
- b_{ij} interpolierter Interaktionsregressionsfaktor zu Einflussgrößen i und j
- b_{ii} interpolierter quadratischer Regressionsfaktor zu Einflussgröße i
- x_i Einflussgröße i
- x_j Einflussgröße j
- ϵ unbekannter Fehler, Differenz zum realen Zustand

In der berechneten Signalantwort werden nur Faktoren berücksichtigt, die signifikant sind. Mithilfe der Varianzanalyse wird untersucht, ob der Vertrauensbereich des Faktors größer ist als der Einfluss des Faktors selber. Ist dies der Fall, wird der Faktor ausgeschlossen. Das Entfernen eines Faktors führt zu einer veränderten Verteilung der Vertrauensbereiche der übrigen Faktoren, daher wird die Eliminierung nach einer bestimmten Reihenfolge durchgeführt. Zunächst werden die quadratischen b_{ii} oder Interaktionsfaktoren b_{ij} entfernt. Erst dann werden die Faktoren b_i oder b_j betrachtet und bei Bedarf ausgeschlossen. Abbildung B.6 zeigt ein beispielhaftes Koeffizienten-Diagramm. Bei der Varianzanalyse würde zunächst der quadratische Faktor b_{ii} eliminiert werden. Der Interaktionsregressionsfaktor

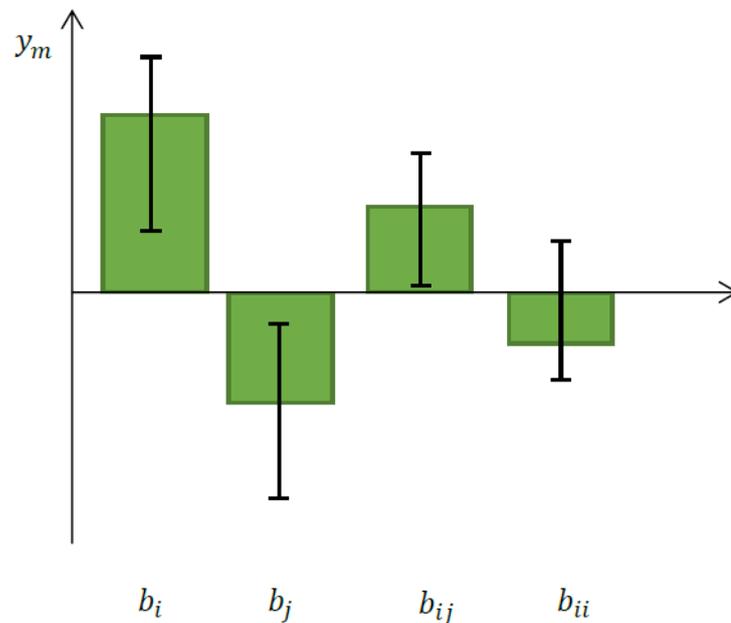


Abbildung B.6: Beispielhaftes Koeffizienten-Diagramm einer Interaktionsmodells zur Varianzanalyse [97].

b_{ij} könnte durch die daraus folgende Änderung der Varianzen weiterhin im Modell berücksichtigt werden.

B.6.3 Güteprüfung

Zur Einschätzung der Güte des berechneten Modells werden verschiedene Größe herangezogen.

- **Bestimmtheitsmaß R^2**

Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt den Grad der Übereinstimmung von Regressionsmodell und den Rohdaten wieder und sollte für eine minimale Anpassung einen Wert von $>0,5$ in einem Bereich von 0 bis 1 liegen. Bei einem perfekt angepassten Modell ergibt sich ein Wert von 1.

- **Vorhersagegüte Q^2**

Die Vorhersagegüte Q^2 ermöglicht eine Aussage darüber, wie gut das Regressionsmodell zukünftige Experimente abbilden kann. Q^2 kann einen Wert

im Bereich von $-\infty$ bis 1 haben und sollte größer als 0,1 für ein signifikantes und größer als 0,5 für ein gutes Modell sein.

- **Differenz zwischen R^2 und Q^2**

Die Differenz zwischen R^2 und Q^2 sollte für ein gutes Modell kleiner als 0,3 sein.

- **Modellvalidität MV**

Die Modellvalidität beschreibt das Maß, in dem das Regressionsmodell für die Beschreibung des Systemverhaltens geeignet ist. Der Wert kann zwischen $-\infty$ und 1 liegen und sollte größer als 0,25 sein. Wenn die Empfindlichkeit im Test sehr hoch war oder die Abweichungen bei den Zentralversuchen sehr gering sind, kann MV sehr klein sein.

- **Reproduzierbarkeit RP**

Mithilfe der Reproduzierbarkeit RP lässt eine Aussage über die Wiederholbarkeit von Experimenten machen. Dabei sollte der Wert in einem Bereich von 0 bis 1 bei mindestens 0,5 liegen.

C Ergänzende Versuchsergebnisse

C.1 Statistische Versuchsplanung

Tabelle C.1: Mit MODDE® aufgestellter Versuchsplan für die Optimierung der TGF- β 3-Ausbeute bei Kultivierungen in *E. coli*.

Versuchsnr.	Kultivierungs- temperatur [°C]	IPTG- Konzentration [mM]	Induktions- OD ₆₀₀
N1	20	0,1	0,6
N2	37	0,1	0,6
N3	20	1	0,6
N4	37	1	0,6
N5	20	0,55	0,2
N6	37	0,55	0,2
N7	20	0,55	1
N8	37	0,55	1
N9	28,5	0,1	0,2
N10	28,5	1	0,2
N11	28,5	0,1	1
N12	28,5	1	1
N13	28,5	0,55	0,6
N14	28,5	0,55	0,6
N15	28,5	0,55	0,6

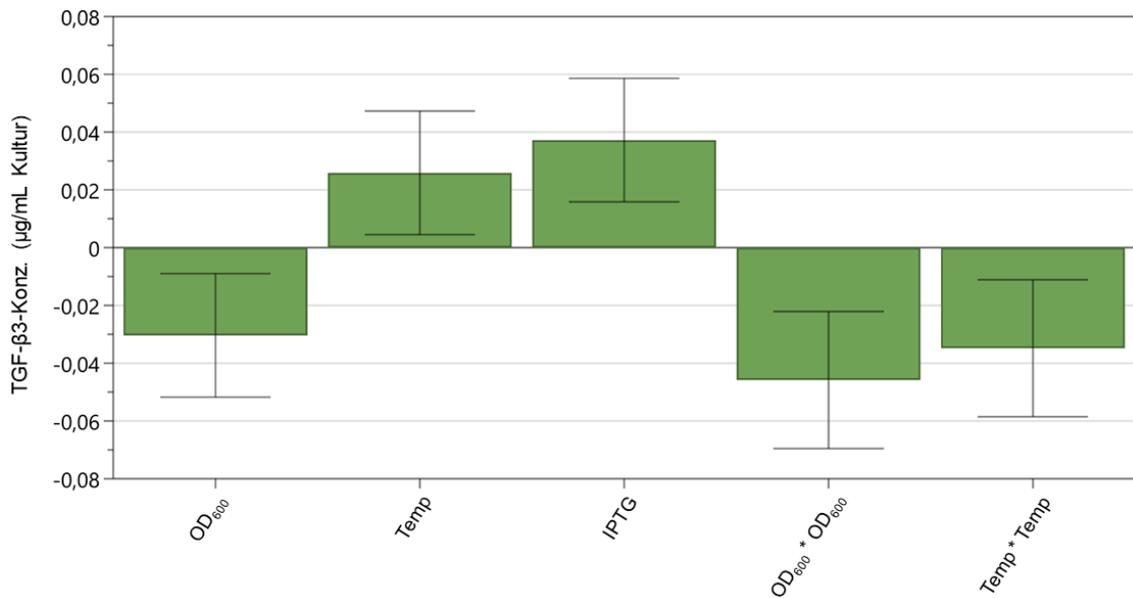


Abbildung C.1: Koeffizientendiagramm zur Regressionsanalyse mit bereits angepasstem Modell. $N = 15$, Freiheitsgrad $DF = 9$, $R^2 = 0,872$, $Q^2 = 0,623$, Reststandardabweichung $RSD = 0,03537$, Konfidenzniveau = 0,95.

C.2 Zellaufschluss von *E. coli* per Ultraschall

C.2.1 Korrektur des systematischen Fehlers

In Abbildung C.2 sind die Ergebnisse des Zellaufschlusses mit verschiedenen Puffern dargestellt. Der Vergleich der Anteile des löslichen TrxA-TGF- β 3 nach dem Zellaufschluss mit Puffer Nr. 1 zeigt, dass sich der erste Wert mit 23 % (Abbildung C.2A, 1) deutlich von den anderen beiden mit 72 % ($\sigma = 7\%$) (Abbildung C.2B, 1) unterscheidet. Die ermittelten Anteile nach dem Zellaufschluss mit BugBuster[®] liegen mit 55 und 62 % ($\sigma = 5\%$) beide im gleichen Bereich. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass nicht die Analyse mittels SDS-PAGE sondern ein systematischer Fehler bei der Durchführung des Zellaufschlusses mit Ultraschall der Grund für die deutlich unterschiedlichen Werte ist. Daraufhin wurde aus den oben genannten Werten der Korrekturfaktor F_{korr} berechnet. Dieser stellt das Verhältnis zwischen den zuletzt durchgeführten und der ersten Bestimmung dar und hat eine Größe von 3,149.

Die Werte der löslichen Anteile aus Abbildung C.2A wurden mit F_{korr} multipliziert und die Werte der unlöslichen Anteile entsprechend angepasst. Das Verhältnis der

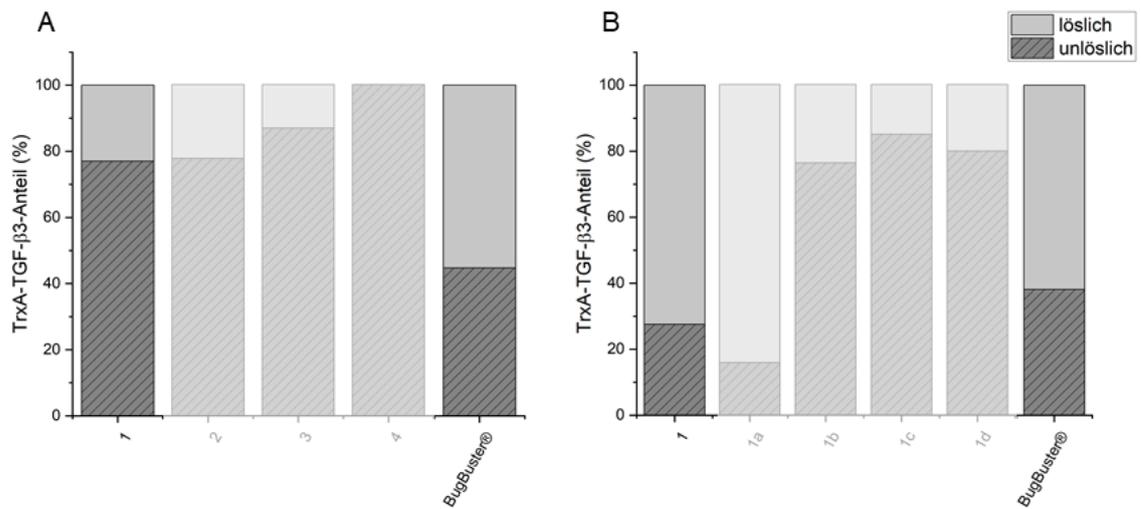


Abbildung C.2: Vergleich der ermittelten löslichen und unlöslichen TrxA-TGF-β3-Anteile nach dem Zellaufschluss in verschiedenen Puffern mit Ultraschall und BugBuster®. A: siehe Tabelle B.1 und B: siehe Tabelle B.2).

ermittelten Werte aus Abbildung C.2A zueinander wurde damit nicht beeinflusst. Die Ergebnisse der Korrektur sind in Abbildung 3.13 aufgetragen.

C.2.2 Zellaufschluss mit Varianten von Puffer 1

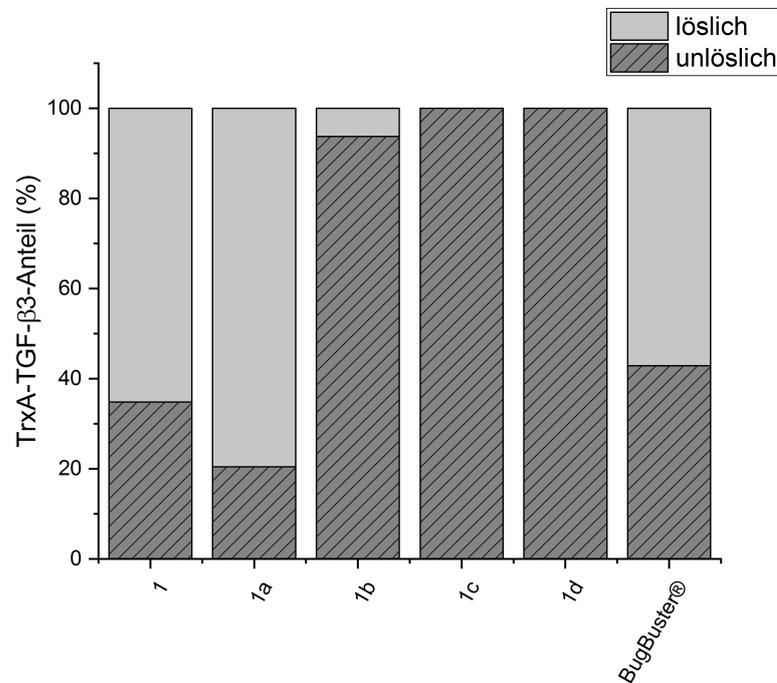


Abbildung C.3: Vergleich des TrxA-TGF- β 3-Anteils in löslicher und unlöslicher Fraktion nach dem Ultraschall-Aufschluss in Puffer Nr. 1 mit verschiedenen Zusammensetzungen (siehe Tabelle B.2), Wiederholung.

C.3 Solubilisierung von IBs mittels Harnstoff

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Resolubilisierung in Harnstoff-haltigen Puffern bei Raumtemperatur sowie in Kombination mit einem Einfrier-Auftau-Zyklus beschrieben. Als Solubilisierungsmethode wurden Einfrier-Auftau-Zyklen nach Qi *et al.* getestet [66]. Die nach den Kultivierungen für weitere Analysen gelagerten Pellets wurden mit dem Proteinextraktionsreagent BugBuster® aufgeschlossen. Die nicht-lösliche Fraktion wurde nach einer Zentrifugation in dem Harnstoff-haltigen PBS-Puffer resuspendiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht eingefroren. Das Auftauen fand bei Raumtemperatur statt. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert und die Fraktionen elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abbildung C.4). Eine Kontrollprobe wurde statt mit einem Solubilisierungspuffer mit Wasser versetzt.

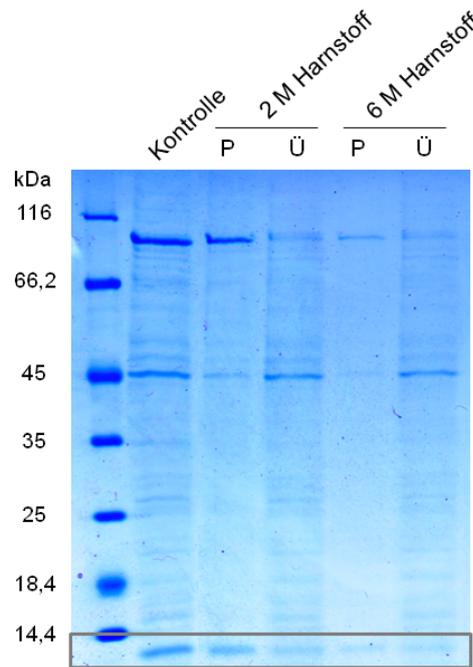


Abbildung C.4: Gel einer SDS-PAGE zur Überprüfung der Solubilisierungsmethode „Einfrieren und Auftauen“ in Harnstoff-haltigem Puffer. Die Proben wurden nach dem Zellaufschluss mit BugBuster® im entsprechenden Puffer resuspendiert, eingefroren und aufgetaut. Aufgetragen sind die nicht-löslichen Fraktionen (P), die löslichen Fraktionen (Ü) sowie das nicht-solubilierte, in Wasser resuspendierte Pellet als Kontrolle; Coomassie-Färbung.

In der löslichen Fraktion der mit 2 M Harnstoff versetztem Puffer ist eine leichte Bande auf der erwarteten Höhe zu erkennen. Der größte Teil des TGF- β 3 ist allerdings in der nicht-löslichen Fraktion verblieben. Die Proben mit dem Einsatz von 6 M Harnstoff ist generell in beiden Spuren sehr schwach ausgefallen. Allerdings stimmen die Stärken der Banden der löslichen Fraktion im höheren kDa-Bereich mit denen der entsprechenden Probe mit 2 M Harnstoff überein. Daher kann davon ausgegangen werden, dass nur die nicht-lösliche Probe bei der Vorbereitung fehlerhaft behandelt wurde. Entsprechend ist die Schlussfolgerung zu ziehen, dass auch der Einsatz einer höheren Harnstoffkonzentration in einem Einfrier-Auftau-Zyklus das Zielprotein nicht hinreichend solubilisieren kann und die Methode in dieser Kombination nicht zum erwünschten Ergebnis führt.

Literaturverzeichnis

- [1] Mamta Shah, David M. Foreman, and Mark W. Ferguson. Neutralisation of TGF-b1 and TGF-b2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of cell science*, 108 (Pt 3:985–1002, 1995.
- [2] Anita B. Roberts, Mario A. Anzano, Lois C. Lamb, Joseph M. Smith, and Michael B. Sporn. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(9):5339–5343, 1981.
- [3] Peter D. Sun and David R. Davies. The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annual review of biophysics and*, 1995.
- [4] Alexander Weiss and Liliana Attisano. The TGFbeta Superfamily Signaling Pathway, 2013.
- [5] Sonia B. Jakowlew, Pamela J. Dillard, Michael B. Sporn, and Anita B. Roberts. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor beta 4 from chicken embryo chondrocytes. *Molecular Endocrinology*, 2(12):1186–1195, 1988.
- [6] Jaroslava Halper, David W. Burt, and Michael N. Romanov. On Reassessment of the Chicken TGFB4 Gene as TGFB1. *Growth Factors*, 22(2):121–122, 2004.
- [7] Paturu Kondaiah, Mark J. Sands, Joseph M. Smith, Andy Fields, Anita B. Roberts, Michael B. Sporn, and Douglas A. Melton. Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem*, 265(2):1089–1093, 1990.

- [8] Rik Derynck, Patricia B. Lindquist, Angela Lee, Duanzhi Wen, Joseph Tamm, Jeannette L. Graycar, Lucy Rhee, Anthony J. Mason, Duncan A. Miller, Robert J. Coffey, Harold L. Moses, and Ellson Y. Chen. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *The EMBO journal*, 7(12):3737–43, 1988.
- [9] R J Coffey, L J Kost, R M Lyons, H L Moses, and N F LaRusso. Hepatic processing of transforming growth factor β in the rat: Uptake, metabolism, and biliary excretion. *Journal of Clinical Investigation*, 80(3):750–757, 1987.
- [10] Lalage M. Wakefield, Thomas S. Winokur, Robin S. Hollands, Karen Christopherson, Arthur D. Levinson, and Michael B. Sporn. Recombinant latent transforming growth factor β 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor β 1, and a different tissue distribution. *Journal of Clinical Investigation*, 86(6):1976–1984, 1990.
- [11] K. Miyazono, A. Olofsson, P. Colosetti, and C. H. Heldin. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *The EMBO Journal*, 10(5):1091–1101, 1991.
- [12] Katri Koli, Juha Saharinen, Marko Hyytiäinen, Carita Penttinen, and Jorma Keski-Oja. Latency, activation, and binding proteins of TGF- β , 2001.
- [13] Estabraq Abdulkarim. *Optimierung und Anwendung von Strategien zur Herstellung von TGF- β 1 in eukaryotischen Zellen*. PhD thesis, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2014.
- [14] Judith Murray-Rust, Neil Q. McDonald, Tom L. Blundell, Markus Hosang, Christian Oefner, Fritz Winkler, and Ralph A. Bradshaw. Topological similarities in TGF- β 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure*, 1(2):153–159, 1993.
- [15] Jeffrey L. Wrana, Liliana Attisano, Rotrand Wieser, Francesc Ventura, and Joan Massague. Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*, 370(6488):341–347, 1994.
- [16] Matt K. Lee, Cécile Pardoux, Marie C Hall, Pierre S Lee, David Warburton, Jing Qing, Susan M Smith, and Rik Derynck. TGF- β activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO Journal*, 26(17):3957–3967, 2007.

-
- [17] Malcolm Lyon, Graham Rushton, and John T. Gallagher. The interaction of the transforming growth factor- β s with heparin/heparan sulfate is isoform-specific. *Journal of Biological Chemistry*, 272(29):18000–18006, 1997.
- [18] Peer R. E. Mittl, John P. Priestle, David A. Cox, Gary McMaster, Nico Cerletti, and Markus G. Grütter. The crystal structure of TGF- β 3 and comparison to TGF- β 2: Implications for receptor binding. *Protein Science*, 5(7):1261–1271, 1996.
- [19] Balaji Bandyopadhyay, Jianhua Fan, Shengxi Guan, Yong Li, Mei Chen, David T Woodley, and Wei Li. A "traffic control" role for TGF β 3: Orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healing. *Journal of Cell Biology*, 172(7):1093–1105, 2006.
- [20] Thomson Reuters plc. Renovo's anti-scarring product fails; shares plunge, 2011.
- [21] Aida M. Bertoli-Avella, Elisabeth Gillis, Hiroko Morisaki, Judith M. A. Verhagen, Bianca M. De Graaf, Gerarda Van De Beek, Elena Gallo, Boudewijn P. T. Kruithof, Hanka Venselaar, Loretha A. Myers, Steven Laga, Alexander J. Doyle, Gretchen Oswald, Gert W. A. Van Cappellen, Itaru Yamanaka, Robert M. Van Der Helm, Berna Beverloo, Annelies De Klein, Luba Pardo, Martin Lammens, Christina Evers, Koenraad Devriendt, Michiel Dumoulein, Janneke Timmermans, Hennie T. Bruggenwirth, Frans Verheijen, Inez Rodrigus, Gareth Baynam, Marlies Kempers, Johan Saenen, Emeline M. Van Craenenbroeck, Kenji Minatoya, Ritsu Matsukawa, Takuro Tsukube, Noriaki Kubo, Robert Hofstra, Marie Jose Goumans, Jos A. Bekkers, Jolien W. Roos-Hesselink, Ingrid M. B. H. Van De Laar, Harry C. Dietz, Lut Van Laer, Takayuki Morisaki, Marja W. Wessels, and Bart L. Loeys. Mutations in a TGF- β ligand, TGFB3, cause syndromic aortic aneurysms and dissections. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(13):1324–1336, 2015.
- [22] Lilla M. Farkas, Nicole Dünker, Eleni Roussa, Klaus Unsicker, and Kerstin Krieglstein. Transforming growth factor-beta(s) are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(12):5178–86, 2003.

- [23] Eleni Roussa, Michael Wiehle, Nicole Dünker, Steffen Becker-Katins, Oliver Oehlke, and Kerstin Krieglstein. Transforming Growth Factor β Is Required for Differentiation of Mouse Mesencephalic Progenitors into Dopaminergic Neurons In Vitro and In Vivo: Ectopic Induction in Dorsal Mesencephalon. *Stem Cells*, 24(9):2120–2129, 2006.
- [24] Marek Drożdżik, Maciej Kaczmarek, Damian Malinowski, Urszula Broś, Anna Kazienko, Rafał Kurzawa, and Mateusz Kurzawski. TGF β 3 (TGFB3) polymorphism is associated with male infertility. *Scientific Reports*, 5(1):17151, 2015.
- [25] Rosario Rullo, Fernando Gombos, Franca Ferraraccio, Antonio Farina, Daniela Morano, Vincenzo M. Festa, Luigi Guida, Marcella Martinelli, Luca Scapoli, Furio Pezzetti, and Francesco Carinci. TGF β 3 expression in non-syndromic orofacial clefts. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 70(10):1759–1764, 2006.
- [26] A. Toom, A. Arend, D. Gunnarsson, R. Ulfsparré, S. Suutre, T. Haviko, and G. Selstam. Bone Formation Zones in Heterotopic Ossifications: Histologic Findings and Increased Expression of Bone Morphogenetic Protein 2 and Transforming Growth Factors beta2 and beta3. *Calcified tissue international*, 80(4):259–67, 2007.
- [27] Roland M. Klar, Raquel Duarte, Therese Dix-Peek, and Ugo Ripamonti. The induction of bone formation by the recombinant human transforming growth factor- β 3. *Biomaterials*, 35(9):2773–2788, 2014.
- [28] Nick L. Ocleston, Sharon O’Kane, Hugh G. Lavery, Mark Cooper, David Fairlamb, Tracey Mason, Jim A. Bush, and Mark W. J. Ferguson. Discovery and development of avotermin (recombinant human transforming growth factor beta 3): A new class of prophylactic therapeutic for the improvement of scarring. *Wound Repair Regen.*, Sep;19(Suppl 1):38–48, 2011.
- [29] Eduardo K. Moiola, Paul A. Clark, D. Rick Sumner, and Jeremy J. Mao. Autologous stem cell regeneration in craniosynostosis. *Bone*, 42(2):332–340, 2008.
- [30] Kun Na, Sungwon Kim, Dae Gyun Woo, Bo Kyung Sun, Han Na Yang, Hyung Min Chung, and Keun Hong Park. Synergistic effect of TGF β -3 on chondrogenic differentiation of rabbit chondrocytes in thermo-reversible

- hydrogel constructs blended with hyaluronic acid by in vivo test. *Journal of Biotechnology*, 128(2):412–422, 2007.
- [31] Ulrich Reinhart Goessler, Peter Bugert, Karen Bieback, Moritz Deml, Haneen Sadick, Karl Hormann, and Frank Riedel. In-vitro analysis of the expression of TGFbeta -superfamily-members during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes during dedifferentiation in cell culture. *Cellular & molecular biology letters*, 10(2):345–62, 2005.
- [32] J. H. Tjio and Theodore T. Puck. Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *The Journal of experimental medicine*, 108(2):259–68, 1958.
- [33] Philip Thomas and Trevor G. Smart. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51(3 SPEC. ISS.):187–200, 2005.
- [34] Florian M Wurm. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11):1393–1398, 2004.
- [35] Richard M. Mortensen and Robert E. Kingston. Selection of transfected mammalian cells. In *Current Protocols in Molecular Biology*, page 13. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2009.
- [36] John R. Birch and Andrew J. Racher. Antibody production, 2006.
- [37] Yao Ming Huang, Wei Wei Hu, Eddie Rustandi, Kevin Chang, Helena Yusuf-Makagiansar, and Thomas Ryll. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnology progress*, 26(5):1400–1410, 2010.
- [38] Yashas Rajendra, Divor Kiseljak, Lucia Baldi, David L. Hacker, and Florian M. Wurm. A simple high-yielding process for transient gene expression in CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 153(1-2):22–26, 2011.
- [39] Olalekan Daramola, Jessica Stevenson, Greg Dean, Diane Hatton, Gary Pettman, William Holmes, and Ray Field. A high-yielding CHO transient system: Coexpression of genes encoding EBNA-1 and GS enhances transient protein expression. *Biotechnology Progress*, 30(1):132–141, 2014.

- [40] Tae Kyung Kim and James H. Eberwine. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8):3173–3178, 2010.
- [41] Dagmar Fischer, Youxin Li, Barbara Ahlemeyer, Josef Krieglstein, and Thomas Kissel. In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24(7):1121–1131, 2003.
- [42] Dagmar Fischer, Anke Von Harpe, Klaus Kunath, Holger Petersen, Youxin Li, and Thomas Kissel. Copolymers of ethylene imine and N-(2-hydroxyethyl)-ethylene imine as tools to study effects of polymer structure on physicochemical and biological properties of DNA complexes. *Bioconjugate Chemistry*, 13(5):1124–1133, 2002.
- [43] Michael Neu, Dagmar Fischer, and Thomas Kissel. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. *Journal of Gene Medicine*, 7(8):992–1009, 2005.
- [44] Qiuling Xie, Guo Xinyong, Chen Xianjin, and Wang Yayu. PEI/DNA formation affects transient gene expression in suspension Chinese hamster ovary cells via a one-step transfection process. *Cytotechnology*, 65(2):263–271, 2013.
- [45] Daniele Pezzoli, Elisa Giupponi, Diego Mantovani, and Gabriele Candiani. Size matters for in vitro gene delivery: Investigating the relationships among complexation protocol, transfection medium, size and sedimentation. *Scientific Reports*, 7:44134, 2017.
- [46] Joanna Rejman, Alessandra Bragonzi, and Massimo Conese. Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Molecular Therapy*, 12(3):468–474, 2005.
- [47] Alexander Sorkin and Manojkumar A. Puthenveedu. Clathrin-Mediated Endocytosis. In *Vesicle Trafficking in Cancer*, pages 1–31. Springer New York, New York, NY, 2013.
- [48] Idit Kopatz, Jean Serge Remy, and Jean Paul Behr. A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *Journal of Gene Medicine*, 6(7):769–776, 2004.

- [49] Jean-Paul Behr. The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit. *International Journal for Chemistry*, 2(1):34–36, 1997.
- [50] Junghun Suh, Hyun Jong Paik, and Byung Keun Hwang. Ionization of poly(ethylenimine) and poly(allylamine) at various pH's. *Bioorganic Chemistry*, 22(3):318–327, 1994.
- [51] W. T. Godbey, Michael A. Barry, Peter Saggau, Kenneth K. Wu, and Antonio G. Mikos. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: A new paradigm for gene delivery. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3):321–328, 2000.
- [52] Lotte M. P. Vermeulen, Stefaan C. De Smedt, Katrien Remaut, and Kevin Braeckmans. The proton sponge hypothesis: Fable or fact? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 129:184–190, 2018.
- [53] Rikke V. Benjaminsen, Maria A. Matthebjerg, Jonas R. Henriksen, S. Moein Moghimi, and Thomas L. Andresen. The Possible ‘‘Proton Sponge’’ Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH. *Molecular Therapy*, 21(1):149–157, 2013.
- [54] You Yeon Won, Rahul Sharma, and Stephen F. Konieczny. Missing Pieces in Understanding the Intracellular Trafficking of Polycation/DNA Complexes. *Journal of Controlled Release*, 139(2):88–93, 2009.
- [55] Lotte M. P. Vermeulen, Toon Brans, Sangram K. Samal, Peter Dubruel, Jo De-meester, Stefaan C. De Smedt, Katrien Remaut, and Kevin Braeckmans. Endosomal Size and Membrane Leakiness Influence Proton Sponge-Based Rupture of Endosomal Vesicles. *ACS Nano*, 12(3):2332–2345, 2018.
- [56] Melissa A. Badding, John D. Lapek, Alan E. Friedman, and David A. Dean. Proteomic and functional analyses of protein-DNA complexes during gene transfer. *Molecular Therapy*, 21(4):775–785, 2013.
- [57] Haiqing Bai, Gillian M. Schiralli Lester, Laura C. Petishnok, and David A. Dean. Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. *Bioscience reports*, 37(6):1–17, 2017.
- [58] Sirirat Choosakoonkriang, Brian A. Lobo, Gary S. Koe, Janet G. Koe, and C. Russell Middaugh. Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(8):1710–1722, 2003.

- [59] Hiroshi Yamaguchi and Masaya Miyazaki. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. *Biomolecules*, 4(1):235–251, 2014.
- [60] Gesa Maria Gieseler, Kimia Ekramzadeh, Volker Nölle, Svitlana Malysheva, Henning Kempf, Sascha Beutel, Robert Zweigerdt, Ulrich Martin, Ursula Rinas, Thomas Scheper, and Iliyana Pepelanova. Solubilization and renaturation of biologically active human bone morphogenetic protein-4 from inclusion bodies. *Biotechnology Reports*, 18:e00249, 2018.
- [61] Lena Andersson, Peter Neubauer, and Sven-olof Enfors. Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 46:255–263, 1996.
- [62] R.S. Islam, D. Tisi, M.S. Levy, and G.J. Lye. Framework for the Rapid Optimization of Soluble Protein Expression in *Escherichia coli* Combining Microscale Experiments and Statistical Experimental Design. *Biotechnology Progress*, 23(4):785–793, 2007.
- [63] Karen Einsfeldt, João Baptista Severo Júnior, Ana Paula Corrêa Argondizzo, Marco Alberto Medeiros, Tito Lívio Moitinho Alves, Rodrigo Volcan Almeida, and Ariane Leites Larentis. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine*, 29(41):7136–7143, 2011.
- [64] L. Eriksson, E Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikström, and S. Wold. *Design of Experiments Principals And Applications*. 2000.
- [65] Brian J Bennion and Valerie Daggett. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9):5142–5147, 2003.
- [66] Xingmei Qi, Yifan Sun, and Sidong Xiong. A single freeze-thawing cycle for highly efficient solubilization of inclusion body proteins and its refolding into bioactive form. *Microbial cell factories*, 14(1):24, 2015.
- [67] Nico Cerletti. Process for the production of biologically active protein, 1998.

- [68] Julie Lobstein, Charlie A. Emrich, Chris Jeans, Melinda Faulkner, Paul Riggs, and Mehmet Berkmen. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial Cell Factories*, 11:56, 2012.
- [69] Edward R. LaVallie, Elizabeth A. DiBlasio, Sharlotte Kovacic, Kathleen L Grant, Paul F Schendel, and John M. McCoy. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Bio/Technology*, 11(2):187–193, 1993.
- [70] T. Yasukawa, C. Kanei-Ishii, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto, and S. Ishii. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry*, 270(43):25328–25331, oct 1995.
- [71] Michael R. Dyson, S. Paul Shadbolt, Karen J. Vincent, Rajika L. Perera, and John McCafferty. Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: Identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnology*, 4:1–17, 2004.
- [72] Yana V. Kim, Marine E. Gasparian, Eduard V. Bocharov, Rita V. Chertkova, Elena N. Tkach, Dmitry A. Dolgikh, and Mikhail P. Kirpichnikov. New Strategy for High-Level Expression and Purification of Biologically Active Monomeric TGF- β 1/C77S in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, 57(2):160–171, 2015.
- [73] Edwin J. Cohn, John T. Edsall, John G. Kirkwood, Hans Mueller, J. L. Oncley, and George Scatchard. *Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions*. Reinhold Publishing Corporation, 1943.
- [74] Jon W. Wong, Robert L. Albright, and Nien Hwa L. Wang. Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) chemistry and bioseparation applications. *Separation & Purification Reviews*, 20(1):49–106, 1991.
- [75] Joshua A. Bornhorst and Joseph J. Falke. Purification of proteins using poly-histidine affinity tags, 2000.
- [76] Stephen Hamilton, Joy Odili, Marc D. Pacifico, George D. Wilson, and Jörg-M. Kupsch. Effect of Imidazole on the Solubility of a His-Tagged Antibody Fragment. *Hybridoma and Hybridomics*, 22(6):347–355, 2003.

- [77] Byungseok Choi, Yujin Lee, Jia Pi, Yongsu Jeong, Kwangehee Baek, and Jaeseung Yoon. Overproduction of recombinant human transforming growth factor beta 3 in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expression and Purification*, 110:102–106, 2015.
- [78] Abdalla A. Elshereef, André Jochums, Antonina Lavrentieva, Lena Stuckenberg, Thomas Scheper, and Dörte Solle. High cell density transient transfection of CHO cells for TGF- β 1 expression. *Engineering in Life Sciences*, 19(11):730–740, 2019.
- [79] Timothy D. Craggs. Green fluorescent protein: Structure, folding and chromophore maturation. *Chemical Society Reviews*, 38(10):2865–2875, 2009.
- [80] Zhongcheng Zou and Peter D. Sun. An improved recombinant mammalian cell expression system for human transforming growth factor-b2 and -b3 preparations. *Protein Expression and Purification*, 50(1):9–17, 2006.
- [81] Xiangzong Han, Qiangyi Fang, Feng Yao, Xiaoning Wang, Jufang Wang, Shengli Yang, and Bing Q. Shen. The heterogeneous nature of polyethylenimine-DNA complex formation affects transient gene expression. *Cytotechnology*, 60(1-3):63–75, 2009.
- [82] M.Laird Forrest and Daniel W. Pack. On the Kinetics of Polyplex Endocytic Trafficking: Implications for Gene Delivery Vector Design. *Molecular Therapy*, 6(1):57–66, 2002.
- [83] David L. Hacker, Divor Kiseljak, Yashas Rajendra, Sarah Thurnheer, Lucia Baldi, and Florian M. Wurm. Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted HEK-293E and CHO-DG44 cells, 2013.
- [84] Ronggai Li. Transient transfection of CHO cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing rainbow trout recombinant IFN- γ protein. *Cytotechnology*, 67(6):987–993, 2014.
- [85] Kamilla Swiech, Virgínia Picanço-Castro, and Dimas Tadeu Covas. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production, 2012.
- [86] Kishwar Hayat Khan. Gene expression in mammalian cells and its applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2):257–263, 2013.

- [87] Molly Hunter, Ping Yuan, Divya Vavilala, and Mark Fox. Optimization of Protein Expression in Mammalian Cells. *Current Protocols in Protein Science*, 95(1), 2019.
- [88] Meredith B. Jones, Chao Yan Liu, Sanjay Vasu, Isabel Cisneros, Henry Chiou, and Jonathan F. Zmuda. Mammalian transient transfection system. *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 32(17):50–51, 2012.
- [89] Gülin Güler-Gane, Sara Kidd, Sudharsan Sridharan, Tristan J. Vaughan, Trevor C. I. Wilkinson, and Natalie J. Tighe. Overcoming the Refractory Expression of Secreted Recombinant Proteins in Mammalian Cells through Modification of the Signal Peptide and Adjacent Amino Acids. *PLOS ONE*, 11(5):e0155340, 2016.
- [90] Michael Cardamone, Nirdosh K Puri, and Malcolm R Brandon. Comparing the Refolding and Reoxidation of Recombinant Porcine Growth Hormone from a Urea Denatured State and from Escherichia coli Inclusion Bodies. *Biochemistry*, 34(1):5773–5794, 1995.
- [91] Bernhard Fischer, Ian Sumner, and Peter Goodenough. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli as inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(1):3–13, 1993.
- [92] Yvonne Roger, Steffen Sydow, Laura Burmeister, Henning Menzel, and Andrea Hoffmann. Sustained release of TGF- β 3 from polysaccharide nanoparticles induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 189(January), 2020.
- [93] Niklas-Maximilian Epping. *Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit Cy5-markierter DNA*. Bachelorarbeit, Leibniz Universität Hannover, 2018.
- [94] Marion G. Macey. Principles of flow cytometry. In *Flow Cytometry: Principles and Applications*, pages 1–15. Humana Press, Totowa, NJ, 2007.
- [95] Sari Sabban, Hongtu Ye, and Birgit Helm. Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity receptor Fc ϵ RI. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 153(1-2):10–16, 2013.

- [96] Thermo Fisher Scientific Inc. Fluorescence SpectraViewer.
- [97] Katharina Dahlmann. *Online-Überwachung der Sauerstoffaufnahme (OUR) in CHO Kultivierungssystemen*. Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover, 2017.

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CTAC	Cetyltrimethylammoniumchlorid
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i> , konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CMV	Cytomegalovirus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DD	<i>Double Discrimination</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DoE	<i>Design of Experiments</i> , statistische Versuchsplanung
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Elektrochemoluminiszenz

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>luorescence-activated cell sorting</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
His	Histidin
IBs	<i>Inclusion Bodies</i>
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LAP	<i>Latency Associated Peptide</i> , Latenzassoziiertes Protein
LLC	<i>Large Latent Complex</i>
LTBP	<i>Latent TGF-β Binding Proteins</i>
LB	<i>lysogeny growth</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MLR	Multiple lineare Regression
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MW	Molekulargewicht
NTA	<i>nitrilotriacetic acid</i> , Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese

PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Shh	Sonic-Hedgehog-Protein
SLC	<i>Small Latent Complex</i>
TB	<i>terrific growth</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
TFE	Transfektionseffizienz
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrxA	Thioredoxin A
TGF	Transforming Growth Factor
UV	Ultraviolett

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung des Vorläuferproteins und des maturen TGF- β 3-Proteins.	6
2.2	Schematische Darstellung des Cystinknotens innerhalb eines TGF- β 3-Monomers.	7
2.3	Schematische Darstellung des TGF- β 3-Dimers.	8
2.4	Schematische Darstellung der transienten Transfektion mittels PEI.	13
2.5	Strukturformel von linearem Polyethylenimin (PEI).	13
3.1	Agarosegel zum Nachweis der erfolgreichen Hitzeschock-Transformation mittels Kolonie-PCR.	18
3.2	Gel einer SDS-PAGE.	20
3.3	Schematische Darstellung des Parameterraums eines Box-Behnken-Versuchsplans.	21
3.4	Wachstumskurven der verschiedenen Kultivierungsansätze N1 bis N15.	22
3.5	Densitometrisch ermittelte TGF- β 3-Konzentrationen in $\mu\text{g pro mL}$ Kultur.	23
3.6	4D-Konturdiagramm unter Anwendung des ermittelten Regressionsmodells.	25
3.7	Gel der SDS-PAGE zur Überprüfung der Solubilisierungseigenschaften des Essigsäure-haltigen Puffers.	27
3.8	Nicht-reduzierendes SDS-Gel zur TGF- β 3-Expression im <i>E. coli</i> -Stamm SHuffle [®] bei 20 und 30 °C Kultivierungstemperatur.	28
3.9	Agarosegel nach Restriktionsverdau.	30
3.10	Agarosegel zum Nachweis der erfolgreichen Hitzeschocktransformation mittels Kolonie-PCR.	31
3.11	Reduzierendes SDS-Gel der Proben aus der Kultivierung bei 37 °C.	32

3.12	SDS-Gel der Proben aus der Kultivierung bei 20 °C, genommen 18 Stunden nach der IPTG-Induktion.	33
3.13	Vergleich des TrxA-TGF- β 3-Anteils in löslicher und unlöslicher Fraktion nach dem Ultraschall-Aufschluss in den getesteten Lysispuffern.	34
3.14	Vergleich des TrxA-TGF- β 3-Anteils in löslicher und unlöslicher Fraktion nach dem Aufschluss in dem Standard-Aufschlusspuffer mit verschiedenen Zusammensetzungen.	35
3.15	Gel einer SDS-PAGE von Proben nach einer Affinitätschromatographie.	37
3.16	Gel der SDS-PAGE mit Dialyse-Proben.	39
3.17	Schematischer Ablauf der transienten Transfektion mit den zwei unterschiedlichen Protokollen.	43
3.18	Durchschnittliche Zellviabilitäten von CHO-Zellen nach der Transfektion mit dem GFP-Plasmid pAcGFP1-N1.	44
3.19	Histogramme mit durchflusszytometrischen Daten einer nicht transfizierten (A) und einer mit dem GFP-Plasmid pAcGFP1-N1 transfizierten CHO-Zellprobe (B).	45
3.20	Durchschnittliche Transfektionseffizienz dreier Kultivierungsansätze zu verschiedenen Zeitpunkten während der Kultivierung nach der Transfektion mit dem GFP-Plasmid pAcGFP1-N1.	46
3.21	Transfektionseffizienzen nach Transfektionsversuchen mit den Plasmiden pAcGFP1-N1 und pcDNA3-eGFP.	47
3.22	Western Blot auf Nitrocellulose-Membran.	49
3.23	Western Blot auf PVDF-Membran mit Proben aus einer mit dem Plasmid pCSG-IBA102-LAP-TGF β 3 transfizierten Kultur.	50
3.24	Western Blot auf PVDF-Membran mit rekombinantem TGF- β 3 aus CHO-Zellen und <i>E. coli</i> zur Überprüfung der Antikörper-Bindung.	51
3.25	Vergleich der Viabilität _{FACS} (A) und Transfektionseffizienz (B) von transfizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion mit dem pAcGFP1-N1-Plasmid bzw. einer Cy5-markierten Variante.	52
3.26	Bestimmung des Populationsanteils mit Cy5-Fluoreszenz nach der Transfektion mit dem Cy5-markierten Plasmid pAcGFP1-N1 bzw. pcDNA3.1-TGF- β 3.	54

3.27	CLSM-Aufnahmen der mit dem Cy5-gelabelten Plasmid pAcGFP1-N1 transfizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion.	56
3.28	CLSM-Aufnahmen der mit dem Cy5-gelabelten Plasmid pcDNA3.1-TGF- β 3 transfizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion.	57
3.29	Western Blot von HEK-Proben nach dem Zellaufschluss.	60
B.1	Reaktionsschema der reaktiven Gruppe des Label-IT [®] -Reagenzes mit einem reaktiven Heteroatom innerhalb einer Nukleinsäure. . .	88
B.2	Gestell für die Bioreaktor-Röhrchen.	95
B.3	Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers.	98
B.4	Extinktions- und Emissionsspektren von eGFP (hellblau) und Cy5 (rot).	99
B.5	Eingesetzte Protein-Größenstandards für die SDS-PAGE.	103
B.6	Beispielhaftes Koeffizienten-Diagramm einer Interaktionsmodells zur Varianzanalyse.	110
C.1	Koeffizientendiagramm zur Regressionsanalyse mit bereits angepasstem Modell.	113
C.2	Vergleich der ermittelten löslichen und unlöslichen TrxA-TGF- β 3-Anteile nach dem Zellaufschluss in verschiedenen Puffern mit Ultraschall und BugBuster [®]	114
C.3	Vergleich des TrxA-TGF- β 3-Anteils in löslicher und unlöslicher Fraktion nach dem Ultraschall-Aufschluss in Puffer Nr. 1 mit verschiedenen Zusammensetzungen.	115
C.4	Gel einer SDS-PAGE zur Überprüfung der Solubilisierungsmethode „Einfrieren und Auftauen“ in Harnstoff-haltigem Puffer.	116

Tabellenverzeichnis

2.1	Überblick verschiedener Methoden zur Transfektion von Säugerzellen.	12
3.1	Parameter und Intervalle des DoE-Versuchsplans.	21
3.2	Kenngrößen zur Einschätzung der Güte des aufgestellten Modells.	24
3.3	Vergleich des wiedergefundenen TrxA-TGF- β 3-Anteils bei einem Säulendurchlauf (A1) mit dem erneuten Auftragen des dabei aufgefangenen Durchflusses (A2).	38
3.4	Vergleich der Populationsanteile mit Cy5-Fluoreszenz nach Durchführung verschiedener Waschschritten vor der durchflusszytometrischen Analyse.	55
4.1	Übersicht der erreichten Ziele durch die in dieser Arbeit evaluierten Ansätze zur Produktion von rekombinanten TGF- β 3.	63
A.9	Übersicht der eingesetzten TGF- β 3-Plasmide für die Transfektionen in Säugetierzellen.	77
A.11	Eingesetzte Primer für die StarGate TM -Klonierung in den Vektor pCSG-IBA102.	79
B.1	Zusammensetzung der getesteten Puffer für den Zellaufschluss mit Ultraschall.	92
B.2	Getestete Zusammensetzungen auf Basis von Puffer 1. Alle Puffer beinhalten 50 mM TRIS-HCl und 1 mM DTT.	92
B.3	Auflistung der verschiedenen Plasmide und der in den Transfektionen eingesetzten Mengen.	96
C.1	Mit MODDE [®] aufgestellter Versuchsplan für die Optimierung der TGF- β 3-Ausbeute bei Kultivierungen in <i>E. coli</i>	112

Mitarbeit an Experimenten

Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei Bachelorarbeiten durchgeführt, deren experimentelle Durchführungen durch die Autorin betreut wurden. Die im Folgenden aufgeführten Abschnitte basieren auf den Ergebnissen dieser Abschlussarbeiten.

Nicola Flath: „Produktion von TGF- β 3 mit Thioredoxin-Tag zur Verbesserung der Löslichkeit“ (Bachelorarbeit, Oktober bis Dezember 2016)

3.1.6 Thioredoxin-Fusionsprotein zur Erhöhung der Löslichkeit; Abbildung 3.10 und Abbildung 3.12

Yue Sun: „Transiente Transfektion von CHO-Zellen mittels Polyethylenimin für die Herstellung rekombinanter Proteine“ (Bachelorarbeit, Mai bis August 2017)

3.2.1.1 Bestimmung der Zellviabilität, 3.2.1.2 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Niklas-Maximilian Epping: „Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit Cy5-markierter DNA“ (Bachelorarbeit, März bis Mai 2018)

3.2.3 Plasmidmarkierung mit dem Farbstoff Cy5

Publikationsverzeichnis

Journal-Publikationen

Gieseler, G., Pepelanova, I., Stuckenberg, L., Villain, L., Nölle, V., Odenthal, U., Beutel, S., Rinas, U., Scheper, T. (2017). Purification of bone morphogenetic protein-2 from refolding mixtures using mixed-mode membrane chromatography. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 123–130.

<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7784-1>

Elshereef, A. A., Jochums, A., Lavrentieva, A., Stuckenberg, L., Scheper, T., Solle, D. (2019). High cell density transient transfection of CHO cells for TGF- β 1 expression. *Engineering in Life Sciences*, 19(11), 730–740.

<https://doi.org/10.1002/elsc.201800174>

Poster-Beiträge

Gieseler, G., Stuckenberg, L., Beutel, S., Scheper, T., Villain, L., Nölle, V. (2015). Innovative purification strategies for cytokines: Mixed-mode chromatography using membrane adsorbers. Poster auf dem internationalen Symposium von Biofabrication in Hannover (25.-26.06.2015)

Stuckenberg, L., Rinas, U., Hoffmann, A., Scheper, T. (2016). Produktion von biologisch aktivem TGF- β 3 in *E. coli*. Poster auf der ProcessNet Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen in Aachen (12.-15.09.2016)

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lena Stuckenberg
Geburtsdatum	27.09.1990
Geburtsort	Göttingen
Nationalität	deutsch

Ausbildung

Seit 02/2015	Promotionsstudium „Chemie“ am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover
10/2012 - 09/2015	Masterstudium „Life Science“ an der Leibniz Universität Hannover
10/2009 - 09/2012	Bachelorstudium „Life Science“ an der Leibniz Universität Hannover