

Rekombinante Produktion und
Charakterisierung der epidermalen
Lipoxygenase AmbLOXe (*Ambystoma
mexicanum*) und der homologen
Lipoxygenase ALOXe3 (*Homo sapiens*)

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

genehmigte Dissertation

von

Anne Stamm, M. Sc.
geboren am 16.05.1988 in Mühlhausen

2018

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

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

Tag der Promotion: 06.07.2018

*„Jedes Naturgesetz, das sich dem Beobachter offenbart,
läßt auf ein höheres, noch unerkanntes schließen.“*

Alexander von Humboldt (1769-1859)

DANKSAGUNG

Zum Gelingen dieser Dissertation haben viele Personen auf ganz unterschiedliche Art und Weise beigetragen.

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Thomas Scheper dafür danken, dass er mir die Möglichkeit eingeräumt hat, am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover meine Dissertation anfertigen zu können. Sein mir entgegengebrachtes Vertrauen und seine Förderung ermöglichten mir den nötigen Freiraum bei der Bearbeitung des Dissertationsthemas und u.a. die Teilnahme an diversen Konferenzen. Zudem schätzte ich während meiner Zeit am TCI das kollegiale Umfeld, dass er mit seinem Führungsstil stets fördert. Zusätzlich gilt mein Dank Prof. Dr. Ursula Rinas für die Übernahme des Korreferats und PD Dr. Ulrich Krings für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Meiner Arbeitsgruppenleiterin Dr. Iliyana Pepelanova möchte ich von ganzem Herzen danken. Sie hatte stets Vertrauen in mich und meine Arbeit, stand unterstützend zur Seite, wenn es nötig war und sorgte mit ihrem unerschütterlichen Optimismus für neuen Antrieb, wenn es mal nicht so lief. Liebe Iliyana, vielen Dank dafür!

Dr. Sarah Strauß und Prof. Dr. Peter Vogt von der Klinik für Plastische, Ästhetische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich für die Kooperation danken. Ein tiefer Dank gilt dabei auch Prof. Dr. Kerstin Reimers, aus deren Ideenschmiede die Arbeit rund um den Axolotl stammt. Leider ist Kerstin im Jahr 2015 verstorben und kann daher nicht mehr miterleben, wie ihre Forschung weitergeführt wird.

Ein großer Dank gebührt auch dem gesamten Team des TCI, durch deren Einsatz das Institut am Laufen gehalten wird. Exemplarisch seien hier Martin Pähler und Martina Weiß genannt, die auch im größten Laborstress den Überblick behalten, sowie Ulrike Dreschel und Cornelia Alic, die bei Verwaltungsaufgaben stets unterstützend zur Seite stehen.

Dr. Antonina Lavrentieva möchte ich für die Unterstützung und Tipps rund um die Zellkultur danken. Danken möchte ich auch meinen Praktikanten und insbesondere meiner Bachelorstudentin Lale Zerdali, die engagiert und wissbegierig an Teilen dieses Projektes mitgeforscht hat.

Allen Kollegen/Mitdoktoranden/Freunden am TCI möchte ich für die tollen Atmosphäre vor, während und nach der Arbeit danken. Dies gilt vor allem auch für meine Bürokollegen, mit denen ich tolle Gespräche rund um die Arbeit und neben der Arbeit teilen konnte. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen Kathrin, Marcel, Caro, Daniel, Sarah und André, die ich teilweise schon kenne, seitdem wir frische Erstsemester waren und mit denen ich seit dieser Zeit auch abseits der Arbeit gerne Zeit verbringe. Ein Dank gilt auch jenen Freunden jenseits von Forschung und Doktorandendasein, die immer für eine willkommene Ablenkung gesorgt haben.

Ein besonderer und herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und immer in mich vertraut und an mich glaubt. Christian danke ich für seinen Rückhalt in allen Lebenslagen, aufmunternde Worte, seine unerschütterliche Geduld und seinen Humor, wenn sonst gar nichts mehr hilft.

ABSTRACT

Insights into the molecular signaling and cellular events in highly regenerative species, such as the axolotl, might provide practical approaches for regenerative therapies in wound healing and tissue repair in humans. The epidermal lipoxygenase AmbLOXe, which is highly expressed during limb re-development in the axolotl, seems to play a key role in regeneration. In previous studies, an increased migration of AmbLOXe-transfected cell lines could be demonstrated.

Large amounts of AmbLOXe are necessary for further characterization of the enzyme. These amounts cannot be isolated from the axolotl itself and thus need to be produced by a recombinant system. In this thesis, the epidermal lipoxygenase AmbLOXe from the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*), as well as its human homologue ALOXe3, could be recombinantly produced in *Escherichia coli* and isolated as inclusion bodies (IBs).

A characterization of these IBs regarding their exact enzyme activity is not possible, because the specific reactions catalyzed by AmbLOXe are not elucidated yet. Therefore, it was necessary to find alternative approaches for the determination of enzyme activity. Inclusion bodies produced in *E. coli* were implemented in a wound healing assay for the first time. A wound healing assay using culture inserts made an evaluation of the bioactivity of AmbLOXe and its homologue ALOXe3 possible. Two different modes of application of IBs were performed: either through cell culture coating or direct addition to the medium. In both modes of application, $\geq 90\%$ of the wound area were closed for AmbLOXe. In contrast, closed wound area values were between 50 and 70 % for controls using no IBs or non-functional IBs from GFP. For ALOXe3 similar effects were observed as for AmbLOXe. Overall, a positive effect of AmbLOXe and ALOXe3 IBs on wound healing could be demonstrated. It could be shown that lipoxygenase inclusion bodies are functional protein aggregates which can be used as a reservoir for the active enzyme.

Keywords: AmbLOXe, ALOXe3, epidermal lipoxygenases, axolotl (*Ambystoma mexicanum*), active inclusion bodies, *in vitro* wound healing assays, nanopills

KURZFASSUNG

Erkenntnisse über molekulare Signale und zelluläre Ereignisse in hoch regenerativen Spezies, wie dem Axolotl, können Ansätze für regenerative Therapien zur Wundheilung und Gewebereparatur beim Menschen liefern. Die epidermale Lipoxygenase AmbLOXe, die während der Regeneration von Gliedmaßen beim Axolotl in hohem Maße produziert wird, scheint an solchen zellulären Ereignissen beteiligt zu sein. In vorausgehenden Studien konnte eine erhöhte Migration für AmbLOXe-transfizierte Zelllinien gezeigt werden.

Für eine weiterführende Charakterisierung von AmbLOXe werden größere Mengen des Enzyms benötigt. Diese können nicht direkt aus dem Axolotl isoliert werden, sondern müssen über ein rekombinantes System produziert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte die epidermale Lipoxygenase AmbLOXe aus dem mexikanischen Axolotl (*Ambystoma mexicanum*), sowie ihr menschliches Homolog ALOXe3, rekombinant in Form von *Inclusion Bodies* (IBs) in *Escherichia coli* produziert und aufgereinigt werden.

Eine Charakterisierung dieser IBs hinsichtlich ihrer genauen Enzymaktivität ist nicht möglich, da die von AmbLOXe katalysierten Reaktionen noch nicht aufgeklärt sind. Daher mussten alternative Ansätze zur Bestimmung der Enzymaktivität gefunden werden. Durch *E. coli* produzierte *Inclusion Bodies* wurden dabei erstmalig in Rahmen von Wundheilungsassays in der Zellkultur angewendet. Ein Wundheilungsassay mit *Culture-Inserts* ermöglichte es die Bioaktivität von AmbLOXe und ihrem Homolog ALOXe3 zu beurteilen. Die Applikation der IBs erfolgte dabei als Zellkulturbeschichtung und als Additiv im Medium. Bei beiden Applikationsformen von AmbLOXe wurden ≥ 90 % der Wundfläche geschlossen. Bei Kontrollen ohne IBs und mit nicht-funktionellen IBs aus GFP lag der Anteil der verschlossenen Wundfläche bei 50 bis 70 %. Für ALOXe3 waren ähnliche Effekte wie für AmbLOXe zu beobachten. Insgesamt konnte ein positiver Einfluss von AmbLOXe und ALOXe3 IBs auf die Wundheilung nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei den Lipoxygenase *Inclusion Bodies* um funktionelle Proteinaggregate handelt, die als Reservoir für aktives Enzym genutzt werden können.

Stichworte: AmbLOXe, ALOXe3, epidermale Lipoxygenasen, Axolotl (*Ambystoma mexicanum*), aktive *Inclusion Bodies*, *in vitro* Wundheilungsassays, *Nanopills*

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	I
ABSTRACT.....	III
KURZFASSUNG.....	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1. Zielsetzung	2
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
2.1. Wundheilung	4
2.1.1. Wundheilung beim Menschen.....	4
2.1.2. Wundheilung und Regeneration unterschiedlicher Spezies	7
2.1.2.1. Wundheilung und Regeneration der Gliedmaßen beim Axolotl.....	9
2.2. Lipoxygenasen und ihre Rolle in der Wundheilung.....	13
2.3. <i>In vitro</i> Wundheilungsassay	16
2.3.1. Wundheilungsassays	17
2.3.1.1. Scratch Assay.....	17
2.3.1.2. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS).....	18
2.3.1.3. Culture-Insert Wundheilungsassay	20
2.4. <i>Inclusion Bodies</i>: Biologisch aktive Proteinaggregate	21
3. EXPERIMENTELLE ARBEITEN.....	25
3.1. Molekularbiologische Arbeiten	25
3.2. Lösliche Produktion von rekombinanten Lipoxygenasen.....	33
3.2.1. Determination optimaler Kultivierungsparameter zur löslichen Produktion von ALOXe3 und AmbLOXe	33
3.2.1.1. Einfluss der Expressionstemperatur.....	34
3.2.1.2. Einfluss des Mediums und des Induktionszeitpunktes	37
3.2.1.3. Einfluss der Induktorkonzentration	40
3.2.2. Heterologe Produktion von ALOXe3 unter Coexpression von Chaperonen	42

3.2.3.	Untersuchung der Aufreinigung von ALOXe3 und AmbLOXe mittels Nickel-Affinitätschromatographie	48
3.3.	Produktion und Charakterisierung von Lipoxxygenasen aus <i>Inclusion Bodies</i>.....	53
3.3.1.	Aufreinigung von Lipoxxygenase <i>Inclusion Bodies</i>	54
3.3.2.	Solubilisierung und Rückfaltung von Lipoxxygenasen aus <i>Inclusion Bodies</i>	57
3.3.2.1.	Thermal Shift Assay	62
3.3.3.	Lipoxxygenase Assay (LOX Assay)	64
3.3.4.	<i>In vitro</i> Wundheilungsassays	68
3.3.4.1.	ImageJ MRI Wound Healing Tool.....	70
3.3.4.2.	Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) mit NiH-3T3 Fibroblasten und HaCaT Keratinocyten	71
3.3.4.3.	Scratch Assay mit NiH-3T3 Fibroblasten	77
3.3.4.4.	Culture-Insert Wundheilungsassay mit HaCaT Keratinocyten	79
4.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	84
4.1.	Ausblick.....	87
A.	ANHANG.....	89
A.1.	Material	89
A.1.1.	Verbrauchsmaterialien	89
A.1.2.	Laborgeräte.....	91
A.1.3.	Chemikalien und Reagenzien	92
A.1.4.	Puffer, Lösungen und Medien	95
A.1.5.	Zellen, Plasmide und Primer	99
A.1.6.	Enzyme und Antikörper	100
A.1.7.	Reaktionskits.....	101
A.1.8.	Software	101
A.2.	Methoden	102
A.2.1.	Molekularbiologische Arbeiten.....	102
A.2.1.1.	Präparation von Plasmid-DNA.....	102
A.2.1.2.	Native Agarose-Gelelektrophorese für DNA.....	103
A.2.1.3.	Extraktion und Aufreinigung von DNA aus einem Agarose-Gel	104

A.2.1.4. Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten.....	104
A.2.2. Stammherstellung und –erhaltung	106
A.2.2.1. Transformation chemisch kompetenter Zellen	106
A.2.2.2. Anlegen von Glycerin-Gefrierkulturen.....	106
A.2.3. Kultivierung.....	107
A.2.3.1. Herstellung von Medium und Platten	107
A.2.3.2. Kultivierung und Offline-Analytik	107
A.2.3.3. Zellernte.....	108
A.2.4. Proteinanalytik.....	108
A.2.4.1. Zellaufschluss (Ultraschall, BugBuster® und French Press).....	108
A.2.4.2. SDS-PAGE (mit Coomassie- und Silberfärbung)	110
A.2.4.3. Proteinaufreinigung über Ni-NTA Spin columns.....	112
A.2.4.4. Densitometrische Quantifizierung von Proteinen.....	113
A.2.4.5. Western Blot	113
A.2.5. Aufbereitung und Charakterisierung <i>Inclusion Bodies</i>	114
A.2.5.1. Aufreinigung der Inclusion Bodies	114
A.2.5.2. Solubilisierung und Rückfaltung.....	116
A.2.5.3. Thermal Shift Assay	118
A.2.5.4. LOX Assay	118
A.2.6. Arbeiten in der Zellkultur	119
A.2.6.1. Kryokonservierung von Zellen	119
A.2.6.2. Revitalisierung von Zellen	120
A.2.6.3. Ernten und Passagieren von Zellen.....	120
A.2.6.4. Zählen von Zellen.....	121
A.2.6.5. Fixieren und Färben von Zellen.....	121
A.2.6.6. ECIS (Wundheilungsassay I).....	122
A.2.6.1. Scratch Assay (Wundheilungsassay II)	123
A.2.6.2. Ibidi Cell Culture-Inserts (Wundheilungsassay III).....	124
A.2.6.3. MRI Wound Healing Tool Macro.....	125
A.2.6.4. Aufnahmen mit dem LumaScope 600 Mikroskop.....	125

A.3.	Ergänzende Daten	126
B.	VERZEICHNISSE	134
B.1.	Abkürzungsverzeichnis	134
B.2.	Abbildungsverzeichnis	136
B.3.	Tabellenverzeichnis	139
B.4.	Literaturverzeichnis	141
C.	ABSCHLUSSARBEITEN UND KOOPERATIONEN	150
D.	LEBENS LAUF	151
E.	PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE	152

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

Die Behandlung chronischer Wunden stellt eine große wirtschaftliche Belastung des Gesundheitssystems dar. Der demographische Wandel und das damit steigende Alter der Patienten, sowie die Zunahme von Diabeteserkrankungen, werden dieses Problem in den nächsten Jahren und Jahrzehnten noch verstärken. Die aktuellen Patientenzahlen und die damit einhergehenden Kosten werden auf etwa 10 Milliarden US Dollar in den USA [1] und 4 Milliarden Euro in Deutschland geschätzt [2]. Neben chronischen Wunden stellen auch jene Verwundungen, die zur Ausbildung eines großflächigen Narbengewebes (etwa nach Verbrennungen dritten Grades) führen, ein großes Problem dar. Dieses Gewebe ist nicht nur ästhetisch, sondern auch in seiner Funktion stark eingeschränkt. Neue Therapieansätze zur Behandlung von chronischen Wunden und Narbengeweben könnten dieser Tendenz entgegenwirken. Bereits auf dem Markt befindliche Produkte unterstützen die Wundheilung u.a. durch eine Regulierung der Wundfeuchtigkeit und den Einsatz von Wachstumsfaktoren [3–5]. Bei der Entwicklung neuer Therapieansätze muss der Wundheilungsprozess als Ganzes betrachtet werden und die Fehlregulationen, die zur Ausbildung einer chronischen Wunde und nicht-funktionellem Narbengewebe führen, berücksichtigt werden. Somit muss eine ganzheitliche Therapie an unterschiedlichen Stellen der Wundheilung eingreifen bzw. unterstützend wirken.

Einen der größten limitierenden Faktoren bei der Behandlung von Wunden stellt die begrenzte Regenerationsfähigkeit des menschlichen Körpers dar. Der Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) hingegen ist in der Lage Gliedmaßen, Schwänze und Teile von Organen narbenfrei zu regenerieren. Als Wirbeltier mit einer herausragenden Regenerationsfähigkeit eignet er sich hervorragend als Modell, um Erkenntnisse zu neuen Therapieansätzen für den Menschen zu gewinnen. So lassen sich möglicherweise die Mechanismen des Axolotls auf den Heilungsprozess beim Menschen übertragen. Dadurch könnten regenerative Prozesse eingeleitet werden, die zu einer narbenfreien Wundheilung führen und Komplikationen bei der Wundheilung unterbinden. Ein möglicher Kandidat zu Entwicklung neuer Therapieansätze ist dabei die epidermale Lipoxygenase AmbLOXe (*Axolotl homologue of epidermis-type amphibian epidermal lipoxygenase*) aus dem Axolotl. In vorherigen Studien konnte diese Lipoxygenase bereits in einer sich regenerierenden Gliedmaße in großen

Mengen detektiert und die DNA-Sequenz der Lipoxygenase bestimmt werden. Wurden menschliche Zellen in der Zellkultur mit dieser DNA-Sequenz transfiziert, zeigten sie eine verstärkte Migration [6]. Aus diesem Grund wird eine wundheilungsfördernde Eigenschaft für AmbLOXe bzw. ihre Produkte angenommen, die Zellen an den Wundrändern zu einer schnelleren Migration anregt. Datenbankanalysen lassen darauf schließen, dass es sich bei AmbLOXe um ein Homolog der menschlichen epidermalen Lipoxygenase 3 (ALOXe3) handelt [6]. Für eine Entwicklung zu einer klinischen Anwendung ist allerdings noch eine weitreichendere Charakterisierung von AmbLOXe notwendig. Um ausreichend Proteine für eine Charakterisierung zu erhalten, ist eine direkte Isolation aus dem Axolotl nicht geeignet. Solch eine große Menge Protein ist nur über eine rekombinante Produktion zu realisieren.

1.1. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die rekombinante Produktion und Charakterisierung der epidermalen Lipoxygenase AmbLOXe aus dem Axolotl unter Einbeziehung ihres humanen Homologes ALOXe3. Die Charakterisierung soll es ermöglichen das Wundheilungspotential für AmbLOXe in Bezug auf eine Anwendung beim Menschen besser beurteilen zu können.

Dazu ist es zunächst notwendig, ein biotechnologisches System zu entwickeln, das eine heterologe Produktion beider Proteine ermöglicht. Solch ein rekombinantes Produktionssystem muss die Proteine in ausreichender Menge herstellen und es muss möglich sein, die Proteine nach der Produktion zu isolieren. Zur Produktion soll ein optimierter *Escherichia coli* Stamm verwendet werden. Dieses Bakterium ist ein etabliertes System, das ausführlich charakterisiert ist. Für eine lösliche Produktion in *E. coli* sollen unterschiedliche Kultivierungs- und Induktionsparameter untersucht und ihr Einfluss auf die Löslichkeit der heterolog produzierten Proteine beurteilt werden. Eine weitere Produktionsstrategie zielt auf die Herstellung von Proteinaggregaten, so genannten *Inclusion Bodies (IBs)*, als Quelle für die Zielproteine ab.

In Versuchen soll die Möglichkeit untersucht werden, Proteine aus den *Inclusion Bodies* heraus zu lösen, welche hinsichtlich ausgebildeter Strukturen und Aktivität beurteilt werden. Zusätzlich sollen die *Inclusion Bodies* direkt in Assays eingesetzt werden. Da der detaillierte Wirkmechanismus der epidermale Lipoxygenase AmbLOXe noch nicht aufgeklärt ist, soll ein Assaysystem gefunden werden, dass es ermöglicht die Bioaktivität der heterolog hergestellten Lipoxygenasen in Bezug auf die Wundheilung zu beurteilen. Hierzu

eignen sich *in vitro* Wundheilungsassays in der Zellkultur im Besonderen. Herausforderungen ergeben sich dabei durch die Applikation der untersuchten Proteine in Form von *IBs*.

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1. Wundheilung

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und die Aufrechterhaltung ihrer Barrierefunktion ist unerlässlich für einen funktionellen Organismus. Die Wundheilung ist somit essentiell für den menschlichen Körper. Bei diesem Prozess können jedoch Infektionen, chronische Wunden und exzessive Wundheilung, die zu hypertrophen Narben oder Keloiden führt, auftreten [7]. Auch für andere multizelluläre Organismen ist die Wundheilung eine essentielle Funktion. Allerdings sind die Unterschiede, wie dieser Prozess stattfindet, erheblich [8]. Nahezu alle Organismen unterliegen Erneuerungsprozessen während ihrer Lebensspanne, allerdings hat sich die Fähigkeit der Heilung unterschiedlich entwickelt. So sind einige Organismen in der Lage, ganze Gliedmaßen und Teile von Organen zu regenerieren, während andere Organismen wiederum nur zur einfachen Reparatur von Gewebe befähigt sind [9].

2.1.1. Wundheilung beim Menschen

Eine Wunde ist definiert als „eine Gewebsdurchtrennung von Haut, Schleimhäuten oder Organen“ [3] und die kutane Wundheilung als „biologischer Vorgang, bei dem durch die Bindegewebebildung, Kontraktion und Epithelisierung ein Verschluss des Integuments erfolgt“ [10].

Die Einteilung der einzelnen Phasen der menschlichen Wundheilung ist nicht klar definiert. Je nach Quelle werden drei bis fünf Phasen unterschieden. Am häufigsten wird folgende Einteilung, der sich teils überlappenden vier Phasen gewählt: Exsudations-, Granulations-, Epithelisierungs- und Remodellierungsphase. Die ersten beiden Phasen dienen dazu, dass der Blutverlust, der durch die Wunde auftritt, minimiert wird, totes Gewebe entfernt wird und Infektionen vermieden werden. Die weiteren Phasen dienen schließlich des Auf- und Umbaus von Gewebe.

In der **Exsudationsphase (Blutungsstopp und Entzündungsphase; erster bis dritter Tag nach der Verletzung)** kommt es zur Bildung von Fibrin, welches zusammen mit Thrombozyten ein Gerinnsel bildet. Im Blut befindliche Leukozyten, genauer die

neutrophilen Granulozyten, heften sich an der Wunde an und beseitigen eingedrungene Pathogene durch Phagozytose, fungieren als Lockstoff für andere Zellen [11] und schütten Zytokine aus (Abbildung 2.1, A). Die Thrombozyten geben unterschiedliche Wachstumsfaktoren frei, welche die Wundheilungskaskade ebenfalls in Gang setzen, die wiederum Fibroblasten und Monozyten aktiviert. Diese Monozyten entwickeln sich zu Makrophagen, die eingedrungene Pathogene und Zelltrümmer (abgestorbene Granulozyten) beseitigen. Die Makrophagen schütten ebenfalls Wachstumsfaktoren und Zytokine aus, die u.a. weitere Schritte der Wundheilung einleiten. Fibroblasten vermehren sich und beginnen dadurch neues Gewebe aufzubauen. Für diesen Vorgang ist ein feuchtes Wundmilieu besonders wichtig. Bei der Steuerung all dieser biologischen Vorgänge sind Wachstumsfaktoren und Zytokine entscheidend. Der Wachstumsfaktor *Transforming Growth Factor β* (*TGF- β*) stimuliert beispielsweise zusammen mit weiteren Botenstoffen (u.a. *Fibroblast Growth Factor* (*FGF-2*) und *Insulin-like Growth Factor* (*IGF*)) die Kollagensynthese durch Fibroblasten und sorgt zusätzlich dafür, dass Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren, die für die Wundkontraktion verantwortlich sind. In dieser Phase werden auch größere Mengen an Exsudat (Absonderungen) produziert, die die Reinigung der Wunde unterstützen sollen. Im optimalen Fall ist dieser Phase der Wundheilung sehr kurz [3,7,10].

In der **Granulationsphase (Proliferationsphase; vierter bis siebter Tag nach der Verletzung)** wandern von den Wundrändern aus Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten entlang der Fibrinmatrix in die Wunde. Gleichzeitig wird an den Rändern bereits nekrotisches Gewebe abgebaut und am Übergang zum Normalgewebe wird mit der Neusynthese von extrazellulärer Matrix (EZM) begonnen. In dieser Matrix bauen sich Bindegewebe und Blutgefäße auf und bilden das Granulationsgewebe (Abbildung 2.1, B). Fibroblasten produzieren die Komponenten der EZM u.a. Hyaluronsäure und Fibronectin, sowie Kollagen (aus Prokollagen werden Kollagenfibrillen) und Proteoglykane. All diese Vorgänge werden ebenfalls durch Wachstumsfaktoren und Zytokine gesteuert. Darauffolgend findet ein Umbau der Fibroblasten und Kapillarsprossen des Granulationsgewebes in ein strukturiertes Gewebe statt. Die **Epithelisierungsphase (Migrationsphase; dritter Tag bis zweite Woche nach der Verletzung)** wird vor allem durch Keratinocyten ermöglicht, die sich am Rand zum Normalgewebe befinden. Diese Zellen migrieren in die obere Schicht des gebildeten Granulationsgewebes (Abbildung 2.1,

B). Das noch unfertige Bindegewebe wird von einer dünnen Schicht aus Epithelzellen bedeckt [3,7,10].

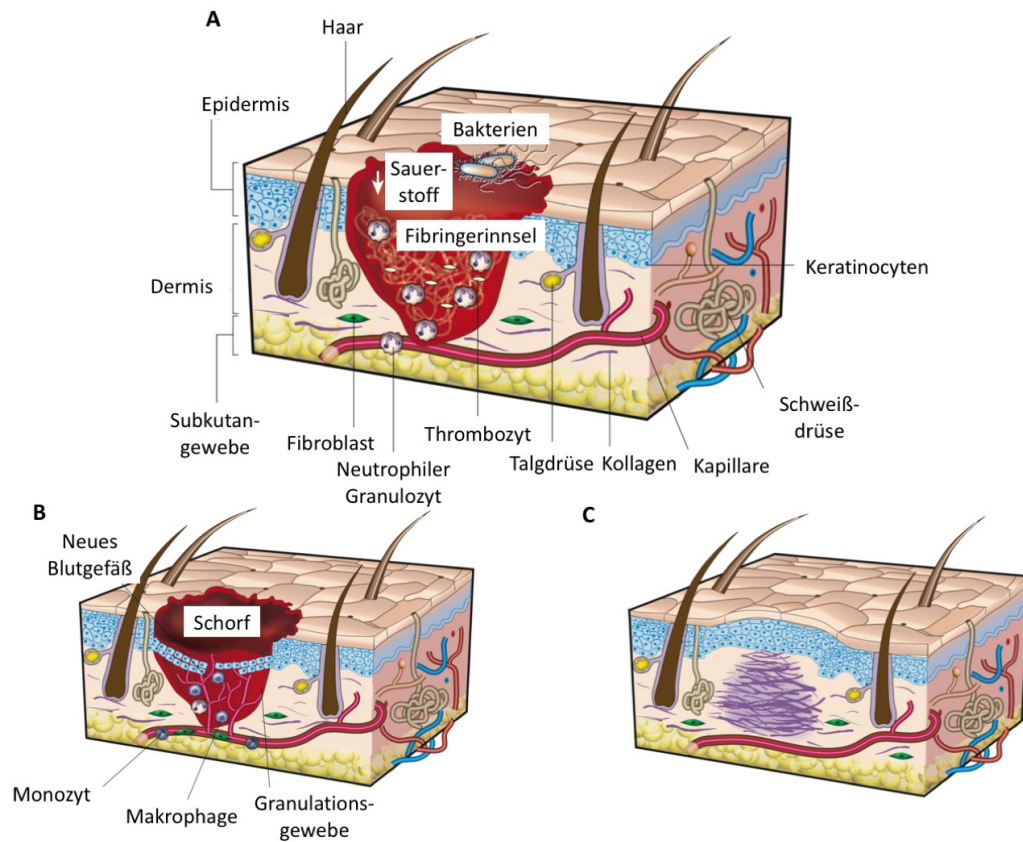


Abbildung 2.1: Wundheilung; A: Exsudationsphase, B: Granulationsphase und Epithelisierungsphase, C: Remodellierungsphase; A: Fibrin und Thrombozyten bilden ein Gerinnsel und die Leukozyten (neutrophile Granulozyten) betreiben Phagozytose und schütten Zytokine aus; B: Bindegewebe und Blutgefäße bauen das Granulationsgewebe auf, zusätzlich migrieren Keratinocyten in die obere Schicht der Granulationsgewebes; C: Umstrukturierungsprozesse, vor allem des Kollagens finden statt, diese Prozesse können bis zu einem Jahr dauern; modifiziert nach [8]

In der darauffolgenden **Remodellierungsphase (Reifungsphase; achter Tag bis ein Jahr nach der Verletzung)** kommt es zu Umstrukturierungsprozessen. Kollagenasen, die zu den Metalloproteasen gehören, bauen Kollagen ab, Typ-III-Kollagen wird zu Typ-I-Kollagen umwandelt und die Interaktion zwischen EZM und den Zellen verändert sich (Abbildung 2.1, C). Diese Umbauprozesse des Gewebes können noch bis zu einem Jahr nach Verwundung andauern. Letztendlich entsteht ein Narbengewebe ohne Blutgefäße, das zum größten Teil aus inaktiven Fibroblasten, dichtem Kollagen und anderen Bestandteilen der

EZM besteht. Bei tiefen und/oder kontaminierten Wunden (sekundäre Wundheilung) kann es während dieses Prozesses zu einer verstärkten Narbenbildung kommen [3,7,10].

Bei der Wundheilung unterscheidet man zwischen der epithelialen, primären und sekundären Wundheilung. Eine epitheliale Wundheilung findet bei oberflächlichen Wunden statt wie z.B. Abschürfungen. Unter der primären Wundheilung versteht man einen unkomplizierten Heilungsvorgang, wie er beispielsweise bei operativen Wunden mit glatten, chirurgischen Wundrändern auftritt. Ist der Heilungsvorgang jedoch gestört, spricht man von der sekundären Wundheilung. Diese Störungen können durch Infektionen, Mangeldurchblutung und andere Faktoren, wie Immunschwäche auftreten. Des Weiteren tritt die sekundäre Wundheilung vor allem bei Wunden auf, die mit einem großen Verlust an Gewebe einhergehen. Damit solche Wunden, die von der sekundären Wundheilung betroffen sind, gut abheilen können, ist es insbesondere wichtig ein feuchtes, physiologisches Milieu zu schaffen und auf Hygiene bei der Wundversorgung zu achten. Es existieren viele unterschiedliche Wundauflagertypen, die ein feuchtes Wundmilieu gewährleisten oder aufgrund ihrer Materialeigenschaften (z.B. Alginate oder Hydrogele) mit der Wunde in Interaktion treten. Zusätzlich existieren (bio)aktive Wundaufgaben (z.B. mit autologen Keratinocyten oder Wachstumsfaktoren) [3,7].

Viele schwerheilende Wunden verbleiben im Status der chronischen Entzündung und durchlaufen nicht die weiteren Phasen der Wundheilung. In solchen Fällen kommt es zur Bildung von hypertrophen Narben und Keloiden. Die Entwicklungen dieser Phänomene hängen mit der Reifung des Kollagens zusammen, da Keloide dicke Kollagenstränge enthalten, während hypertrophe Narben Kollagenknoten enthalten. Das Granulationsgewebe wächst bei beiden Vorgängen unkontrolliert durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren bei gleichzeitigem Ausbleiben von apoptotischen Prozessen [9]. Da hypertrophe Narben und Keloide ein Phänomen sind, das als solches nur im Menschen existiert, sind keine entsprechenden Tiermodelle vorhanden um dieses Phänomen zu studieren [12].

2.1.2. Wundheilung und Regeneration unterschiedlicher Spezies

Alle multizellulären Organismen besitzen die Eigenschaft Gewebe zu reparieren, allerdings findet dieser Prozess, abhängig vom Organismus, auf sehr unterschiedliche Art und Weise statt. Ein Vergleich dieser Mechanismen kann einerseits die Erkenntnisse bezüglich der

menschlichen Wundheilung verbessern und andererseits neue Ansätze liefern, wie die menschliche Wundheilung durch äußeren Einfluss verbessert werden kann. In diesem Kontext sind vor allem Amphibien, im Besonderen die Gruppe der Schwanzlurche, interessant, die über eine bemerkenswerte Regenerationsfähigkeit im Rahmen der Wundheilung verfügen. So sind sie neben einer generellen narbenfreien Wundheilung zusätzlich in der Lage ganze Gliedmaßen ohne Narbenbildung zu regenerieren. Aber auch andere Spezies sind zu ähnlichen Regenerationen befähigt, so kann u.a. der Zebrafisch seine Kiemen nachbilden [13].

Der menschliche Körper ist als Antwort auf eine akute Verletzung in der Lage Gewebe wie Knochen, periphere Nerven und Haut zu regenerieren (z.B. die Reparatur der Haut nach einer exzessiven Sonnenaussetzung). Die Integrität vieler Gewebe erfordert zudem kontinuierliche Erneuerungsprozesse. Die Kapazität zur Regeneration sinkt bei Säugern mit steigendem Alter durch extrinsische (z.B. Umweltfaktoren) und intrinsische (z.B. zelluläre Prozesse) Veränderungen. Eine narbenfreie Heilung und funktionelle Reparatur ist nur im Embryostadium vorhanden und geht im Laufe der Entwicklung verloren [14].

Menschliche Föten sind bis zum Beginn des letzten Drittels ihrer Entwicklung in der Lage Gewebe ohne Narbenbildung zu heilen. Dieses Phänomen konnte ebenfalls bei Föten anderer Säuger nachgewiesen werden. Dies scheint u.a. an Unterschieden der EZM, der Botenstoffe und der Entzündungsreaktionen, sowie Unterschieden in der Genexpression und der Funktion von Stammzellen zu liegen. Die Unterschiede in der EZM betreffen vor allem die Art und Organisation des Kollagens, das in Föten eine netzartige feine Struktur, ähnlich der natürlichen Haut, bildet [12]. Insgesamt fällt die Entzündungsantwort geringer aus als bei adulten Organismen, da in der fötalen Wunde die Zellen insgesamt undifferenzierter sind und andere Wachstumsfaktoren (u.a. jene für die Morphogenese) vorliegen. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass *TGF- β 3* die Narbenbildung verringert. *TGF- β 3* liegt bei der fötalen Wundheilung in großen Mengen vor. *TGF- β 1* und *TGF- β 2* hingegen liegen in geringen Mengen vor. Bei der adulten Wundheilung verhält sich dies genau umgekehrt. Zudem fällt die Entzündungsphase in der fötalen Wundheilung nicht nur geringer, sondern auch kürzer aus, was insgesamt zu einer wesentlich besseren Wundheilung führt. In Mausmodellen, die nicht über funktionelle Makrophagen oder neutrophile Granulozyten verfügen, konnte gezeigt werden, dass die nicht vorhandene Entzündungsreaktion in diesem Fall zu einer verringerten Narbenbildung führt [9,12]. Das

höher ausgereifte Immunsystem eines ausgewachsenen Organismus führt hingegen zu einer wahrscheinlichen Narbenbildung bei größeren Verletzungen [8].

Eine Gruppe von Wirbeltieren, die auch im ausgereiften Entwicklungsstadium zur narbenfreien Wundheilung befähigt ist, sind die Schwanzlurche, im Besonderen die Salamander und Molche. Das am besten untersuchte Tier in dieser Gruppe ist der Axolotl. Neben einer narbenfreien Wundheilung an der gesamten Körperoberfläche zeichnet sich der Axolotl auch dadurch aus, Gliedmaßen, Schwänze und Teile von inneren Organen, des Auges und des Gehirns, regenerieren zu können.

2.1.2.1. Wundheilung und Regeneration der Gliedmaßen beim Axolotl

Der Axolotl (*Ambystoma mexicanum*; Abbildung 2.2) ist ein Schwanzlurch, der seine Geschlechtsreife erreicht, ohne den sonst bei Amphibien üblichen Schritt der Metamorphose zu durchlaufen. Dieser Prozess wird als Neotenie bezeichnet und der Axolotl kann somit als Dauerlarve bezeichnet werden. Sein natürliches Habitat hat der Axolotl in Seen rund um Mexiko-Stadt. Die Forschung an und um den Axolotl begann sehr früh. Bereits 1804 sendet Alexander von Humboldt die ersten in Alkohol konservierten Tiere nach Europa. 1864 erreichten schließlich die ersten lebenden Tiere den europäischen Kontinent und wurden fortan für die unterschiedlichsten Forschungsvorhaben im Bereich der Entwicklungsbiologie und Regeneration genutzt [15].



Abbildung 2.2: *Ambystoma mexicanum* in der Laborhaltung; Quelle: *Ambystoma Mexicanum Bioregeneration Center*, Medizinische Hochschule Hannover

Der Axolotl ist ein ideales Beispiel um die Mechanismen zu studieren, die eine narbenfreie Wundheilung in Wirbeltieren herbeiführen können. Dazu eignet sich sowohl die reine

Wundheilung des Axolotls nach Verwundung, als auch die Regeneration von Gliedmaßen nach Amputation. Die Regeneration von Gliedmaßen beginnt ebenfalls mit dem Schritt der Wundheilung, gefolgt von einer Dedifferenzierung von Zellen und der Neubildung der Gliedmaße.

Die Wundheilung im Axolotl verläuft sehr schnell. In Versuchen konnte bereits eine Stunde nach Verwundung ein Start der Migration der epidermalen Zellen zum Verschluss der Wunde beobachtet werden. Vier bis acht Stunden nach Verwundung ist bereits ein Großteil der Wunde mit Zellen bedeckt [16]. Die schnelle Bildung dieser Schicht unterbindet die weitere Verletzung von Gewebe, Infektionen und Entzündungsreaktionen. In Versuchen während der Wundheilung konnten nur sehr wenige Neutrophile detektiert werden, was auf eine sehr geringe Entzündungsantwort schließen lässt [16]. Auch während der Wundheilung im Axolotl tritt vorübergehend eine Gewebefibrose auf, jedoch führt eine Umstrukturierung des dabei gebildeten Gewebes zur Ausbildung einer normalen Hautstruktur [17]. Diese Fähigkeit komplexe Gewebe zu regenerieren scheint somit entscheidend für die Fähigkeit zu sein, Wunden narbenfrei zu heilen [18]. Die genauen Mechanismen dieser Umstrukturierung sind noch nicht erforscht. Dem fötalen Regenerationsprozess in Säugern ist ähnlich, dass die Effizienz des Reepithelisierungsprozesses eine entscheidende Rolle spielt. Im Axolotl findet diese Reepithelisierung innerhalb der ersten zwölf Stunden nach Verletzung statt. Bei fötalen Säugern hingegen dauert dieser Prozess zwischen 48 und 72 Stunden und bei nicht-fötalen Säugern sogar mehrere Tage bis Wochen [8,13,19]. Jedoch führen sowohl die Prozesse in menschlichen Föten als auch im Axolotl zu einer narbenfreien Wundheilung.

Die Regeneration von Extremitäten bei Amphibien, insbesondere den Schwanzlurchen, läuft über die Bildung eines Blastems bestehend aus undifferenzierten, mesenchymal-ähnlichen Zellen an der Stelle der Verwundung ab [13,20]. Diese Zellen sind nach der Verletzung aus dem reifen, unverletzten Gewebe dedifferenziert. Dadurch sind sie in der Lage in unterschiedliche neue Zelltypen zu differenzieren. Schließlich entwickelt sich aus diesen Zellen die Gliedmaße, ähnlich der ursprünglichen embryonalen Entwicklung [8]. Die Ausbildung des Blastems beginnt nach dem Verschluss der Wunde im Rahmen der Wundheilung. Mit Eintreten der Wundheilung ist zwölf Stunden nach der Amputation der Bereich rund um die Amputation mit einer dünnen Schicht aus Epithelzellen bedeckt. Das differenzierte Gewebe, welches die Amputationsstelle umgibt, wandelt sich in ein Blastem

um. Dabei findet zusätzlich eine Umstrukturierung der EZM statt. Diese erste Phase der Regeneration von Gliedmaßen unterscheidet sich somit nicht komplett von der gemeinen Wundheilung bei anderen Organismen, jedoch läuft dieser Prozess bei Amphibien wesentlich schneller ab [19].

In der Dedifferenzierungsphase (sechs bis 20 Tage nach der Verwundung) wird das Wundepithel (WE) als Antwort auf Nervensignale dicker und entwickelt sich zum so genannte *Apical Epithelial Cap* (AEC) [21]. Das gebildete AEC ist wiederum notwendig für die Bildung eines Blastems aus undifferenzierten mesenchymalen Zellen, die durch Dedifferenzierung von bereits vorhandenem Gewebe entstehen [19]. Dabei findet eine Dedifferenzierung von Keratinocyten und Fibroblasten statt. Die basalen Keratinocyten produzieren Signale, die wiederum Fibroblasten des Bindegewebes rekrutieren, die das frühe Blastem ausbilden. Insgesamt ist die neuro-epitheliale Interaktion während der Wundheilung im Salamander dafür verantwortlich, dass die Zellen des Bindegewebes des Stumpfes und der umgebenden Haut rekrutiert werden, um das frühe Blastem auszubilden (Migration gefolgt von Proliferation der dedifferenzierten Zellen) (Abbildung 2.3, B) [18]. Das aus Progenitorzellen bestehende Blastem dient als Ausgangslage für die weiteren Entwicklungen [14]. Für die Ausbildung des Blastems scheinen einige Vorgänge essentiell zu sein. So sind u.a. die Entzündungssignale der Makrophagen (jedoch keine Neutrophile) und die nervliche Verknüpfung für die Ausbildung eines Blastems notwendig. Insgesamt scheint ein System aus Makrophagen und simultaner Induktion von inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen notwendig für die Einleitung des Regenerationsprogrammes zu sein. Die Makrophagen sind in die Vorgänge der Dedifferenzierung und der Bildung des Progenitorzellpools involviert [22]. Diese Signale sind notwendig, um Veränderungen im Wundepithel hervorzurufen, die eine Bildung des Blastems initiieren [17]. Zusätzlich hat sich gezeigt, dass Nervensignale für die Prozesse der Wundheilung und die darauffolgende Bildung des WE/AEC essentiell sind. So sind sie sowohl für die Initiierung der Blastemausbildung als auch für das anschließende Wachstum und die Entwicklung des Blastems verantwortlich [18]. Die Signale des AEC umfassen u.a. Wachstumsfaktoren. Des Weiteren sind Enzyme notwendig, die die EZM abbauen, die an den Wundbereich angrenzt. Dadurch soll das angrenzende Gewebe aufgelöst werden um die darin befindlichen Zellen über Signale des AEC zu rekrutieren. Diese migrieren und sammeln sich unterhalb des AEC. Die sich sammelnden Zellen enthalten unterschiedliche positionelle Informationen (abhängig von ihrer vorherigen Lage). Diese Informationen in

Kombination mit der Interaktion der Zellen untereinander ist notwendig, um eine Gliedmaße mit einer korrekten Struktur auszubilden [18]. Im Vergleich zur nicht-regenerativen Wundheilung benötigen die Prozesse zur Regeneration von Gliedmaßen in jedem Fall eine Versorgung mit Nerven [19]. Dies konnte ebenfalls in Versuchen gezeigt werden, in denen Nerven an den Ort einer Verwundung geleitet wurden (Verwundung seitlich an der Gliedmaße). Ohne Nervenversorgung hätte die reguläre narbenfreie Wundheilung des Axolotls stattgefunden. Durch die Versorgung mit Nerven bildete sich jedoch ein Blastem aus und die Regeneration wurde eingeleitet [17].

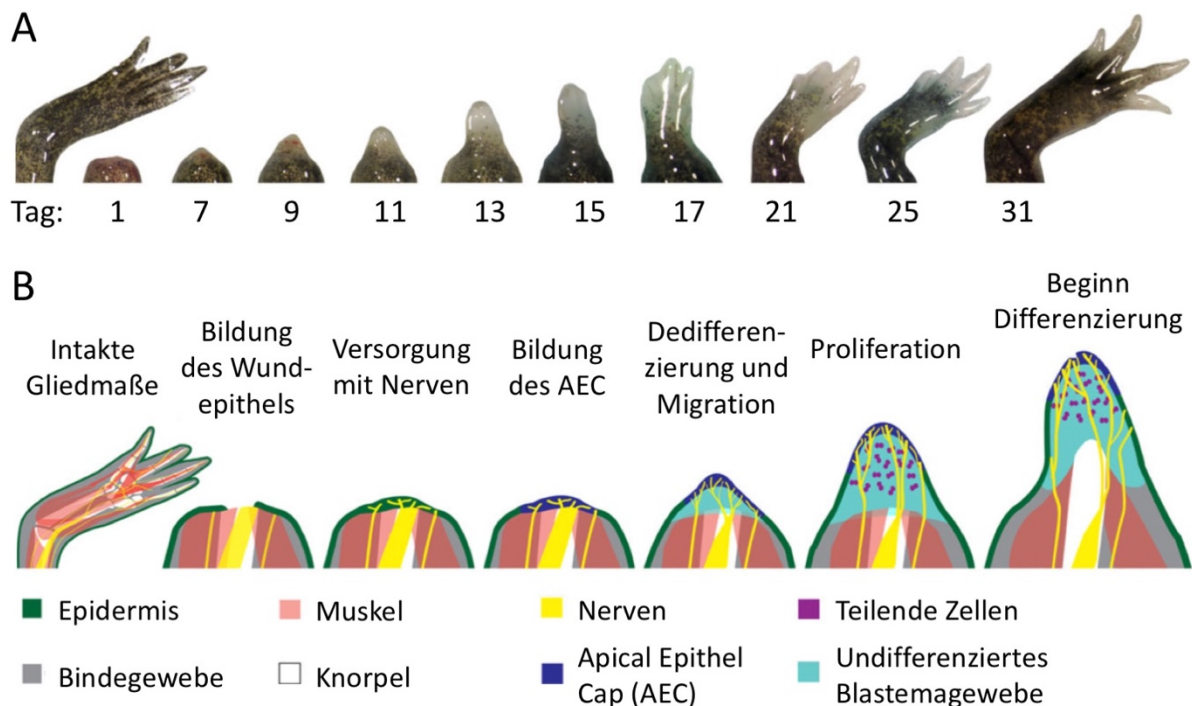


Abbildung 2.3: Regeneration einer Gliedmaße beim Axolotl; A: Originalbilder der Regeneration des Axolotl, von links: ursprüngliche Gliedmaße und 1 bis 31 Tage nach Amputation; B: Schematische Darstellung der Schritte der Blastementwicklung während der Regeneration beim Axolotl; modifiziert nach [18]

Die Neuentwicklung der Gliedmaße (21 bis 30 Tage nach der Verwundung) entsteht schließlich aus dem Blastem (Abbildung 2.3, A). Diese wächst über den kompletten Zeitraum der Gliedmaßenentwicklung distal mittels Zellproliferation weiter. Dabei findet eine Interaktion zwischen dem AEC und dem Blastem über Wachstumsfaktoren statt. Während des Prozesses dieser distalen Zellproliferation findet zusätzlich eine Redifferenzierung der Zellen des Blastems statt, sodass eine komplett funktionelle Gliedmaße entstehen kann [19]. Insgesamt lässt sich sagen, dass der Prozess zur

Regeneration von Gliedmaßen bzw. von größeren Gewebebereichen im Axolotl sowohl Struktur (z.B. Bindegewebe) als auch Informationen zum richtigen Muster dieser Strukturen benötigt. Im Prozess der Regeneration von Gliedmaßen bei Amphibien, der der fötalen Regeneration von Säugern ähnelt, konnte keine erhöhte Bildung von *TGF- β 3* nachgewiesen werden [12,23]. Die späte Phase der Regeneration ähnelt vielmehr der ursprünglichen Entwicklung der Gliedmaße [17].

Lange Zeit wurde angenommen, dass die außerordentliche Regenerationsfähigkeit des Axolotls damit zusammenhängt, dass dieser nicht die komplette Metamorphose durchläuft und dadurch die Zellen ihren embryonalen Charakter beibehalten. Dies konnte jedoch widerlegt werden. Es konnte gezeigt werden, dass auch nach einer von außen induzierten Metamorphose des Axolotls dieser noch zur Regeneration befähigt ist. Allerdings laufen die entsprechenden Vorgänge im Vergleich zu Tieren, die nicht die Metamorphose durchlaufen haben, langsamer ab [24,25].

2.2. Lipoxygenasen und ihre Rolle in der Wundheilung

Im Rahmen der narbenfreien Wundheilung und Regeneration im Axolotl konnte neben Wachstumsfaktoren und weiteren signalgebenden Molekülen auch eine Lipoxygenase detektiert werden, die maßgeblich an der Regeneration beteiligt zu sein scheint [6]. Die Arbeitsgruppe um Menger *et al.* konnte die Lipoxygenase AmbLOXe (*Axolotl* homologue of *epidermis-type amphibian epidermal lipoxygenase*) sowohl in Hautzellen als auch im sich ausbildenden Blastem detektieren. In anderen Zellproben (Muskelgewebe, Gehirn und Blutzellen) konnte das entsprechende Protein nicht nachgewiesen werden. Phylogenetische Analysen zeigten dabei, dass AmbLOXe zur Klasse der Lipoxygenasen gezählt werden kann und es sich um ein Homolog der menschlichen epidermalen Lipoxygenase ALOXe3 handelt. Aufgrund der Homologie wird für beide eine wichtige Rolle in der Wundheilung vermutet [6].

Lipoxygenasen (LOX) im Allgemeinen sind eine Klasse von Enzymen, die die Reaktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit molekularem Sauerstoff katalysieren (Dioxygenasen). Die Dioxygenierung findet dabei zumeist an einem 1,4-cis-cis-Pentadiensystem statt. In Säugern ist das prozessierte Substrat häufig Arachidonsäure und in Pflanzen Linolsäure. Die aus den katalysierten Reaktionen entstehenden Produkte, Hydroperoxidfettsäuren, werden zumeist zu den entsprechenden Hydroxyderivaten weiter

prozessiert [26]. LOX sind in ihren Domänen und Sequenzmotiven hoch konserviert und konnten bisher in Eukaryoten und Bakterien nachgewiesen werden [27,28].

Strukturell bestehen Lipoxygenasen aus einer einzelnen Polypeptidkette (bei Säugern: 75 bis 81 kDa; bei Pflanzen: 94 bis 104 kDa), die sich in zwei Domänen faltet [29]. Die kleiner N-terminale PLAT-Domäne (Polycystein-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin-Domäne; ca. 15 kDa) besteht aus mehreren parallelen und anti-parallelen β -Faltblättern (siehe auch Abbildung 3.3). Diese Domäne ist u.a. für die Regulierung der Aktivität zuständig. Die C-terminale Domäne besteht aus mehreren Helices und enthält ein nicht-Häm Eisen und das katalytische Zentrum [30–32]. Das Eisen bildet mit vier konservierten Histidinen und der Carboxygruppe eines konservierten Isoleucins einen Komplex aus. Die sechste Position des Eisens ist oftmals mit einem Wassermolekül besetzt. Dieses so gebundene Eisen fungiert als Cofaktor [26].

Die Benennung der LOX erfolgt teils auf Grundlage des Ortes der Dioxygenierung am Substrat (12-LOX etc.), teils auf Grundlage ihrer Funktion (z.B. epidermale Lipoxygenase). Die Produkte, der durch die verschiedenen Lipoxygenasen katalysierten Reaktionen, sind unterschiedliche bioaktive Lipidmediatoren (z.B. Leukotriene oder Lipoxine) [33]. Lipoxygenasen sind in unterschiedlichsten Vorgänge im Körper involviert (Bildung der roten Blutkörperchen, Krebs, Entzündungsvorgänge, Regulation des Blutdrucks, Funktionen des zentralen Nervensystems, Diabetes, Infektionskrankheiten etc.) Für weitere Details sei hier auf die entsprechenden einschlägigen Review Paper verwiesen [29,33,34].

Die im Rahmen dieser Arbeit genauer beleuchteten Lipoxygenasen sind AmbLOXe und ALOXe3. Neben diesen beiden Lipoxygenasen konnte auch für andere Lipoxygenasen bereits gezeigt werden, dass diese in der Wundheilung eine wichtige Rolle spielen und die Reparatur eines Gewebes, beispielsweise der Cornea fördern. Die Cornea von Säugertieren zeigt eine hohe Regenerationsfähigkeit, in die Lipidmediatoren, die von Lipoxygenasen prozessiert werden, involviert zu sein scheinen [35–37].

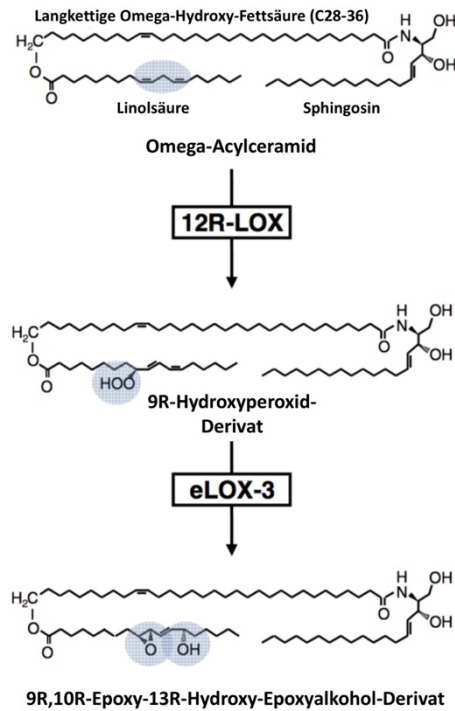


Abbildung 2.4: Von Lipoxygenasen katalysierte Oxidation von Acylceramid; der Linoleatrest des veresterten Omega-Hydroxyacylsphingosins wird durch 12R-LOX zum 9R-Hydroxyperoxid-Derivat oxidiert und durch ALOXe3 zum 9R,10R-Epoxy-13R-Hydroxy-Epoxyalkohol-Derivat umgesetzt; diese Umsetzungen sind notwendig um eine anschließende Hydrolysereaktion und die kovalenten Bindung der Omega-Hydroxyceramide an die Proteine der Hülle der Corneocyten zu ermöglichen; modifiziert nach [32]

In Säugern konnte gezeigt werden, dass ein Stoffwechselweg, an dem u.a. auch ALOXe3 beteiligt ist, für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut notwendig ist. Dabei ist die epidermale Lipoxygenase ALOXe3 vor allem an dem Aufbau und der Erhaltung der äußersten Hautschicht (*Stratum corneum*) beteiligt. Diese Schicht besteht aus Corneocyten, spezialisierte Zellen, die sich aus Keratinocyten entwickeln. Die Corneocyten sind in eine kompakte extrazelluläre Matrix eingebettet, die aus querverlinkten Proteinen und Lipiden (Ceramiden) besteht [38]. Zur Ausbildung dieser speziellen Ceramide katalysiert eine 12R-LOX die Dioxygenierung eines Omega-Acylceramids und die epidermale Lipoxygenase ALOXe3 als Hydroperoxidisomerase prozessiert das daraus resultierende Produkt zu einem Epoxyalkohol (Abbildung 2.4). Beide Enzyme sind deswegen vor allem in den differenzierten Schichten der Haut zu finden [32]. Die Linolsäure in Ceramiden ist dabei das natürliche Substrat der 12R-LOX und das daraus resultierende Produkt wird durch ALOXe3

umgesetzt, weiter prozessiert und kovalent an die Proteine der Corneocytenoberfläche gebunden und formt somit deren Lipidhülle, die essentiell für die Barrierefunktion der Haut ist. Die Aufrechterhaltung der epidermalen Wasserbarriere hängt somit von der Funktionalität der 12R-LOX und ALOXe3 ab [39,40]. Die Hydroperoxidaseaktivität von ALOXe3 konnte für Hydroperoxide (2:1 Ratio von Epoxyalkoholen und Ketoderivaten als Produkte) unterschiedlicher Art gezeigt werden, wobei Produkte der 12R-LOX bevorzugt werden [41,42]. Neben ihrer Funktion als Hydroperoxidisomerase konnte für ALOXe3 auch eine latente Dioxygenaseaktivität, die für die meisten LOX die hauptsächlich katalysierte Reaktion darstellt, nachgewiesen werden. Diese Aktivität zeigte sich jedoch nur nach einer langen lag-Phase oder bei Zusatz von Hydroperoxidaktivator [43]. Somit handelt es sich bei ALOXe3 nicht um eine typische Lipoxygenase.

Die genauen Mechanismen der epidermalen Lipoxygenase AmbLOXe aus dem Blastem der Gliedmaße des Axolotls sind noch nicht aufgeklärt. In den Studien von Menger *et al.* (2011) konnte gezeigt werden, dass AmbLOXe einen positiven Effekt auf die Wundheilung zu haben scheint. Dazu wurden Keratinocyten (HaCaT Zellen) und humane Osteosarkomazellen (U2-OS Zellen) mit einem Vektor, der die AmbLOXe Sequenz enthält, transfiziert und ihre Migration beobachtet. Dabei zeigte sich, dass die mit AmbLOXe transfizierten Zellen eine gesteigerte Migrationsrate im Vergleich zu Kontrollen aufweisen. Dass dies auf die Lipoxygenaseaktivität von AmbLOXe zurückzuführen ist, konnte durch die Anwendung von LOX Inhibitoren bei den entsprechenden Experimenten gezeigt werden [6]. Zusätzlich wurden in einer *in vivo* Studie Vollhautwunden in Mäusen mit Mausfibroblasten behandelt, die mit AmbLOXe transfiziert waren. Dabei konnte auch eine gesteigerte Wundheilung im Vergleich zu Kontrollen beobachtet werden [44]. Aus den gesteigerten Migrationsraten wurde geschlossen, dass AmbLOXe einen Einfluss auf die Proliferation und Migration von Zellen hat. Phylogenetische Analysen zeigten dabei, dass es sich um ein Homolog von ALOXe3 zu handeln scheint [6]. Die Lipoxygenase AmbLOXe und ihre mögliche Anwendung in der Wundheilung wurden bereits entsprechend patentiert [45].

2.3. *In vitro* Wundheilungsassay

Wundheilungsassays werden genutzt, um die molekularen Mechanismen der Wundheilung und mögliche Therapeutika und Behandlungen genauer zu untersuchen. In den vergangenen Jahren und Jahrzehnten wurden viele Modelle zur Untersuchung der

Wundheilung entwickelt. Da während der Wundheilung Zellen proliferieren und migrieren, setzen Assays, die die Wundheilung untersuchen genau an dieser Stelle an. Im Rahmen der Assays wird eine konfluente Zellschicht unter definierten Bedingungen verletzt und die anschließende Migration der Zellen in den verletzten Bereich beobachtet. Im Folgenden werden einige dieser Assaymodelle exemplarisch dargestellt und ihre Vor- und Nachteile diskutiert. Dabei wird sich jedoch auf die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Methoden beschränkt. Für zusätzliche Informationen zu weiteren Assays sei an dieser Stelle auf die einschlägigen Review Paper verwiesen [46–48].

2.3.1. Wundheilungsassays

2.3.1.1. *Scratch Assay*

Das *Scratch Assay* nutzt eine mechanische Methode zu Verwundung einer konfluenten Zellschicht. Dabei ist es das am häufigsten genutzt Assay im Rahmen der Wundheilung. Dies hängt vor allem mit dem einfach anzuwendenden Protokoll zusammen und den eingesetzten Materialien, die in jedem Standardlabor vorhanden sind. Die Zellschicht wird im *Scratch Assay* mit einem scharfen Objekt (z.B. Pipettenspitze, Zahnstocher oder Zellschaber) verletzt [49–52] (Abbildung 2.5). Das *Scratch Assay* ist somit oftmals die Methode erster Wahl und Neuentwicklungen im Bereich der Wundheilungsassays werden oftmals mit diesem Assay verglichen. Viele andere Assays bauen auch auf das Grundprinzip des *Scratch Assays* auf und implementieren, zur Förderung eines höheren Durchsatzes und einer größeren Reproduzierbarkeit, Automationsschritte [53–55]. Der größte Nachteil des *Scratch Assays* ergibt sich nämlich durch die zumeist manuelle Durchführung, die zu großen Irregularitäten der Ausgangswundgrößen führt. Zusätzlich kann die Beschichtung der Zellkulturoberfläche durch den Kratzvorgang beschädigt werden [56]. Ebenfalls können sich Zellen am Rand der Wundfläche akkumulieren und somit den Migrationsvorgang und die Datenanalyse beeinflussen [57].

Andere mechanische Zellverwundungsmethoden nutzen eine Art Stempel, auf den eine Kraft ausgeübt wird und der dadurch die darunterliegenden Zellen verletzt [58,59]. Dabei können auch unterschiedliche Muster, die sich auf dem Stempel befinden, eingebracht werden. Auch für diese Art von Assay stellt die manuelle Kraftausübung auf den Stempel den größten Nachteil dar, da es auch hier zu Irregularitäten kommen kann. Eine zusätzliche Ergänzung zu dieser Methode stellt die thermo-mechanische Verwundung mit einem

Stempel mit Temperaturkontrolle dar (Abbildung 2.6). Dadurch können beispielsweise auch Verbrennungen durch den Kontakt mit heißen Oberflächen rekonstruiert werden und differenziert werden zwischen mechanischen und thermo-mechanischen Verletzungen [60]. Ein Nachteil dieser Methode ist durch einen möglichen unkontrollierten Hitzetransfer auf die Zellumgebung gegeben, der wiederum einen negativen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit haben kann.

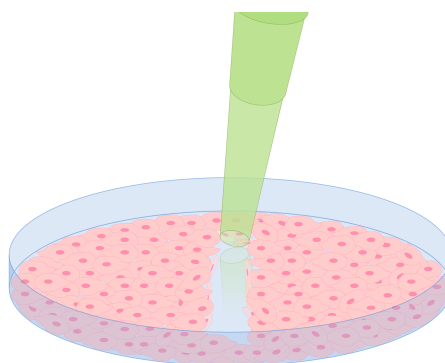


Abbildung 2.5: Scratch Assay; eine konfluente Zellschicht wird mit einem scharfen Gegenstand (z.B. Pipettenspitze) verletzt

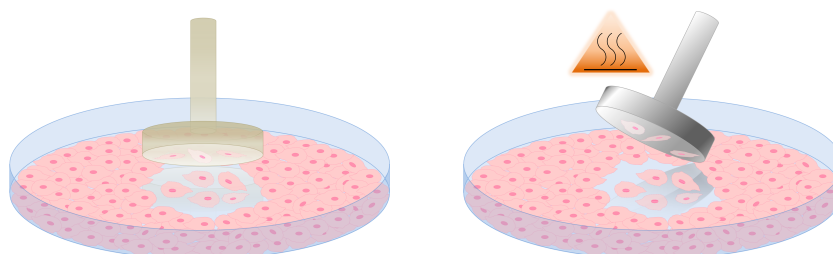


Abbildung 2.6: Weitere mechanische Verwundungsmethoden; Nutzung eines Stempels (links) oder eines temperaturkontrollierten Stempels (rechts) im Rahmen eines Wundheilungsassays

2.3.1.2. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)

Die Impedanz bezeichnet ganz allgemein den Wechselstromwiderstand, also das Verhältnis der elektrischen Spannung an einem Verbraucher im Vergleich zur aufgenommenen Stromstärke. Die Plasmamembran von Zellen wirkt isolierend, somit leiten die Zellen elektrische Impulse nicht weiter. Besiedeln Zellen beispielsweise eine Elektrode und adhären an dieser, wirkt sich das entsprechend auch auf das an dieser Elektrode

gemessene Impedanzsignal aus: es steigt an. Mit der *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)* Methode lassen Veränderung der gemessenen Impedanz-, Widerstands- und Kapazitätswerte Rückschlüsse auf Veränderungen im zellulären Verhalten von Zellen, die sich auf solch einer Elektrode befinden, zu. Bei dieser Methode wird der Impedanzwert einer mit Gold überzogenen Elektrode als Funktion der Zeit aufgenommen. Die adhärennten Zellen innerhalb des Wells interagieren mit der Matrix (Elektrode) und Veränderung in dieser Interaktion wirken sich auf das gemessene Signal aus. Dabei können sogar minimale Veränderungen, beispielsweise in der Zellform durch chemische, biologische und physikalische Einflüsse, gemessen werden. Das Grundprinzip, nach welchem die Besiedlung von Zellen auf solch einer mit Gold bedampften Elektrode das gemessene Impedanzsignal verändert, konnte von Giaever und Keese erstmal 1984 nachgewiesen werden [61]. Weitere Veröffentlichung untersuchten dieses Verhalten detaillierter und zeigten bereits erste weiterführende Anwendungen auf. Es etablierte sich schließlich der Begriff *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)* [62]. Darauf folgende Entwicklungen führten dazu, dass das Anwendungspotential von *ECIS* zur Elektroporation von Zellen [63] und schließlich auch zur Nutzung in Wundheilungsassays [64] erkannt wurde.

Die Messung des Impedanzsignals erfolgt bei einer Stromstärke von weniger als einem Mikroampere. Dieses Wechselstromsignal fließt dabei zwischen der Messelektrode und einer größeren Gegenelektrode. Das Zellkulturmedium fungiert als Elektrolyt. Adhärennten Zellen auf der Elektrode und verteilen sich auf dieser, behindern sie den Stromfluss zwischen der Mess- und der Gegenelektrode. Die Messung ist dabei nicht-invasiv, da die geringe Stromstärke die Zellen nicht beeinflusst. Ist eine konfluente Zellschicht vorhanden, bleibt das Impedanzsignal relativ konstant, schwankt jedoch in einem minimalen Impedanzbereich von mehreren hundert Ohm aufgrund der dynamischen Bewegung (*Micromotion*) der Zellen [65]. Je nach gewählter Messfrequenz können unterschiedliche Eigenschaften der auf der Elektrode befindlichen Zellen bestimmt werden. Bei niedrigen Frequenzen (< 2 kHz) fließt der Strom größtenteils an den Zellen vorbei und passiert die Lücken zwischen den Zellen. Somit können in diesem Frequenzbereich vor allem Veränderungen der Zellen (Form, Größe etc.) beobachtet werden. Bei höheren Frequenzen (> 40 kHz) fließt der Strom durch die Zellen hindurch und ermöglicht so vor allem die Besiedlung der Elektrode mit Zellen zu untersuchen. Zusätzlich existieren mathematische Modelle, um unterschiedliche morphologische Parameter, wie beispielsweise den Abstand

zwischen den Zellen, den Abstand zwischen Zellen und Elektrode und die Kapazität der Zellmembran berechnen zu können [65–67].

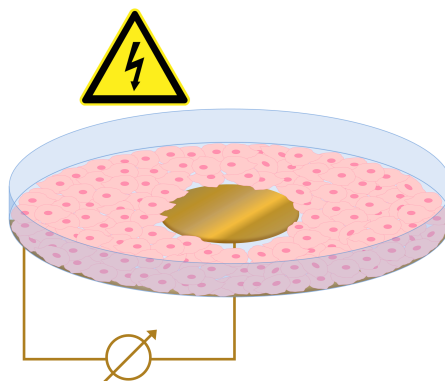


Abbildung 2.7: Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS); Zellen einer konfluenten Zellschicht werden im Bereich einer Elektrode durch Anlegen eines erhöhten Stromimpulses verletzt und die Neubesiedlung der Elektrode über das Impedanzsignal verfolgt

Um die *ECIS* Technologie für ein Wundheilungsassay zu nutzen, wird zunächst das Heranwachsen einer konfluenten Zellschicht über das Ansteigen des Impedanzsignals beobachtet. Durch Anlegen eines erhöhten Stromimpulses über einen längeren Zeitraum findet eine irreversible Elektroporation der Zellen auf der Elektrode statt, die schließlich zum Absterben dieser Zellen führt (Abbildung 2.7). Diese Verwundung der Zellen im Bereich der Elektrode kann über den Abfall des Impedanzsignals beobachtet werden [64,68]. Vorteile dieser Methode zur Wundheilung beinhalten vor allem die Echtzeitmessung mit der das Zellwachstum vor und nach Verwundung, sowie die Verwundung selbst, dokumentiert werden kann. Nachteile umfassen vor allem, dass Zelltypen, die zu starker Adhärenz neigen (z.B. Fibroblasten und Keratinocyten) den Verwundungsprozess erschweren können und somit zu Irregularitäten führen können. Zusätzlich muss im Vergleich zum traditionellen *Scratch Assay* spezialisiertes Equipment vorhanden sein, um die *ECIS* Technologie nutzen zu können.

2.3.1.3. Culture-Insert Wundheilungsassay

Das im Rahmen dieser Arbeit genutzte *Culture-Insert* Wundheilungsassay gehört zu den so genannten Barriere-Migrations-Assays. Es stellt kein Wundheilungsassay im klassischen Sinne dar. Es wird keine intakte Zellschicht verletzt, sondern durch eine Barriere die Besiedlung eines Bereiches der Zellkulturoberfläche mit Zellen verhindert. Der restliche

Bereich wird mit Zellen besiedelt und nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht wird die Barriere entfernt (Abbildung 2.8). Dadurch, dass Zellen der konfluenten Zellschicht dabei auch an die Barriere selbst adhären können, entsteht auch eine Art von „Wundrand“.

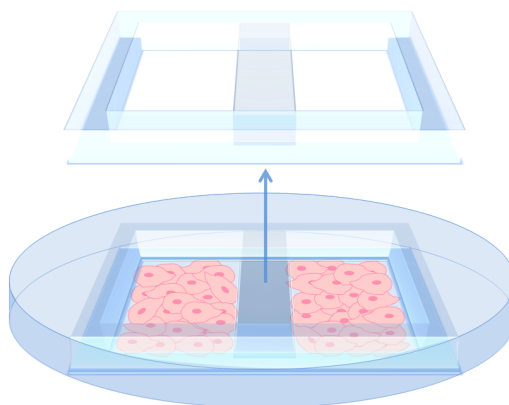


Abbildung 2.8: Culture-Insert Wundheilungsassay; das Culture-Insert wird als Barriere genutzt um einen Wundspalt definierter Breite zu erhalten; hat sich um die Barriere herum eine konfluente Zellschicht gebildet, wird das Insert entfernt

Das Grundprinzip der Barriere-Assays wird schon seit mehreren Jahrzehnten genutzt. Dabei kommen Materialien wie Teflonringe [69], Silikoneinsätze [70] oder auch andere Polymere [71] zum Einsatz. Ein Vorteil dieser Barriere-Methoden ist, dass die Zellkulturoberfläche nicht beschädigt wird, wie dies unter Umständen beim *Scratch Assay* der Fall sein kann [72,73]. Zusätzlich ermöglichen die genutzten *Inserts* die Ausbildung einer reproduzierbaren Wundfläche und je nach Art des genutzten *Inserts* einen hohen Durchsatz.

Neben individuell angefertigten Einsätzen für Barriere-Migrations-Assays existieren auch kommerziell verfügbare Systeme, wie das Oris™ Zell-Migrations-Assay von Platypus, das CytoSelect™ Wundheilungsassay von Cell Biolabs oder die *Culture-Inserts* von Ibidi, die in der vorliegenden Arbeit genutzt wurden.

2.4. Inclusion Bodies: Biologisch aktive Proteinaggregate

Inclusion Bodies (IBs) sind Proteinaggregate, die seit der Einführung von rekombinanten DNA-Technologien bei der heterologen Proteinproduktion in *Escherichia coli* beobachtet werden konnten. Bis vor einigen Jahren wurden *Inclusion Bodies* jedoch als unerwünschtes Nebenprodukt einer heterologen Proteinproduktion in Bakterien betrachtet. Entsprechend fehlte es auch vollkommen an der Charakterisierung dieser. Vielmehr wurde sich darauf

konzentriert, welche Wege es ermöglichen ein heterologes Protein in löslicher Form zu produzieren. Dabei sei an dieser Stelle auf den Abschnitt des experimentellen Teils verwiesen, in dem auf die Faktoren eingegangen wird, die eine löslichen heterologe Produktion beeinflussen können (3.2 Lösliche Produktion von rekombinanten Lipoxygenasen). Mit der erstmaligen genauen Untersuchung und Quantifizierung der Aktivität unterschiedlicher Enzyme, die sich in *Inclusion Bodies* befinden, wurde ein Grundstein für die Nutzung von *IBs* als biologisch aktive Proteinaggregate gelegt. Dabei konnte für manche Enzym *Inclusion Bodies* sogar eine höhere Aktivität als für äquivalente lösliche Enzyme nachgewiesen werden [74].

In der Regel weisen *IBs* eine Größe zwischen 50 und 800 nm auf, können leicht isoliert werden, sind mechanisch stabil und können über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Zur Ausbildung von *Inclusion Bodies* in Bakterienzellen existieren zwei mögliche Modelle: ein oder wenige Moleküle bilden den Ausgangspunkt der Aggregation und die Proteine lagern sich sukzessiv an dieses Gebilde an oder es bilden sich mehrere kleinere Aggregate, die sich zu einem größeren Aggregat zusammenlagern [75]. Ob dieser Prozess passiv oder aktiv stattfindet, ist noch nicht aufgeklärt [76,77]. Ihre genaue Architektur hängt dabei von dem jeweiligen Protein ab, aus welchem sich *IBs* formen und zusätzlich von den Kultivierungs- und Aufreinigungsbedingungen, mit welchen die *IBs* gewonnen werden [78]. Insgesamt ist die Struktur von *IBs* sehr geordnet. Allen *IBs*, unabhängig von dem Protein, ist gemein, dass ihr Grundgerüst β -Blatt-Sekundärstrukturelemente enthält, die fibrilläre Strukturen mit amyloidähnlicher Morphologie ausbilden (Abbildung 2.9). Diese Strukturen sind besonders für die Stabilität der *IBs* wichtig [79]. Es hat sich ein Modell etabliert, in dem die *Inclusion Bodies* als ein Konstrukt beschrieben werden, dass aus dem bereits beschriebenen amyloidalen-fibrillären Grundgerüst (gebildet aus dem heterolog exprimierten Protein) besteht. Dieses wird mit dem heterologen exprimierten Protein, welches teilweise gefaltet ist, „befüllt“ (Abbildung 2.9). Somit bildet ein Teil des Proteins (ca. 20 %) ein stabiles Grundgerüst aus, welches für ein charakteristisches Protein immer eine bestimmte Größe aufweist. Ein anderer Teil liegt als teilweise gefaltetes und natives Protein vor, das aus dem Grundgerüst herausgelöst werden kann [80]. Aus diesem Grund ist der Einsatz von *IBs* als so genannte *Nanopills*, die ein *Drug Delivery System* darstellen sehr interessant. Zusätzlich ist aufgrund ihrer Stabilität und Wiederverwendbarkeit eine Nutzung als immobilisierter Katalysator in der Industrie denkbar.

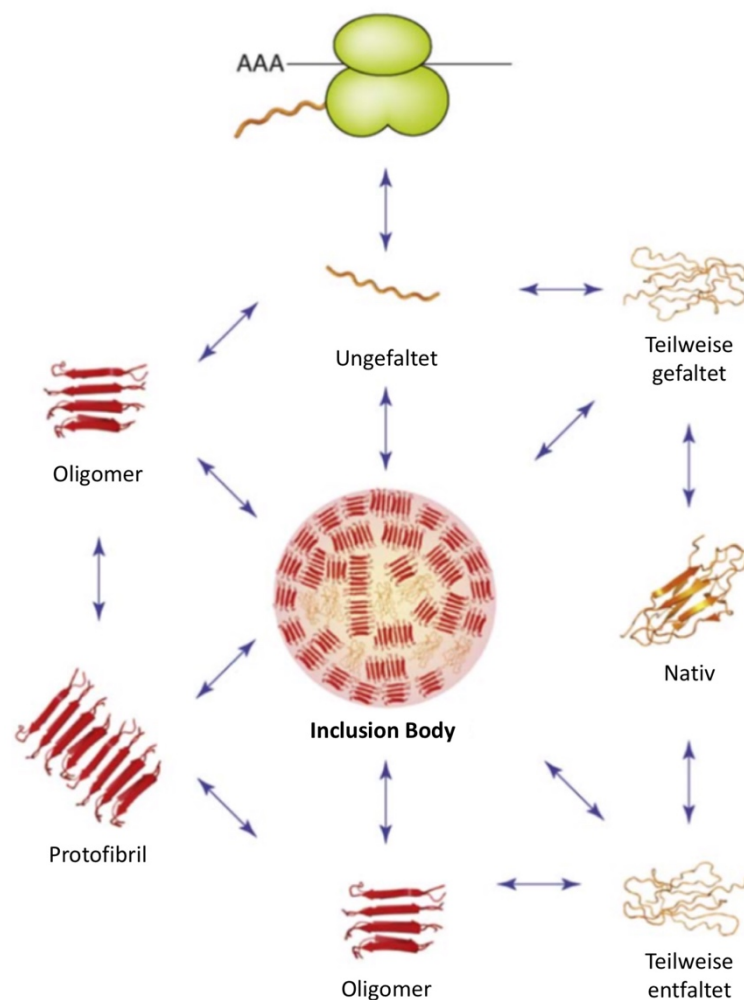


Abbildung 2.9: Inclusion Body Bildung; das durch das Ribosom (grün) entstehende Polypeptid faltet sich regulär in seine native, lösliche Form; die Faltung findet dabei über verschiedene Intermediate statt; zwischen diesen ungefalteten und teilweise gefalteten Intermediaten kann es zu intermolekularen Interaktionen kommen, die zur Ausbildung eines Inclusion Bodies führen; Oligomere mit β -Blatt-Struktur (rot) bilden dabei das Grundgerüst und sind in allen IBs zu finden; modifiziert nach [81]

Das IBs als potentielle *Drug Delivery System* genutzt werden können, konnte bereits gezeigt werden [82,83]. So konnte unter anderem nachgewiesen werden, dass IBs mit der Zellmembran von Säugerzellen in Kontakt treten. Dabei dringen diese bereits zum Teil in die Lipidschicht der Zelle ein und werden schließlich komplett von der Zelle aufgenommen. Innerhalb der Zelle können die IBs Proteine in das Zytosol abgeben und somit an unterschiedlichen Stellen innerhalb der Zelle wirken [84].

Neben einer Verwendung der *IBs* als *Nanopills* und immobilisierte Katalysatoren existieren auch Protokolle zur Proteingewinnung mittels Solubilisierung und Rückfaltung der in den *IBs* befindlichen Proteine. Diese werden in dem entsprechenden Abschnitt des experimentellen Teils genauer erläutert (3.3.2 Solubilisierung und Rückfaltung von Lipoxygenasen aus *Inclusion Bodies*).

3. EXPERIMENTELLE ARBEITEN

3.1. Molekularbiologische Arbeiten

Der erste Teil der experimentellen Arbeiten umfasste die molekularbiologischen Arbeiten. Diese dienen, durch Schaffung eines geeigneten Expressionssystems, als Grundlage für eine Darstellung und Charakterisierung der Lipoxygenasen. Die molekularbiologischen Arbeiten beinhalteten Datenbankrecherchen zur Ermittlung der Gensequenzen der Lipoxygenasen ALOXe3 und AmbLOXe, Optimierung dieser Gensequenzen zur heterologen Proteinproduktion in *Escherichia coli*, Synthese der optimierten Sequenzen und Klonierung der synthetisierten Sequenzen in einen Zielvektor.

Zunächst wurde eine Datenbankrecherche nach bekannten Nukleotidsequenzen der epidermalen Lipoxygenasen ALOXe3 (*Homo sapiens*) und AmbLOXe (*Ambystoma mexicanum*) durchgeführt. Im Rahmen der Entdeckung der Bedeutung von AmbLOXe (*Axolotl* homologue of epidermis-type amphibian epidermal lipoxygenase) für den Axolotl wurde durch Menger *et al.* die Nukleotidsequenz für AmbLOXe mittels reverser Transkription und anschließender Sequenzierung aufgeklärt und in der NCBI Datenbank unter der Zugangsnummer (*accession number*) EU814616 (Protein: ACF33515) hinterlegt [6]. Diese codierende Sequenz wurde als Grundlage für die weiteren molekularbiologischen Arbeiten genutzt. Für ALOXe3 (*Homo sapiens* arachidonate lipoxygenase 3) sind zwei unterschiedliche Transkriptvarianten verfügbar (Transkriptvariante 1: NM_001165960 (Protein: NP_001159432) und Transkriptvariante 2: NM_021628 (Protein: NP_067641)). Ein Alignment dieser beiden Varianten untereinander zeigte, dass sie sich am 5'-Ende der codierenden DNA-Sequenz (bzw. im N-terminalen Bereich des Proteins) unterscheiden und der codierende Bereich der Transkriptionsvariante 1 noch zusätzliche Nukleotide jenseits der Sequenz für die klassischen PLAT-Domäne der Lipoxygenasen aufweist. Dieser zusätzliche „Überhang“ der Transkriptionsvariante 1 zeigte sich auch beim Alignment der beiden Transkriptionsvarianten mit den Sequenzen von AmbLOXe und weiterer Lipoxygenase Sequenzen (15-LOX: NM_001140 bzw. NP_001131 und 12-LOX: NM_000697 bzw. NP_000688). Auf Grundlage der Alignments der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurde deshalb die Transkriptionsvariante 2 von ALOXe3 für weitere molekularbiologische Arbeiten herangezogen.

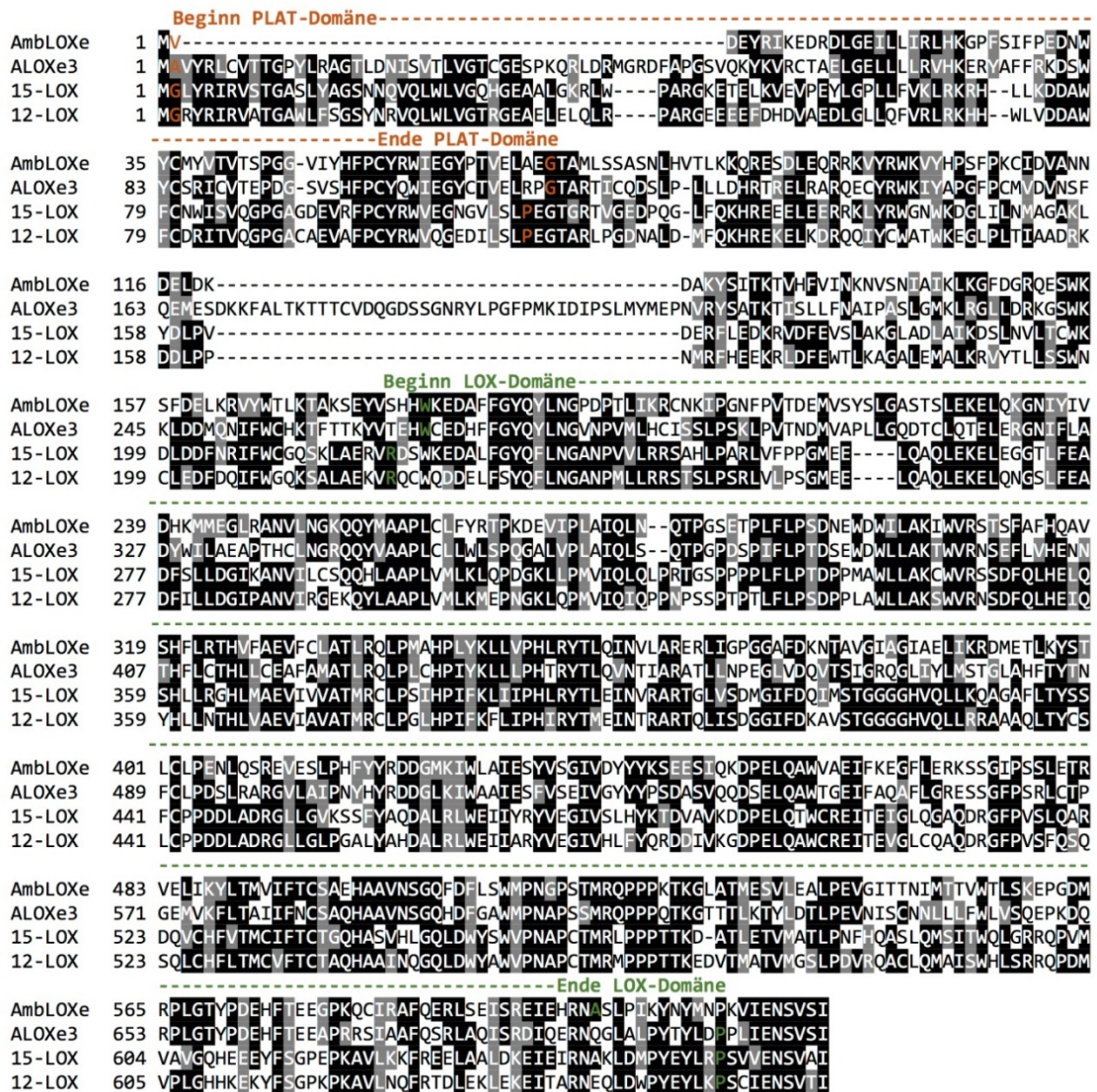


Abbildung 3.1: T-Coffee-Alignment der Proteinsequenzen der Lipoxygenasen AmbLOXe (ACF33515), ALOXe3 (NP_067641), 15-LOX (NP_001131) und 12-LOX (NP_000688); Visualisierung des Alignments mittels BoxShade 3.21; schwarzer Hintergrund zeigt identische Aminosäuren an, grauer Hintergrund zeigt konservative Austausche

Ein Alignment der Proteinsequenzen von AmbLOXe, ALOXe3, 15-LOX und 12-LOX wurde mit dem Programm T-Coffee (default Einstellungen) durchgeführt. Bei diesem nicht-hierarchischen Alignment findet zunächst ein paarweises Alignment der Sequenzen statt. Die daraus resultierende Bibliothek an paarweisen Alignments wird schließlich zu einem Gesamtalignment zusammengeführt [85]. Durch dieses Vorgehen bleiben Positionsinformationen, wie beispielsweise konservierte Domänen, erhalten. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels des Programms BoxShade. Sequenzhomologien

wurden mit dem Outputformat *RTF new*, welches unterschiedliche Graustufen nutzt, dargestellt (Abbildung 3.1).

Das Alignment hebt vor allem die Sequenzhomologien im Bereich der katalytisch aktiven LOX-Domäne im C-terminalen Bereich der alignierten Lipoxygenasen hervor. Hier befinden sich viele charakteristische und konservierte Aminosäuren. Die individuellen Sequenzscores der einzelnen Sequenzen im multiplen Sequenzalignment liegen zwischen 95 und 96. Dieser Score gibt an, inwieweit die jeweilige Sequenz in das Gesamtalignment passt. Ein Wert von 100 würde eine komplette Übereinstimmung darstellen. Somit stellen die Werte zwischen 95 und 96 eine hohe Übereinstimmung der einzelnen Sequenzen mit dem Gesamtalignment dar.

Es wurde davon ausgegangen, dass bei den natürlich vorkommenden ALOXe3 und AmbLOXe Enzymen keine Glykosilierungen vorliegen, da für diese Enzyme und äquivalente Lipoxygenasen keine Eintragungen für Glykosilierungen in den entsprechenden Datenbanken zu finden sind (Quelle: UniProt Knowledgebase (UniProtKB)). Dies ist insbesondere wichtig, da *Escherichia coli* (*E. coli*) als Expressionsorganismus gewählt wurde und *E. coli* zu posttranslationalen Modifikationen in diesem Umfang nicht fähig ist. Zusätzlich besteht Grund zu der Annahme, dass beide Proteine keine Disulfidbrücken besitzen. Auch für diese Annahmen wurde entsprechende Datensätze der Lipoxygenasen und verwandter Lipoxygenase in den Datenbanken analysiert. Des Weiteren besitzen beide Proteine eine Größe kleiner 100 kDa. Überschreiten Proteine diese Größe ist eine heterologe Produktion in *E. coli* zumeist nicht mehr möglich, sodass die Proteinproduktion vorzeitig abbricht bzw. diese Proteine in *E. coli* abgebaut werden [86].

Um eine lösliche Expression der gewählten Gensequenzen in *Escherichia coli* zu erreichen, wurde ausgehend von den oben genannten Sequenzen für ALOXe3 und AmbLOXe eine Optimierung auf Grundlage der Codonnutzung in den unterschiedlichen Organismen durchgeführt. Zur händischen Codonoptimierung wurde die Codonnutzung der Ursprungsorganismen (*Homo sapiens* und *Ambystoma mexicanum*) der Codonnutzung des Zielorganismus (*Escherichia coli*) gegenübergestellt (Tabelle mit Codonnutzung: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>) und Triplets auf Grundlage ihrer Häufigkeit ausgetauscht (Beispiel: Wird für Alanin in der Originalsequenz der Code GCT genutzt (mit 27 % am zweithäufigsten in *Homo sapiens* genutzt), wird dieses Triplet gegen das am zweithäufigsten in *E. coli* für Alanin genutzt Triplet, GCC (28 %), ausgetauscht). Hierzu

wurde ein *VBA Tool* erstellt, welches diese Austausch bei einer eingegebenen Sequenz vornimmt und eine entsprechend optimierte Sequenz ausgibt (Abbildung 3.2). Dass solch ein Austausch auf Grundlage der Häufigkeiten sinnvoll ist, wurde bereits in diversen Publikationen gezeigt [87,88]. In diesen wurde ermittelt, dass es zu keiner Verbesserung der Löslichkeit der produzierten Proteine kommt, wenn jeweils nur die am häufigsten genutzten Triplets für eine Aminosäure im Zielorganismus genutzt werden. Wird hingegen der oben beschriebene Ansatz der „Codon Harmonisierung“ verfolgt, konnte gezeigt werden, dass die Löslichkeit verbessert wird [87]. Dies hängt u.a. auch damit zusammen, dass an bestimmten Stellen der Proteinbiosynthese eine Verlangsamung bevorzugt wird, um eine korrekte Faltung zu ermöglichen. An solchen Positionen ist dann der Einbau eines Triplets zu bevorzugen, das nicht häufig genutzt wird und somit nur eine geringe Menge an entsprechenden t-RNAs vorliegt.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	Codonnutzung Zielorganismus				Codonnutzung Ursprungsorganismus											
2	<i>Escherichia coli</i> (BL21(DE3))				<i>Homo sapiens</i>											
3	Codon	Aminosäure	Häufigkeit		Codon	Aminosäure	Häufigkeit		Codon	Aminosäure	Häufigkeit		Codon	Aminosäure	Häufigkeit	
4	TAA	-	0,64	<====>	TGA	-	0,47		ATG	M	1	<====>	ATG	M	1	
5	TGA	-	0,27	<====>	TAA	-	0,3		AAT	N	0,57	<====>	AAC	N	0,53	
6	TAG	-	0,09	<====>	TAG	-	0,24		AAC	N	0,43	<====>	AAT	N	0,47	
7	GCG	A	0,36	<====>	GCC	A	0,4		CCG	P	0,61	<====>	CCC	P	0,32	
8	GCC	A	0,28	<====>	GCT	A	0,27		CCA	P	0,18	<====>	CCT	P	0,29	
9	GCA	A	0,21	<====>	GCA	A	0,23		CCT	P	0,14	<====>	CCA	P	0,28	
10	GCT	A	0,15	<====>	GCG	A	0,11		CCC	P	0,06	<====>	CCG	P	0,11	
11	TGC	C	0,58	<====>	TGC	C	0,54		CAG	Q	0,65	<====>	CAG	Q	0,73	
12	TGT	C	0,42	<====>	TGT	C	0,46		CAA	Q	0,35	<====>	CAA	Q	0,27	
13	GAT	D	0,66	<====>	GAC	D	0,54		CGC	R	0,4	<====>	AGG	R	0,21	
14	GAC	D	0,34	<====>	GAT	D	0,46		CGT	R	0,35	<====>	AGA	R	0,21	
15	GAA	E	0,62	<====>	GAG	E	0,58		CGG	R	0,11	<====>	CGC	R	0,2	
16	GAG	E	0,38	<====>	GAA	E	0,42		AGA	R	0,05	<====>	CGC	R	0,18	
17	TTT	F	0,61	<====>	TTC	F	0,54		CGA	R	0,05	<====>	CGA	R	0,11	
18	TTC	F	0,39	<====>	TTT	F	0,46		AGG	R	0,04	<====>	CGT	R	0,08	
19	GGC	G	0,41	<====>	GGC	G	0,34		AGC	S	0,25	<====>	AGC	S	0,24	
20	GGT	G	0,3	<====>	GGG	G	0,25		TCG	S	0,2	<====>	TCC	S	0,22	
21	GGG	G	0,18	<====>	GGA	G	0,25		AGT	S	0,16	<====>	TCT	S	0,19	
22	GGA	G	0,1	<====>	GGT	G	0,16		TCT	S	0,15	<====>	TCA	S	0,15	
23	CAT	H	0,56	<====>	CAC	H	0,58		TCC	S	0,14	<====>	AGT	S	0,15	
24	CAC	H	0,44	<====>	CAT	H	0,42		TCA	S	0,11	<====>	TGC	S	0,05	
25	ATT	I	0,48	<====>	ATC	I	0,47		ACC	T	0,47	<====>	ACC	T	0,36	
26	ATC	I	0,44	<====>	ATT	I	0,36		ACG	T	0,27	<====>	ACA	T	0,28	
27	ATA	I	0,07	<====>	ATA	I	0,17		ACT	T	0,14	<====>	ACT	T	0,25	
28	AAA	K	0,77	<====>	AAG	K	0,57		ACA	T	0,11	<====>	ACG	T	0,11	
29	AAG	K	0,23	<====>	AAA	K	0,43		GTG	V	0,43	<====>	GTG	V	0,46	
30	CTG	L	0,45	<====>	CTG	L	0,4		GTT	V	0,25	<====>	GTC	V	0,24	
31	TTG	L	0,15	<====>	CTC	L	0,2		GTC	V	0,18	<====>	GTT	V	0,18	
32	TTA	L	0,14	<====>	TTG	L	0,13		GTA	V	0,14	<====>	GTA	V	0,12	
33	CTC	L	0,12	<====>	CTT	L	0,13		TGG	W	1	<====>	TGG	W	1	
34	CTT	L	0,11	<====>	TTA	L	0,08		TAT	Y	0,69	<====>	TAC	Y	0,56	
35	CTA	L	0,03	<====>	CTA	L	0,07		TAC	Y	0,31	<====>	TAT	Y	0,44	
36																

Abbildung 3.2: Screenshot des „Codon Optimizer“ VBA Tools zum Austausch der codierenden Triplets auf Grundlage ihrer Häufigkeiten im Ursprungs- und Zielorganismus

Des Weiteren wurde ein Optimierungsvorschlag von GeneArt als Grundlage genutzt um mit dem GenScript Rare Codon Analysis Tool weitere manuelle Anpassungen (u.a. Optimierung des GC-Gehaltes und der Entfernung von negativen cis-Elementen, Restriktionsschnittstellen sowie directed, inverted und dyat repeats) vorzunehmen.

Neben einer Optimierung der codierenden Nukleotidsequenzen beinhalteten weitere Überlegungen bezüglich der zu synthetisierenden Gensequenzen für ALOXe3 und AmbLOXe auch die Lage eines Histidin-*Tags* (*His-Tags*) zur Aufreinigung und eine anschließende mögliche Abspaltung dieses *Tags* durch Hinzufügen einer Schnittstelle. Dabei musste vor allem die dreidimensionale Struktur der Zielproteine berücksichtigt werden. Da für ALOXe3 und AmbLOXe selbst keine Informationen bezüglich der Struktur verfügbar sind, wurden typische dreidimensionale Strukturen verwandter Lipoxygenasen (12-LOX und 15-LOX) genutzt. Informationen zu diesen dreidimensionalen Strukturen wurden in der Protein Data Bank (PDB) abgerufen und mittels PDB Protein Workshop Viewer visualisiert (Abbildung 3.3). Dabei zeigte sich, dass eine N-terminale Positionierung des Aufreinigungstags bevorzugt werden sollte, da das C-terminale Ende der Lipoxygenasen mittig im katalytischen Zentrum liegt und von allen Seiten umschlossen ist. Eine C-terminale Positionierung wäre somit sowohl bei der Aufreinigung über dieses *Tag* als auch für eine gewünschte Abspaltung des *Tags* hinderlich.

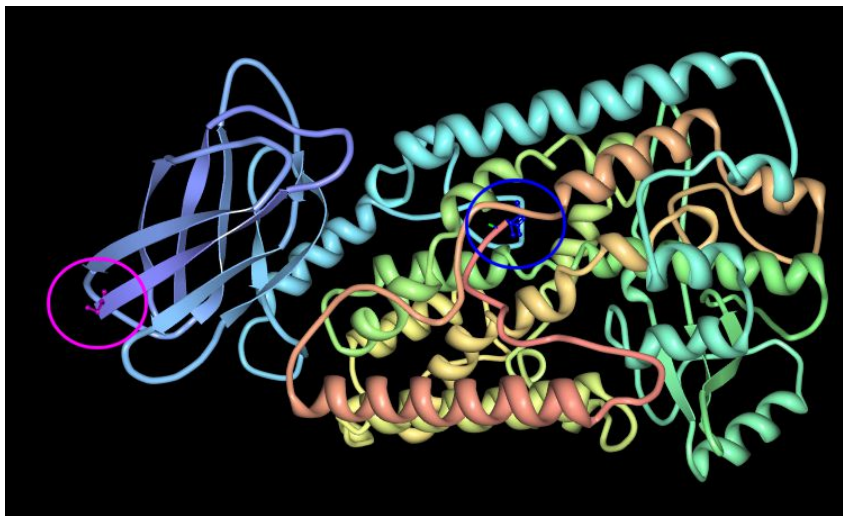


Abbildung 3.3: Dreidimensionale Struktur einer Retikulozyten 15S-Lipoxygenase (PDB ID: 2P0M); am linken äußeren Rand ist in Pink das N-terminale Ende markiert; mittig ist in Blau das C-terminale Ende markiert

Es gibt unterschiedliche kommerziell verfügbare Proteasen zur Abspaltung von *Tags* (z.B. Thrombin, HRV 3C Protease, TEV-Protease). In diesem Fall wurde eine Schnittstelle für die TEV-Protease (*Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase*) eingefügt. Die TEV-Protease schneidet spezifisch zwischen einem Glutamin (Q) und Serin (S) der Erkennungssequenz (ENLYFQ-S). Somit ergibt sich als zusätzlicher Vorteil bei

Positionierung am N-Terminus des Zielproteins, dass nach Abspaltung des *Tags* durch die Protease nur eine zusätzliche Aminosäure verbleibt. Bei einer Positionierung am C-Terminus würden sechs zusätzliche Aminosäuren verbleiben. Zusätzlich ist die Protease des *tobacco etch virus* (TEV) sequenzspezifischer als andere Proteasen [89]. Des Weiteren ist diese Protease kommerziell erhältlich, kann prinzipiell aber auch selbst heterolog hergestellt werden [89].

Auf Grundlage der oben beschriebenen Codonoptimierungen und der Wahl eines *Tags* samt passender Schnittstelle, wurde eine finale Gensequenz gestaltet. Die codonoptimierte Sequenz wurde durch ein *His-Tag* und einer dazwischen liegenden Erkennungssequenz der TEV-Protease am 5'-Ende der codierenden Sequenz ergänzt. Zusätzlich wurde am 5'-Ende eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *NcoI* (mit ATG Start-Codon) und am 3'-Ende eine Sequenz für das Restriktionsenzym *XhoI* eingefügt. Mit Hilfe dieser Restriktionsschnittstellen sollte die designte Gensequenz in den Vektor pET28b(+) kloniert werden. Zwischen den einzelnen Elementen wurden zusätzlich kleine *Spacer* hinzugefügt. Bei Einführung dieser wurde ebenfalls berücksichtigt, dass die anderen Elemente nicht in ihrem Leseraster verschoben werden (Abbildung 3.4; detaillierte DNA-Sequenzen: siehe Anhang).

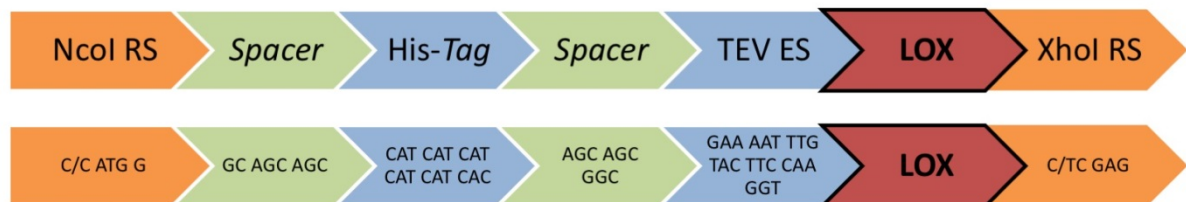


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der designten Gensequenzen; am Beginn und Ende der designten Sequenz befinden sich Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *NcoI* und *XhoI* (RS: Restriktionsschnittstelle); weitere Elemente umfassen die optimierte Lipoxygenasesequenz (LOX), ein *His-Tag* und die Erkennungssequenz (ES) für die TEV-Protease

Diese designten DNA-Konstrukte wurden als Auftragssynthese vom GeneArt® Gensynthese Service der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) hergestellt und in dem Vektor pMK-RQ geliefert. Zur Klonierung wurden mittels der Restriktionsenzyme *NcoI* und *XhoI* die designte Gensequenzen für ALOXe3 und AmbLOXe (jeweils mit

Proteaseerkennungssequenz und His-Tag) aus dem Plasmid pMK-RQ herausgeschnitten. Zusätzlich wurde der Vektor pET28b(+) mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten und alle drei Ansätze jeweils mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 3.5). Anhand ihrer Größe (His-TEV-ALOXe3: 2210 bp, His-TEV-AmbLOXe: 1946 bp, pET28b(+) Plasmidrückgrat: 5231 bp) konnten die gewünschten Fragmente im Gel detektiert werden. Nach Ausschnitt aus dem Gel wurden diese aufgereinigt und die beiden Zielsequenzen jeweils mit dem pET28b(+) Plasmidrückgrat mittels einer T4-DNA-Ligase verbunden. Nach Transformation in *E. coli* TOP10 Zellen zur Plasmidpropagation wurde aus einer positiven Kolonie Plasmid-DNA isoliert und durch eine Auftragssequenzierung (Eurofins Genomics, Ebersberg) überprüft. Dabei konnte für beide Klonierungen (His-TEV-ALOXe3 in pET28b(+) und His-TEV-AmbLOXe in pET28b(+)) eine korrekte Sequenz bestätigt werden (Vektorkarten: Abbildung 3.6). Diese überprüfte Plasmid-DNA wurde in *E. coli* BL21(DE3) Expressionszellen transformiert und in Form von Glycerin-Gefrierkulturen bis zur weiteren Nutzung bei -80 °C gelagert.

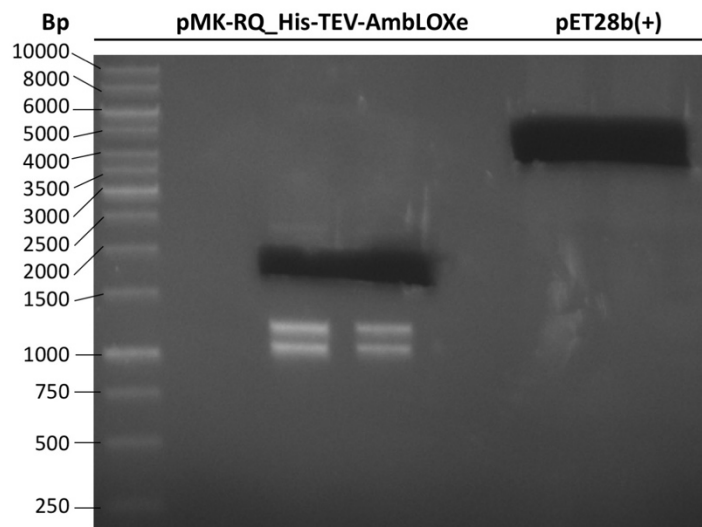


Abbildung 3.5: Agarosegel der elektrophoretischen Auftrennung der mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI geschnittenen Plasmide pMK-RQ_His-TEV-AmbLOXe und pET28b(+); die Abschnitte mit His-TEV-AmbLOXe (2210 bp) und dem pET28b(+) Plasmidrückgrat (5231 bp) sind bereits für die weitere Verarbeitung aus dem Gel herausgetrennt; für die elektrophoretische Auftrennung von pMK-RQ_His-TEV-ALOXe3: siehe Anhang, Abbildung A.2

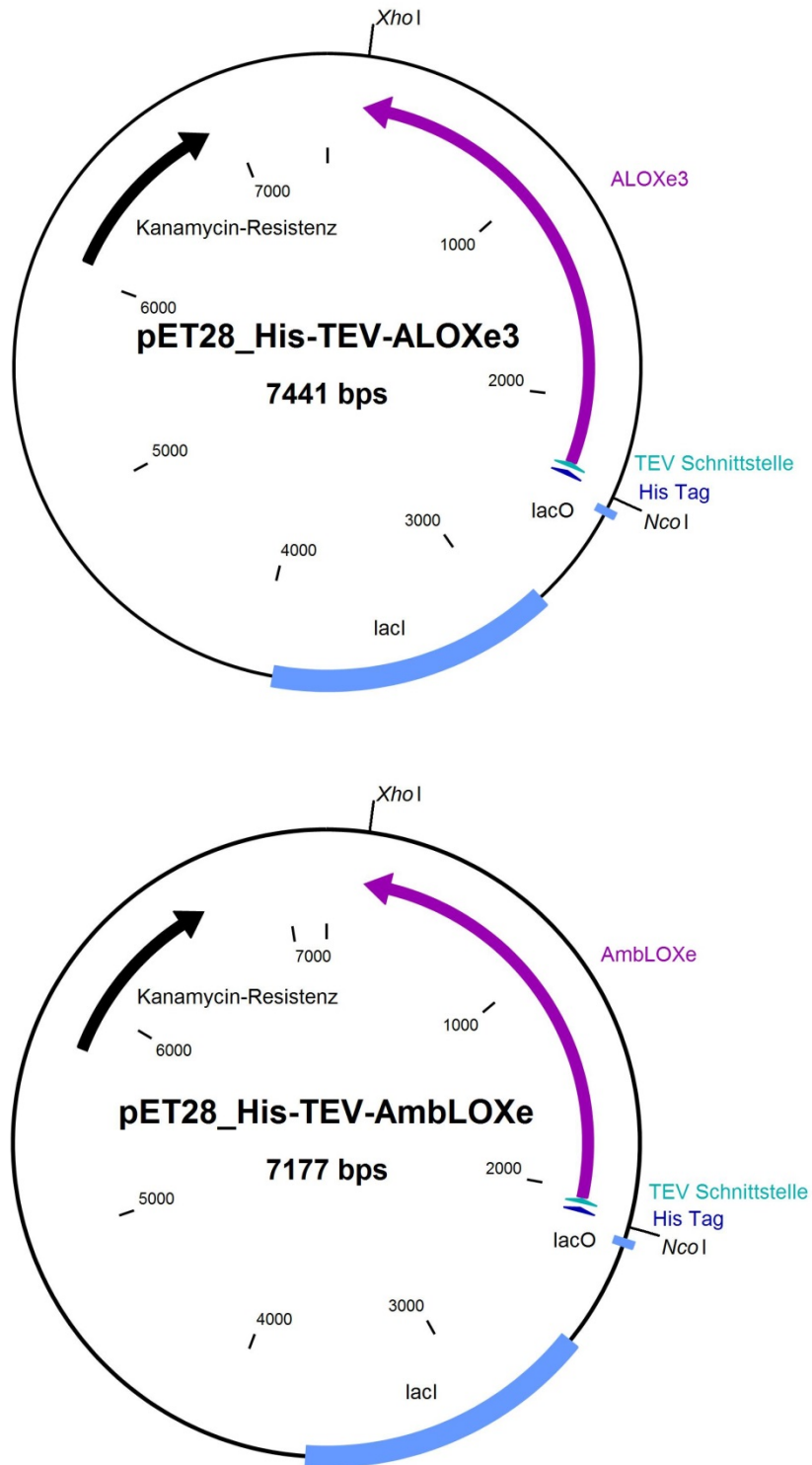


Abbildung 3.6: Vektorkarten der hergestellten Plasmide pET28_His-TEV-ALOXe3 und pET28_His-TEV-AmbLOXe

3.2. Lösliche Produktion von rekombinanten Lipoxygenasen

Escherichia coli ist einer der am häufigsten genutzten Organismen zur heterologen Produktion von Proteinen. Aus diesem Grund ist die Menge an Literatur, die sich mit der Expression eines spezifischen Proteins, als auch mit den generellen Parametern für eine Produktion von löslichen Proteinen in *E. coli* befasst, sehr umfassend. Die generellen Limitierungen, die vor einer heterologen Produktion in *E. coli* beachtet werden müssen (z.B. Größe des Proteins und vorhandene Disulfidbrücken und posttranslationale Modifikationen), wurden für ALOXe3 und AmbLOXe bereits erörtert (3.1 Molekularbiologische Arbeiten). Da für die beiden epidermalen Lipoxygenasen ALOXe3 und AmbLOXe bisher keine Parameter zur löslichen Produktion in der Literatur postuliert wurden, musste im vorliegenden Fall auf die generell zu *E. coli* verfügbaren Informationen zurückgegriffen werden.

Faktoren, die einen Einfluss auf die Löslichkeit der produzierten Proteine haben sollen, sind u.a. die Codonnutzung (3.1), die Kultivierungstemperatur nach Induktion der Proteinproduktion, der Zeitpunkt der Induktion, die Induktorkonzentration, die Zusammensetzung des Kultivierungsmediums und die Coexpression von Chaperonen zur Unterstützung der Proteinfaltung [86,90–95]. Da die in *E. coli* heterolog produzierten Proteine sehr unterschiedlich sind, handelt es sich dabei nur um generelle Leitlinien und es müssen für jedes Protein die individuellen Parameter zur löslichen Produktion neu bestimmt werden.

3.2.1. Determination optimaler Kultivierungsparameter zur löslichen Produktion von ALOXe3 und AmbLOXe

Ausgehend von den *E. coli* Expressionszellen BL21(DE3) mit dem Plasmid pET28b_His-TEV-ALOXe3 sowie den BL21(DE3) Zellen mit dem Plasmid pET28b_His-TEV-AmbLOXe war ein Ziel dieses Abschnittes jene Kultivierungsbedingungen zu finden unter welchen eine möglichst große Menge an löslichem ALOXe3 (83 kDa) bzw. AmbLOXe (74 kDa) Protein heterolog produziert werden kann. Da es sich bei der Lipoxygenase AmbLOXe aus dem Axolotl um ein Homolog der menschlichen Lipoxygenase ALOXe3 handelt, wurde davon ausgegangen, dass sich die gewonnenen Erkenntnisse für eine heterologe Produktion für eine Lipoxygenase auf die jeweils andere übertragen lassen. Zur Determination der optimalen Kultivierungsparameter wurden unterschiedliche Ansätze getestet (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Übersicht der Kultivierungsparameter und ihr erwarteter Einfluss auf die heterologe Proteinproduktion

Kultivierungsparameter	Erwarteter Einfluss auf Proteinproduktion
Expressionstemperatur	Niedrige Temperaturen erhöhen Löslichkeit des Proteins
Zusammensetzung des Mediums	Einfluss individuell abhängig von Protein
Induktionszeitpunkt	Einfluss individuell abhängig von Protein
Induktorkonzentration	Bei höherer Induktorkonzentration wird mehr Protein produziert; möglicher toxischer Effekt von hohen Induktorkonzentrationen auf Zellen

Für die heterologe Produktion wurden unterschiedliche Kultivierungstemperaturen während der Expression, unterschiedliche Medien (Lysogeny broth (LB)- und Terrific broth (TB)-Medium), unterschiedliche optische Dichten bei 600 nm (OD_{600}) zum Zeitpunkt der Induktion und unterschiedliche Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) Konzentrationen zur Induktion der Proteinproduktion getestet. Der allgemeine Versuchsablauf wurde dabei immer gleich durchgeführt und nur die zu testenden Parameter variiert. Zunächst wurde jeweils aus einer Glycerin-Gefrierkultur (der transformierten BL21(DE3) Expressionszellen) eine Vorkultur hergestellt und auf Grundlage dieser eine Hauptkultur angeimpft. Die Kultivierung der Hauptkultur wurde dann entsprechend den zu variierenden Parametern durchgeführt bzw. angepasst (Details hierzu sind den jeweiligen schematischen Übersichtsdarstellungen zu entnehmen).

3.2.1.1. Einfluss der Expressionstemperatur

Im vorliegenden Experiment wurde der Einfluss der Temperatur für die AmbLOXe Produktion getestet. Es konnte bereits für viele heterolog produzierte Proteine, auch Lipoxygenasen, gezeigt werden, dass der negative Effekt der Akkumulation von fehlgefaltetem Protein vor allem bei hohen Temperaturen stattfindet [94,96,97]. Dies ist zum einen auf das schneller und somit unpräzisere Arbeiten der Proteinbiosynthesemaschinerie bei hohen Temperaturen zurückzuführen [98]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die hydrophoben Interaktionen, die zur Bildung von Proteinaggregaten führen, temperaturabhängig sind [99]. Aus diesem Grund wurde für die Expression von AmbLOXe angenommen, dass eine niedrigere Kultivierungstemperatur nach Induktion der

Proteinproduktion dazu führen könnte, dass weniger Protein aggregiert als bei höheren Temperaturen.

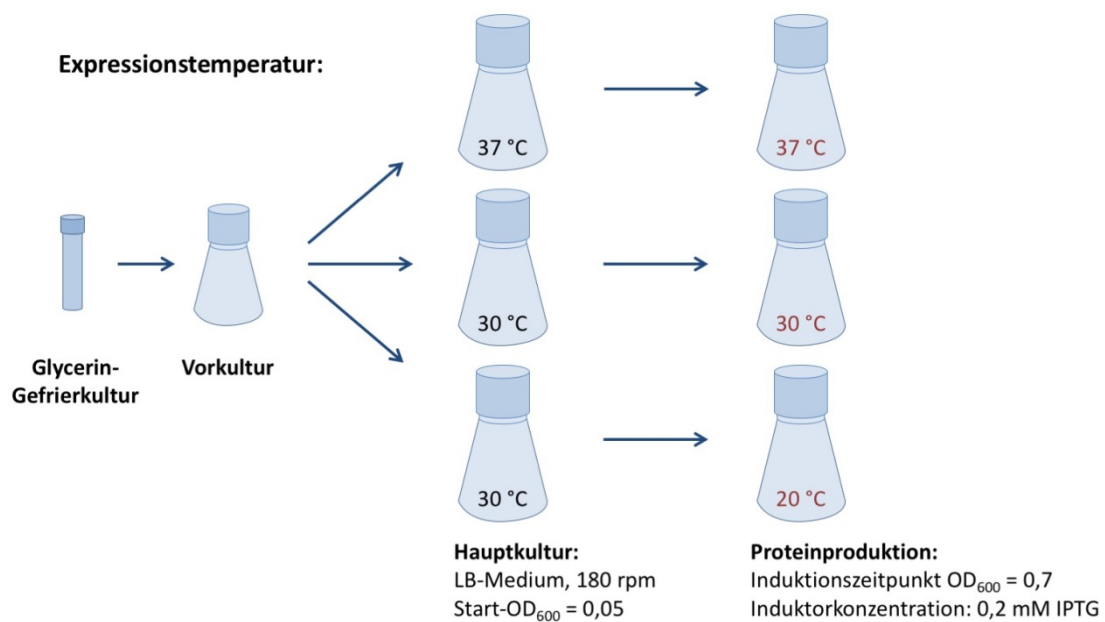


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des Experiments zur Ermittlung des Einflusses der Expressionstemperatur

Zur heterologen Proteinproduktion in diesem Experiment wurde ein Induktionszeitpunkt in der mittleren log-Phase ($OD_{600} = 0,7$) und eine mittlere Induktorkonzentration (0,2 mM IPTG) gewählt. Die Kultivierung wurde in LB-Medium durchgeführt. Dazu wurden insgesamt drei Kultivierungsansätze mit einer Start- OD_{600} von 0,05 angesetzt. Einer dieser Ansätze wurde bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, die anderen beiden bei 30 °C und 180 rpm (Anm.: alle folgenden Kultivierungen wurden ebenfalls, wenn nicht anders vermerkt, bei 180 rpm durchgeführt). Die bei 37 °C gestartete Kultur wurde auch nach Induktion bei 37 °C weiter kultiviert. Die anderen bei 30 °C gestarteten Kulturen wurden bei 30 °C bzw. 20 °C nach Induktion weitergeführt (Abbildung 3.7). Es wurden sowohl direkt vor Induktion, als auch drei Stunden nach Induktion Proben entnommen. Alle Proben für den Zellaufschluss und die Analyse mittels SDS-PAGE wurden dabei so normiert, dass die gewonnenen Pellets nach Resuspendierung in Lysispuffer einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 15 entsprechen (Anm.: diese Normierung wurde äquivalent auch bei allen folgenden Zellaufschlüssen durchgeführt). Die Proben nach Induktion wurden mittels BugBuster® und Ultraschall aufgeschlossen und sowohl das Gesamtlysat nach Zellaufschluss, als auch die lösliche und unlösliche Fraktion (getrennt durch Zentrifugation) auf ein Gel aufgetragen

und mittels Elektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt (Abbildung 3.8). Zusätzlich wurde mit einem Antikörper gegen das His-Tag ein Western Blot durchgeführt, um zu überprüfen, in welchen Proben sich AmbLOXe Protein mit His-Tag befindet (Abbildung 3.9).

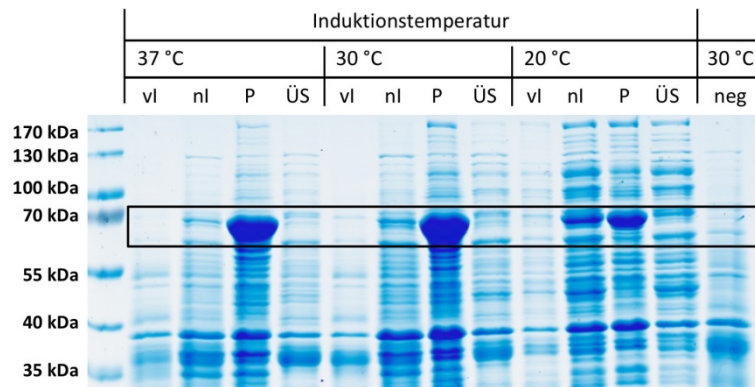


Abbildung 3.8: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; heterologe Expression von AmbLOXe in LB-Medium; nach Induktion wurde die Expression des Proteins bei unterschiedlichen Temperaturen fortgeführt; Probenahme drei Stunden nach Induktion (Proben normiert); aufgetragen sind jeweils die Fraktionen direkt vor Induktion (vI), drei Stunden nach Induktion (nI) (Zellen aufgeschlossen), sowie die Pellet- (P) und Überstandfraktion (ÜS) nach Zellaufschluss; Negativkontrolle (neg.): BL21(DE3) + pET28b(+)-Leervektor

Eine Verringerung der Kultivierungstemperatur nach Induktion der Proteinproduktion führte in diesem Fall nicht zu einer erhöhten Löslichkeit des Proteins AmbLOXe (Abbildung 3.8). Mit Erhöhung der Kultivierungstemperatur wurde jedoch, bezogen auf die *E. coli* Menge, mehr Protein produziert. Dies hängt vor allem damit zusammen, dass die Proteinbiosynthesemaschinerie einer jeden einzelnen *E. coli* Zelle bei höheren Temperaturen schneller arbeitet. In einem Western Blot mit einem Antikörper, welcher vorhandene His-Tags detektiert, konnten Proteine mit His-Tag in den Proben nach Induktion, sowie im Pellet nachgewiesen werden (Abbildung 3.9; die entsprechenden mehrfachen Banden treten aufgrund der großen Menge von eingesetztem Protein auf). Jedoch konnte kein entsprechendes Protein in der löslichen Fraktion nach Aufschluss der Zellen (ÜS) nachgewiesen werden. Somit scheint die gesamte heterolog produzierte AmbLOXe Proteinmenge in Form von Proteinaggregaten vorzuliegen. Eine Verringerung der Temperatur scheint somit keine Löslichkeit der heterolog produzierten Lipoxygenase herbeizuführen.

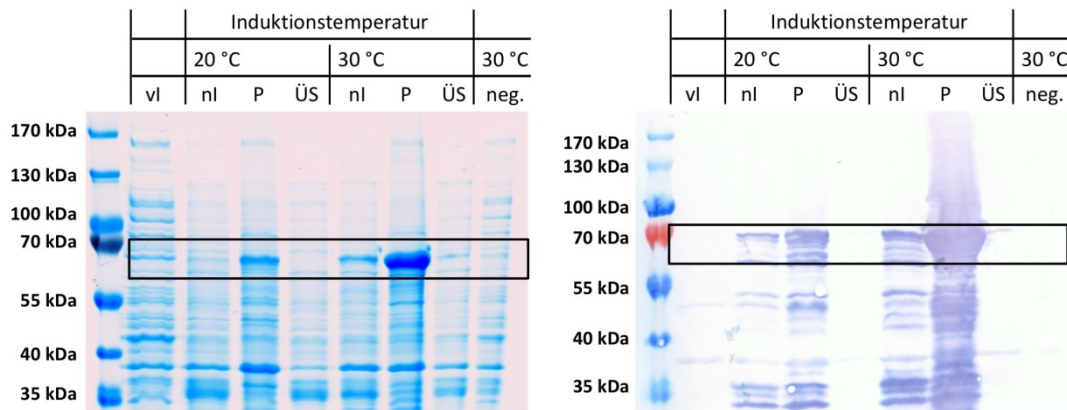


Abbildung 3.9: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung und Western Blot; heterologe Expression von AmbLOXe in LB-Medium; nach Induktion wurde die Expression des Proteins bei unterschiedlichen Temperaturen fortgeführt; Probenahme 3 Stunden nach Induktion (Proben normiert); aufgetragen sind jeweils die Fraktionen direkt vor Induktion (vi), 3 Stunden nach Induktion (nl) (Zellen aufgeschlossen), sowie die Pellet- (P) und Überstandfraktion (ÜS) nach Zellaufschluss; Negativkontrolle (neg.): BL21(DE3) + pET28b(+)-Leervektor; primärer Antikörper: Penta-His aus Maus (1:5.000), sekundärer Antikörper: Anti-Maus IgG *Horseradish Peroxidase (HRP)* Konjugat aus Ziege (1:10.000), Detektion mittels 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat

3.2.1.2. Einfluss des Mediums und des Induktionszeitpunktes

Im diesem Versuchsabschnitt wurde der Einfluss des Mediums und des Zeitpunktes der Induktorzugabe auf die heterologe Produktion von ALOXe3 beurteilt. Dazu wurden sowohl Kultivierungen mit TB- als auch mit LB-Medium durchgeführt. LB-Medium ist das am häufigsten verwendete komplexe Nährmedium zur Kultivierung von *E. coli* und enthält Trypton (organische Verbindungen wie Vitamine und Spurenelemente), Hefeextrakt (Peptide und essentielle Aminosäuren) und Natriumchlorid (Natriumionen für den Transport und das osmotische Gleichgewicht) [100]. TB-Medium hingegen enthält eine größere Menge an Trypton und Hefeextrakt. Zusätzlich enthält es noch Glycerin als Kohlenstoffquelle und Kaliumphosphatsalze um den pH-Wert während der Kultivierung stabil zu halten. Dadurch, dass das TB-Medium so ein nährstoffreiches Medium ist, kann die Wachstumsphase verlängert werden und insgesamt eine höhere optische Dichte erreicht werden als mit LB-Medium [101]. Welches Medium besser für die lösliche Produktion eines Proteins ist, muss für jedes Protein individuell bestimmt werden. Generell kann eine höhere Gesamtzelldichte zu mehr produziertem Protein führen. Dieses muss dann allerdings nicht

zwangsläufig in löslicher Form vorliegen. Des Weiteren kann es für die heterologe Proteinproduktion förderlich sein, wenn eine Pufferkomponente für einen konstanten pH-Wert während des Zellwachstums sorgt [92]. Der Zeitpunkt der Induktion kann ebenfalls einen großen Einfluss auf die Löslichkeit des produzierten Proteins haben. So konnte für einige Proteine gezeigt werden, dass eine Induktion während der frühen log-Phase positiv ist, für andere wiederum eine Induktion in der mittleren oder sogar späten log-Phase [96,102,103]. Da keine konkreten Annahmen über den möglichen Einfluss der beiden Faktoren, Medium und Induktionszeitpunkt, getroffen werden konnten, wurden beide Medientypen und unterschiedliche Induktionszeitpunkte getestet.

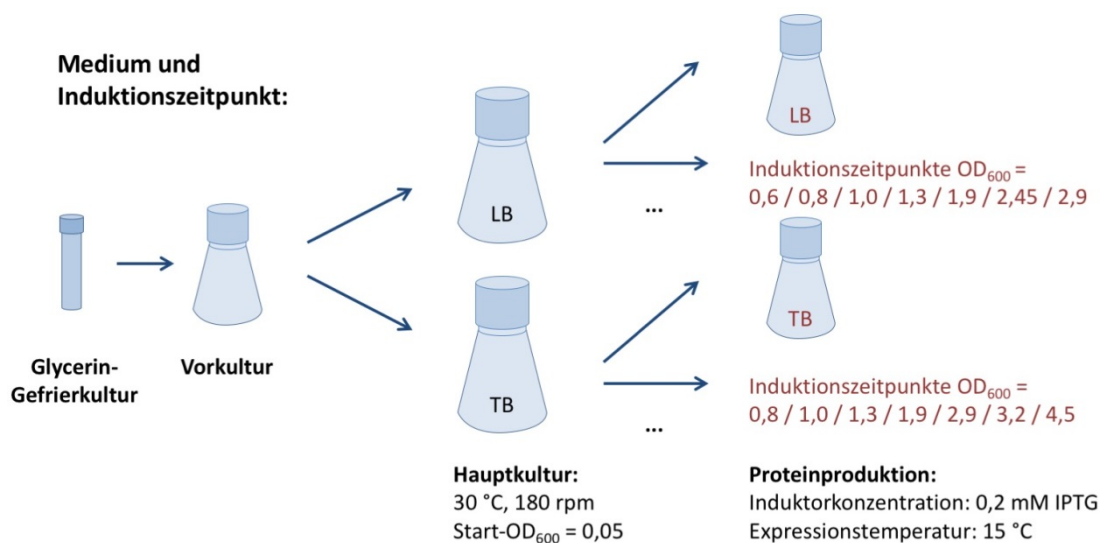


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des Experiments zur Ermittlung des Einflusses des Mediums und des Induktionszeitpunktes

Da Medien unterschiedlicher Zusammensetzung den Wachstumsverlauf der Kultivierung sehr stark beeinflussen, wurde kein spezifischer Zeitpunkt, sondern die optische Dichte zur Bestimmung des Induktionszeitpunktes gewählt. Insgesamt wurden für jeden Medientyp sieben OD₆₀₀-Werte zur Induktion zwischen 0,8 und 4,5 gewählt (bis 4,5 für TB-Medium und bis 2,9 für LB-Medium). Die Hauptkultur wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,05 gestartet und bei einer Temperatur von 30 °C kultiviert. Wurde der entsprechende OD₆₀₀-Wert erreicht, wurde ein Teil der Kulturbrühe in einen neuen sterilen Schüttelkolben überführt und mit 0,2 mM IPTG induziert. Nach Induktion der Proteinproduktion wurde die entsprechende Kultur weiter bei 15 °C kultiviert (Abbildung 3.10). Es wurden sowohl direkt vor Induktion, als auch zwei Stunden und 24 Stunden nach Induktion normierte Proben entnommen. Die

Proben vor Induktion, nach Induktion und die Pellet- und Überstandsfractionen nach Zellaufschluss wurden auf einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt (TB-Medium: Abbildung 3.11; LB-Medium: siehe Anhang, Abbildung A.3).

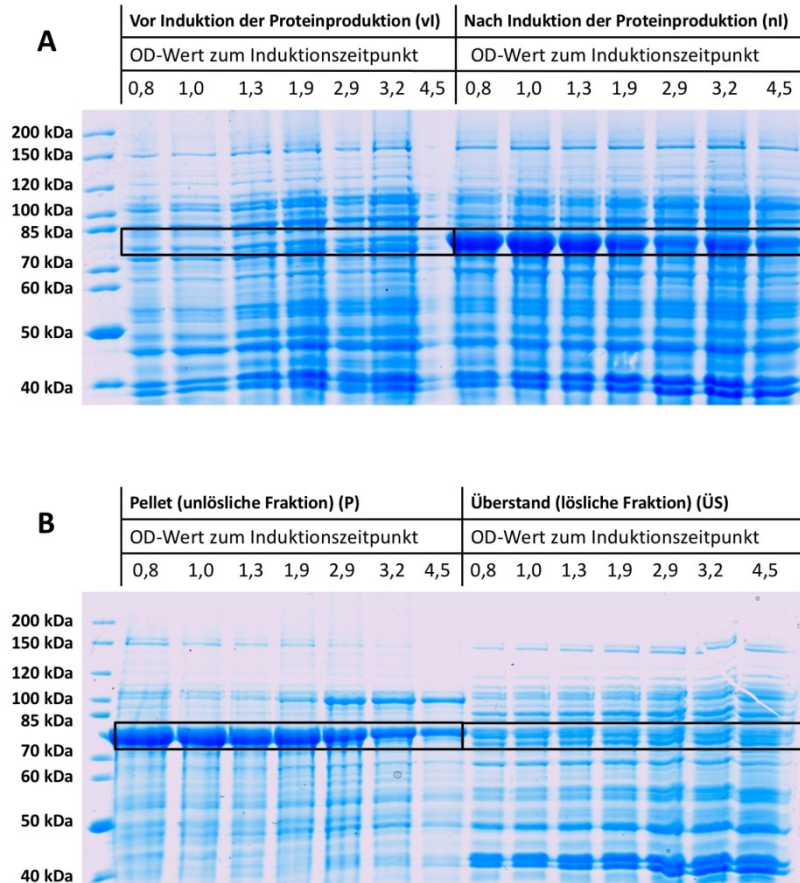


Abbildung 3.11: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; heterologe Expression von ALOXe3 in TB-Medium; die Induktion erfolgte bei unterschiedlichen OD_{600} -Werten; Probennahme 24 Stunden nach Induktion (Proben normiert); aufgetragen sind jeweils: (A) die Fraktionen direkt vor Induktion (vI), 24 Stunden nach Induktion (nI) (Zellen aufgeschlossen), sowie (B) die Pellet- (P) und Überstandsfraction (ÜS) nach Zellaufschluss; LB-Medium: siehe Anhang, Abbildung A.3

Die Induktion der Proteinproduktion bei unterschiedlichen OD_{600} -Werten zeigte, dass optische Dichten zwischen 0,8 und 1,3 bei Kultivierung in TB-Medium (bzw. zwischen 0,8 und 1,9 in LB-Medium) am besten geeignet sind, um eine große Menge an heterolog produziertem Protein zu erhalten. Bei diesen Induktionszeitpunkten waren die Intensitäten der Banden um 83 kDa bei den aufgetragenen Proben nach Induktion am größten (Abbildung 3.11 und Abbildung A.3). Dies lässt sich vor allem dadurch erklären, dass sich

die Bakterienzellen bei diesen mittleren OD_{600} -Werten noch in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Bei höheren OD_{600} -Werten hingegen liegt 24 Stunden nach Induktion wesentlich weniger Protein vor. Dies kann vor allem damit zusammenhängen, dass bei höheren Zelldichten zum Zeitpunkt der Induktion bereits weniger gelöster Sauerstoff vorliegt, ein höherer Gehalt an Kohlenstoffdioxid vorhanden ist und zusätzlich noch weniger Nährstoffe vorhanden sind. All diese Faktoren tragen dazu bei, dass die metabolische Aktivität der Zellen und somit auch die heterologe Expression sinken [104]. Die Induktion der Proteinproduktion zwischen OD_{600} 0,8 und 1,3 in TB-Medium führte zwar zu einer großen Menge an produziertem Protein, allerdings lag dies in unlöslichen Proteinaggregaten vor (unlösliche Pelletfraktion) (Abbildung 3.11). In LB-Medium (siehe Anhang, Abbildung A.3) konnte ebenfalls bei keinem der gewählten OD_{600} -Induktionswerte eine lösliche Produktion beobachtet werden. Somit scheint weder die Wahl des Induktionszeitpunktes noch die Wahl des Medium einen Einfluss auf die Löslichkeit des heterolog produzierten ALOXe3 Proteins zu haben.

3.2.1.3. Einfluss der Induktorkonzentration

Neben unterschiedlichen OD_{600} -Werten zum Zeitpunkt der Induktion wurde auch der Einfluss der Induktorkonzentration auf die Löslichkeit von heterolog exprimiertem ALOXe3 untersucht. Dabei wurde davon ausgegangen, dass eine höhere Induktorkonzentration bis zu einem bestimmten Wert zu einer erhöhten Menge an heterolog produziertem Protein führt. Allerdings kann die erhöhte Induktorkonzentration einen negativen Effekt auf das Wachstum und den Metabolismus der Zellen haben [86,105]. Des Weiteren muss eine höhere Produktion an heterologem Protein nicht zwangsläufig auch zu einer erhöhten Produktion an löslichem Protein führen. Somit ist eine konkrete Annahme über den Effekt auf die Löslichkeit der Lipoxygenasen nicht möglich. Der Effekt muss individuell ermittelt werden.

Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen des Induktors bei gleichbleibendem Induktionszeitpunkt ($OD_{600} = 1,0$) und niedriger Expressionstemperatur (15 °C) in TB-Medium getestet. Die Proteinproduktion wurde mit unterschiedlichen IPTG Konzentrationen (0,05, 0,2, 0,5 und 1,0 mM) gestartet. Dazu wurde eine Hauptkultur bei Erreichen der Induktions- OD_{600} auf vier Schüttelkolben aufgeteilt und die Proteinproduktion mit der entsprechenden IPTG Menge induziert (Abbildung 3.12). Die

normierten und aufgeschlossenen Kultivierungsproben wurden über ein SDS-PAGE Gel aufgetrennt (Abbildung 3.13).

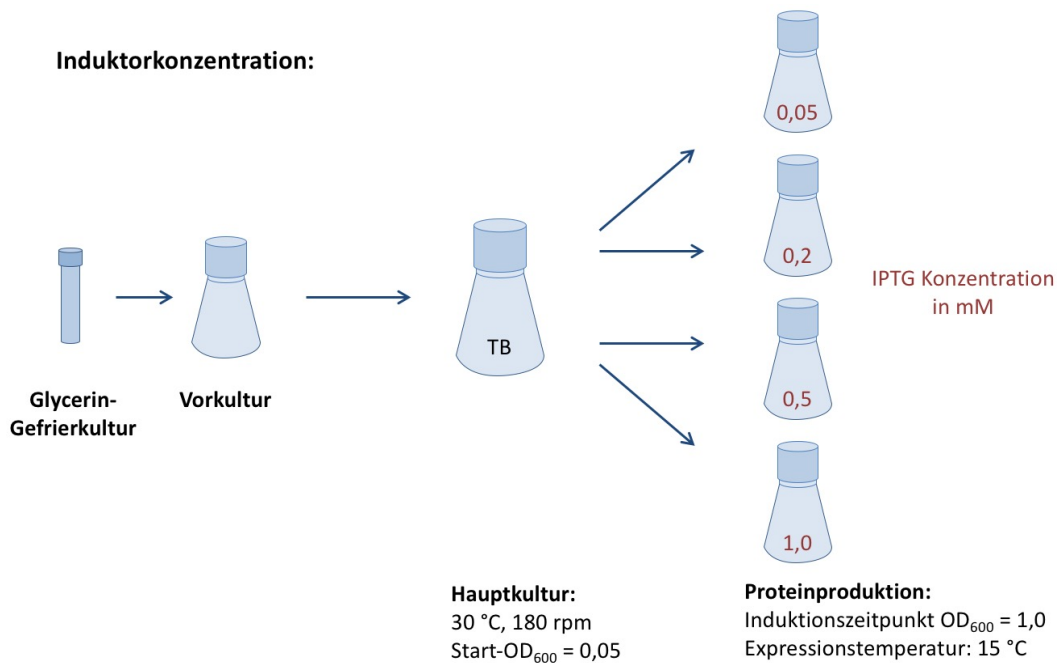


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Experiments zur Ermittlung des Einflusses der Induktorkonzentration

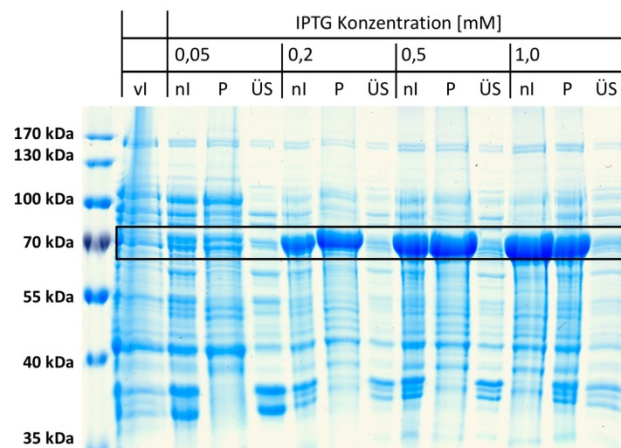


Abbildung 3.13: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; heterologe Expression von ALOXe3 in TB-Medium; die Induktion erfolgte mit unterschiedlichen Induktorkonzentrationen; Probenahme 24 Stunden nach Induktion (Proben normiert); aufgetragen sind jeweils die Fraktionen direkt vor Induktion (vl), 24 Stunden nach Induktion (nl) (Zellen aufgeschlossen), sowie die Pellet- (P) und Überstandfraktion (ÜS) nach Zellaufschluss

Eine höhere Induktorkonzentration führte bis zu einer bestimmten Konzentration, in diesem Fall 0,5 mM IPTG, zu einer gesteigerten Proteinproduktion (Intensität der Banden nach Induktion (nI); Abbildung 3.13). Allerdings liegt dabei der Großteil des produzierten Proteins (>95 %) in unlöslicher Form (Pelletfraktion) vor, der Anteil an löslichem Protein verändert sich mit steigender Induktorkonzentration nicht. Allerdings konnte auch nicht, wie in anderen Veröffentlichungen beschrieben, ein negativer Effekt der gesteigerten Induktorkonzentration auf das Wachstum und den Metabolismus der Zellen beobachtet werden [86,105]. Da ab 0,5 mM keine Steigerung der Menge des heterolog exprimierten ALOXe3 Proteins zu erkennen ist, sollte diese Konzentration aus Gründen der Wirtschaftlichkeit und auch aufgrund eines möglichen verbleibenden toxischen Effekts nicht überschritten werden. Dies ist auch dann zu berücksichtigen, wenn eine heterologe Expression mit dem Ziel durchgeführt wird *Inclusion Bodies* zu produzieren. Auch wenn in diesem Fall die exprimierten Proteine in Aggregaten vorliegen, gibt es trotzdem qualitative Unterschiede, vor allem bezüglich der möglichen Ausbildung von korrekten dreidimensionalen Strukturen innerhalb dieser Aggregate. Werden mildere Expressionsbedingungen (niedrigere Temperatur, niedrigere Induktorkonzentration) gewählt, beeinflusst dies die Qualität der ausgebildeten Strukturen positiv, da die Proteinsynthesemaschinerie insgesamt langsamer und somit auch korrekter arbeitet [98].

Weder die Anpassung des Induktionszeitpunktes, noch die Anpassung der Induktormenge führte zu einer löslichen Produktion. Es konnten somit keine direkten induktionsbezogenen Parameter bestimmt werden, die eine Produktion von löslichen Lipoxygenasen fördern. Ebenfalls konnte kein Einfluss der Expressionstemperatur oder des Mediums auf die Löslichkeit der heterolog produzierten Proteine beobachtet werden. Insgesamt betrachtet konnte keine der untersuchten Kombinationen an Kultivierungsparametern eine lösliche, heterologe Expression von ALOXe3 und AmbLOXe in *E. coli* BL21(DE3) ermöglichen. Im folgenden Kapitel wurde untersucht, ob eine Coexpression von Chaperonen die Löslichkeit der Lipoxygenasen verbessern kann.

3.2.2. Heterologe Produktion von ALOXe3 unter Coexpression von Chaperonen

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschreiben, kommt es bei der Produktion von Proteinen in einem heterologen Wirt wie *Escherichia coli* oftmals zur Akkumulation von

fehlgefalteten Proteinen und somit zu einer verringerten Löslichkeit dieser Proteine. Da dies im vorliegenden Fall auch auf die epidermalen Lipoxygenasen ALOXe3 und AmbLOXe zutrifft, mussten alternative Ansätze gefunden werden, die zu einer potenziell besseren Löslichkeit der überexprimierten Proteine führen könnten. Chaperone sind Enzyme, die an unterschiedlichen Stellen während und nach der Proteinbiosynthese wirken und somit förderlich für eine korrekte Faltung der Proteine sind. Es wurde angenommen, dass die Coexpression solcher Chaperone auch die heterolog exprimierte epidermale Lipoxygenase bei der Faltung unterstützen könnte und somit zu einer löslichen Produktion dieser beitragen könnte. Aus diesem Grund wurde die Coexpression von Chaperonen für die Produktion von ALOXe3 getestet. In diesem Fall wurde das Chaperon Plasmid Set der Firma Takara Bio (Kusatsu, Japan) genutzt. Dieses Set enthält insgesamt fünf Plasmide, die jeweils eine Kombination von Genen für unterschiedliche Chaperone enthalten (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Übersicht über die auf den Plasmiden enthaltenen Gene für die unterschiedlichen Chaperone sowie Angabe über deren Größe in kDa

Chaperon [kDa]	GroES 10	GrpE 22	DnaJ 40	Tf 56	GroEL 60	DnaK 70
Plasmid						
pG-KJE8	X	X	X		X	X
pGro7	X				X	
pKJE7		X	X			X
pTf16				X		
pG-Tf2	X			X	X	

Die Hitzeschockproteine DnaK, DnaJ und GrpE unterstützen die Proteinneufaltung bzw. die Rückfaltung fehlgefalteter Proteine. DnaK ist dabei maßgeblich an der korrekten Proteinfaltung beteiligt, während DnaJ und GrpE als Hilfsproteine fungieren und u.a. für das Heranführen (DnaJ) und Entlassen (GrpE) des fehlgefalteten Proteins unter Energieverbrauch verantwortlich sind. Der Triggerfaktor (Tf) schützt vor allem stark hydrophobe Bereiche während der Biosynthese und der Faltung vor der Aggregation mit den hydrophoben Bereichen anderer Proteine. Dabei können auch mehrere Triggerfaktoren an größere, hydrophobe Bereiche binden um diese vor Aggregation mit sich selbst und mit anderen Proteinen zu schützen. Die Proteine der Chaperonkombination GroEL/GroES gehören ebenfalls zu den Hitzeschockproteinen. GroEL ist zylinderförmig aufgebaut und

bindet sowohl das Cochaperon GroES als auch das fehlgefaltete Protein, das anschließend innerhalb des Zylinders richtig gefaltet wird. Falls eine korrekte Faltung durch den DnaK/DnaJ-Komplex bzw. den GroEL/GroES-Komplex nicht möglich ist, kann das entsprechende Protein auch durch zelluläre Proteasen abgebaut werden [106–109] (Abbildung 3.14).

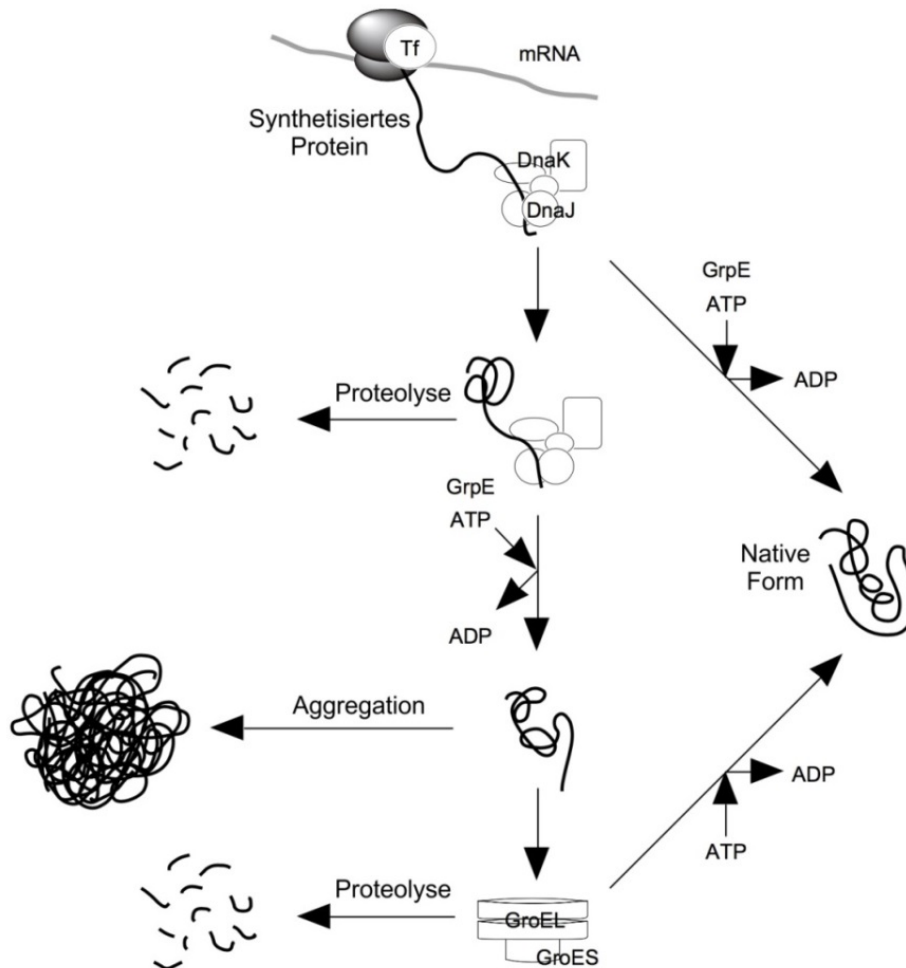


Abbildung 3.14: Modell für die Chaperon-unterstützte Faltung in *E. coli*; Quelle: TaKaRa Chaperone Plasmid Set User Manual

Die verwendeten Chaperon Plasmide enthalten einen Resistenzmarker für das Antibiotikum Chloramphenicol. Die einzelnen Plasmide wurden jeweils mit dem pET28b_His-TEV-ALOXE3 Plasmid zusammen in kompetente BL21(DE3) Zellen transformiert. Zellen die beide Plasmide enthalten wurden mittels der Antibiotikakombination Chloramphenicol und Kanamycin selektiert und von einzelnen selektierten Klonen wurde eine entsprechende Glycerin-Gefrierkultur erstellt.

Zur Coexpression von Chaperonen und dem Zielprotein ALOXe3 wurde eine Kultivierung mit LB-Medium durchgeführt. Das Medium enthält dabei die beiden Antibiotika Chloramphenicol und Kanamycin zur Selektion. Zu Beginn der Hauptkultivierung wurde dem Medium zusätzlich L-Arabinose (für die Plasmide pG-KJE8, pGro8, pKJE7 und pTf16) bzw. Tetracyclin (für die Plasmide pG-KJE8 und pG-Tf2) hinzugefügt, um die Induktion der Chaperonexpression zu starten. Die Chaperone werden dadurch direkt mit Beginn der Hauptkultivierung produziert, sodass diese bereits vorliegen, wenn die Produktion des Zielproteins startet. Die Kultivierung wurde mit OD_{600} von 0,05 gestartet und für drei Stunden bei 30 °C fortgeführt. War nach ca. drei Stunden Kultivierung eine OD_{600} von 0,7 erreicht, wurde die Proteinproduktion der Lipoxygenase ALOXe3 mit IPTG (0,2 mM) gestartet und bei unterschiedlichen Temperaturen (15, 20, 25, 30 und 37 °C) fortgeführt (Abbildung 3.15). Die Zellernte von normierten Proben erfolgte 20 Stunden nach Induktion. Anschließend wurden die Zellen mittels einer Kombination von BugBuster® und Ultraschall aufgeschlossen und die einzelnen Fraktionen zur Analyse in einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt (Abbildung 3.16).

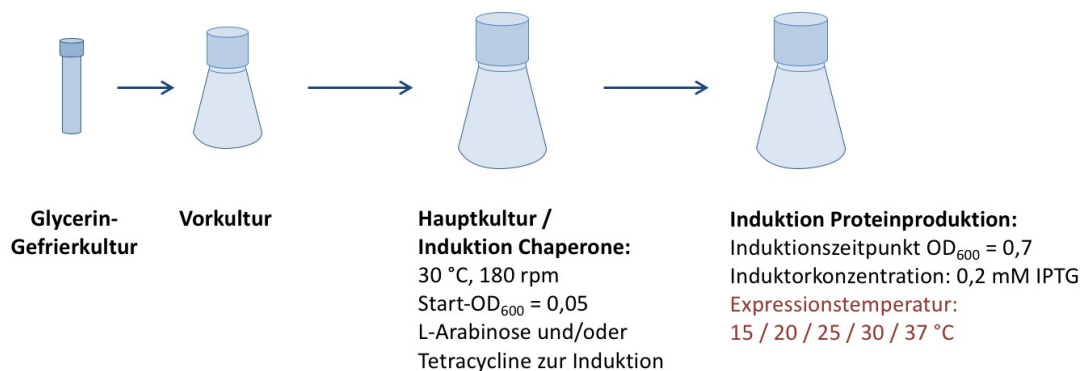


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung des Experiments zur Coexpression von Chaperonen

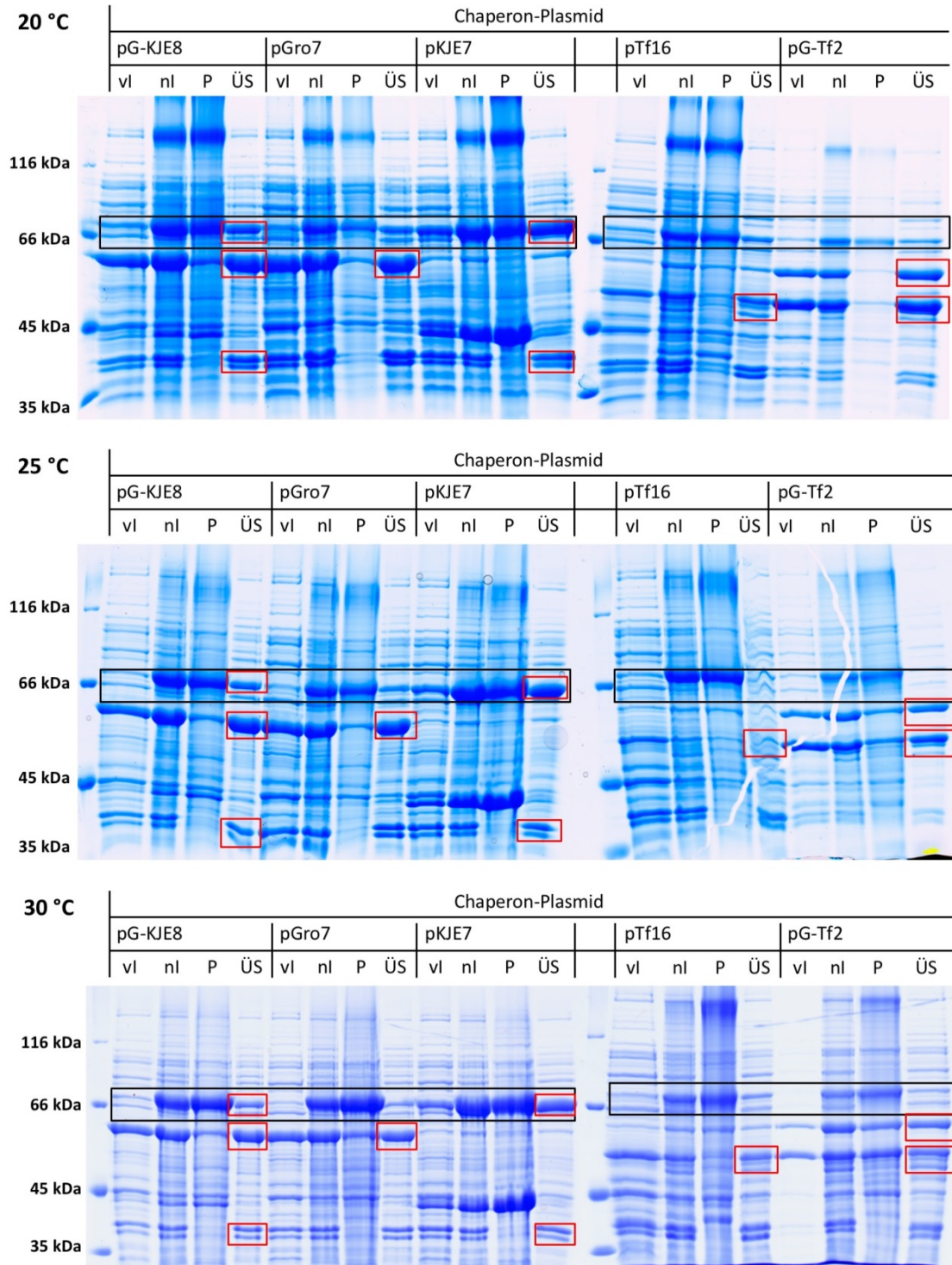


Abbildung 3.16: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Coexpression von ALOXe3 (schwarz markiert) und unterschiedlichen Chaperon-Kombinationen (rot markiert) bei 20, 25 und 30 °C; aufgetragen sind jeweils die Fraktionen direkt vor Induktion (vl), 20 Stunden nach Induktion (nl) (Zellen aufgeschlossen), sowie die Pellet- (P) und Überstandfraktion (ÜS) nach Zellaufschluss; Coexpression bei 15 und 37 °C: siehe Anhang, Abbildung A.4

Bei Analyse der Gele mit Proben der Expressionstemperaturen 20, 25 und 30 °C zeigt sich, dass die Kombination von Chaperonen auf dem Plasmid pKJE7 zu einer größeren Menge an löslichem Zielprotein zu führen scheint als die anderen Chaperon-Kombinationen (Abbildung 3.16). Die Überstandsfractionen (ÜS) nach Zellaufschluss zeigen für die Chaperonkombination pKJE7 die größte Intensität im Größenbereich von ALOXe3 (83 kDa). Die Chaperone des Plasmids pKJE7 (DnaK, DnaJ und GrpE) unterstützen die Proteinneufaltung und die Rückfaltung fehlgefalteter Proteine. Die ähnliche Chaperon-Kombination des Plasmids pG-KJE8 (DnaK, DnaJ, GrpE, GroES und GroEL) erreichte keine vergleichbare Menge an löslichem Protein. Die zusätzlichen Chaperone GroES und GroEL scheinen in diesem Fall die Menge an löslichem Protein sogar noch zu verringern. Eventuell kommt es in diesem Fall zu einer Proteolyse durch GroES und GroEL. Somit scheint die Coexpression des Chaperon-Plasmids pKJE7 in diesem Fall die geeignete Form zu sein um die Menge an löslichem und somit auch eventuell korrekt gefaltetem Protein zu erhöhen. Dasselbe Ergebnis ließ sich aus den Gelen der Coexpression bei 15 und 37 °C ableiten (siehe Anhang, Abbildung A.4). Die optimale Temperatur zur Expression der heterolog produzierten Proteine liegt für diese Chaperonkombination bei 20 °C. Bei den hier gemachten Rückschlüssen muss allerdings berücksichtigt werden, dass das exprimierte Chaperon DnaK (pKJE7 und pG-KJE8) mit einer Größe von 70 kDa eine ähnliche Größe aufweist wie ALOXe3 (83 kDa). Aus diesem Grund muss mittels weiterer Analyse und Aufreinigungen ermittelt werden, welchen Anteil ALOXe3 an den Proteinbanden im Größenbereich um 70-85 kDa (Abbildung 3.16) trägt.

Um den Anteil der Lipoxygenase ALOXe3 im Größenbereich um 80 kDa zu ermitteln, wurde in weiteren Versuchen mit Proteingelen mit unterschiedlichen Anteilen an Acrylamid-Bisacrylamid gearbeitet. Mit dem standardmäßig genutzten Anteil von 12 % (Abbildung 3.16) konnte keine ausreichende Auftrennung der Banden von ALOXe3 (83 kDa) und DnaK (70 kDa) erreicht werden. Auch eine Herabsetzung des prozentualen Anteils von Acrylamid-Bisacrylamid auf 10 bzw. 8 % (Daten nicht gezeigt) erbrachte keine bessere Auftrennung. Daher war eine Auflösung der Proteinbanden, um eine eventuelle Überlagerung zu detektieren, nicht möglich. Aus diesem Grund wurden in weiterführenden Experimenten die Proben prozessiert und der lösliche Anteil des Zielproteins mittels Nickel-Affinitätschromatographie über das His-Tag aufgereinigt (3.2.3).

Ergänzend zur Optimierung der Kultivierungsparameter und der Coexpression von Chaperonen wurde untersucht, inwieweit die Wahl des Aufschlusspuffers einen Einfluss auf die Löslichkeit haben könnte. Diese Untersuchungen zeigten allerdings, dass unabhängig von den gewählten Pufferkomponenten und Zusätzen keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen, der in Lösung vorliegenden Proteine, zu erkennen sind (siehe Anhang, Tabelle A.21, Abbildung A.5). Somit scheint die Wahl des Puffers während der Zellyse keinen Einfluss auf den Anteil der in Lösung befindlichen heterolog produzierten Proteine zu haben.

3.2.3. Untersuchung der Aufreinigung von ALOXe3 und AmbLOXe mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Bei der Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese war aufgrund der möglichen Überlagerung von ALOXe3 (83 kDa) und DnaK (70 kDa) keine finale Aussage darüber möglich, ob die Coexpression von Chaperonen zu einer löslichen Produktion von ALOXe3 führt oder ob es sich bei der beobachteten Bande um das Chaperon DnaK handelt. Aus diesem Grund wurden die entsprechenden Proben mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt, um den löslichen Anteil des Zielproteins ALOXe3 von den restlichen Probenbestandteilen abzutrennen. Dazu wurden Proben einer Kultivierung zur Produktion von ALOXe3 bei 20 °C unter Coexpression von pKJE7 nach Zellaufschluss aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mittels der HisPur™ Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) *Spin Columns* mit einem Säulenmaterialvolumen von 0,2 mL und nach dem entsprechenden Protokoll, das mit Puffern unterschiedlicher Imidazolkonzentrationen arbeitet (A.2.4.3). Die während des Protokolls gesammelten Fraktionen wurden anschließend auf einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt (Abbildung 3.17).

Auf dieselbe Weise wurden zusätzlich Proben einer heterologen Expression von AmbLOXe bei 20 °C aufgereinigt und die einzelnen Fraktionen auf einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt (Abbildung 3.18).

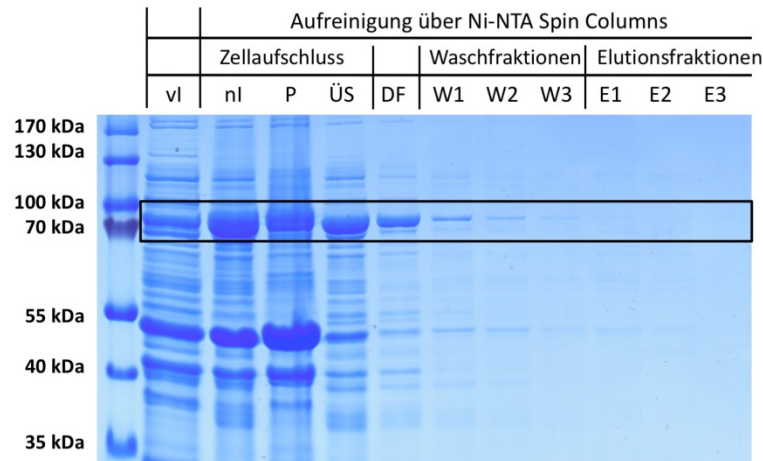


Abbildung 3.17: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Aufreinigung der Proben der Coexpression von ALOXe3 mit pKJE7 über Ni-NTA Spin Columns; aufgetragen sind jeweils die Proben vor Induktion (vl), 20 Stunden nach Induktion (nl) (Zellen aufgeschlossen), Pellet- (P) und Überstandfraktion (ÜS) nach Zellaufschluss, sowie die Fraktionen der Aufreinigung über die Säule: Durchfluss (DF), Waschfraktionen (W1-W3) und Elutionsfraktionen (E1-E3)

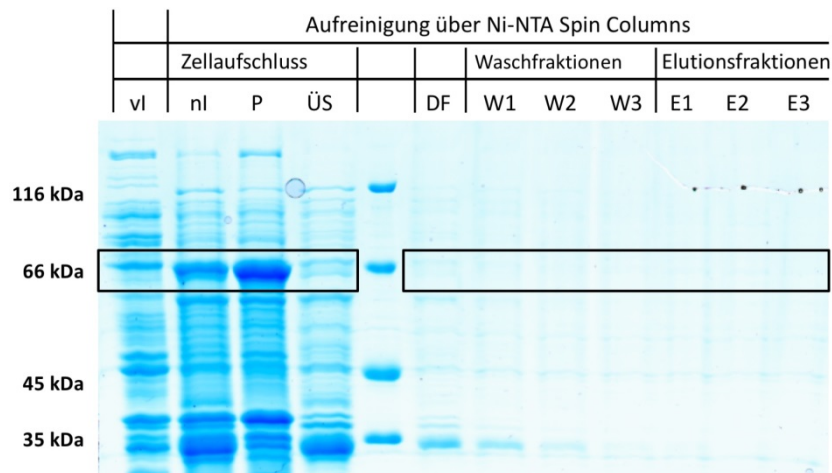


Abbildung 3.18: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Aufreinigung der Proben des heterolog exprimierten AmbLOXe Proteins über Ni-NTA Spin Columns; aufgetragen sind jeweils die Proben vor Induktion (vl), 20 Stunden nach Induktion (nl) (Zellen aufgeschlossen), Pellet- (P) und Überstandfraktion (ÜS) nach Zellaufschluss, sowie die Fraktionen der Aufreinigung über die Säule: Durchfluss (DF), Waschfraktionen (W1-W3) und Elutionsfraktionen (E1-E3)

Dabei zeigte sich, dass die Probe der Coexpression von pKJE7 kein lösliches ALOXe3 Protein enthält, welches an das Säulenmaterial binden kann. Es scheint einige unspezifische Bindungen des coexprimierten Chaperons DnaK zu geben, die aber mit dem Waschpuffer, welcher eine geringe Menge Imidazol enthält, entfernt werden konnten. Die aufgereinigten Proben der heterologen Expression von AmbLOXe enthielten ebenfalls kein in Lösung befindliches AmbLOXe Protein, das an die Säule binden konnte.

Die in 3.2.2 gemachte Hypothese zur Förderung der Löslichkeit durch Coexpression der auf pKJE7 befindlichen Chaperone konnte somit nicht bestätigt werden. Insgesamt konnte mittels der getesteten molekularbiologischen Parameter und Kultivierungs- bzw. Induktionsparameter keine lösliche Produktion für die Enzyme ALOXe3 und AmbLOXe beobachtet werden.

Aufgrund der Erfahrungen von ALOXe3 bezüglich der Coexpression von Chaperonen, die in diesem Fall zu keiner erhöhten Löslichkeit führte, wurde dieser Ansatz nicht weiter für AmbLOXe verfolgt. Vielmehr wurde in weiteren Teilen dieser Arbeit angestrebt bioaktives ALOXe3 und AmbLOXe Enzym über *Inclusion Bodies* zu gewinnen (siehe Abschnitt 3.3 Produktion und Charakterisierung von Lipoxygenasen aus *Inclusion Bodies*).

Um zu überprüfen, ob das exprimierte Protein jedoch eine His-Tag Verfügbarkeit besitzt, wurde unlösliches AmbLOXe Protein in Lösung gebracht, über die Ni-NTA Säulen aufgereinigt und mittels eines Antikörpers gegen das His-Tag nachgewiesen. Dazu wurde nach Zellyse die unlösliche Pelletfraktion in einem Puffer mit 6 M Urea und 0,25 % Triton X-100 in Lösung gebracht. Der Überstand dieses Solubilisats wurde abgenommen und zur weiteren Aufreinigung über eine Ni-NTA Säule verwendet (Abbildung 3.19, Sol). Die für das darauffolgende Protokoll verwendeten Puffer (Äquilibrierungs-, Wasch- und Elutionspuffer) enthielten kein Urea und Triton. Nach den ersten drei Elutionsschritten (Abbildung 3.19, E1-E3) wurden dann drei weitere Elutionsschritte mit einem Urea- und Tritonhaltigem Puffer durchgeführt (Abbildung 3.19, U1-U3). Die Proben wurden sowohl mittels einer SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung (Abbildung 3.19) als auch mittels Western Blot (Abbildung 3.20) analysiert.

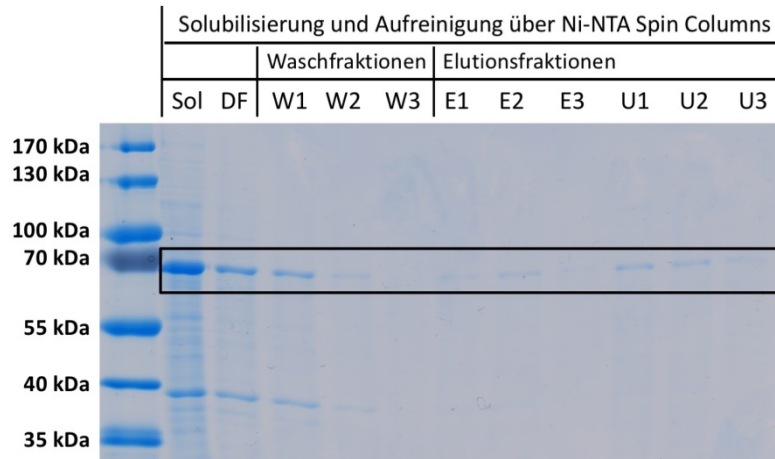


Abbildung 3.19: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Aufreinigung der Proben des heterolog exprimierten (3 h, 30 °C) AmbLOXe Proteins über Ni-NTA Spin Columns; aufgetragen sind eine Probe des mittels Urea und Triton X-100 solubilisierten Proteins (Sol); Fraktionen der Aufreinigung über die Säule: Durchfluss (DF), Waschfraktionen (W1-W3), Elutionsfraktionen (E1-E3) und Elutionsfraktionen mit Urea und Triton X-100 (U1-U3)

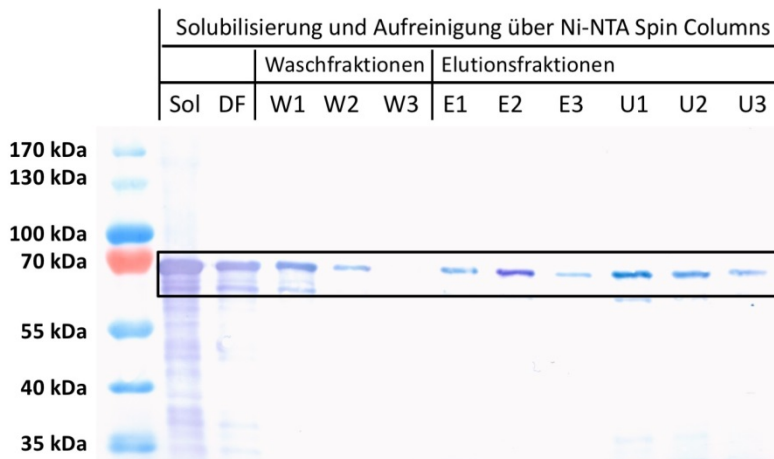


Abbildung 3.20: Western Blot der Aufreinigung der Proben des heterolog exprimierten (3 h, 30 °C) AmbLOXe Proteins über Ni-NTA Spin Columns; aufgetragen sind eine Probe des mittels Urea und Triton X-100 solubilisierten Proteins (Sol); Fraktionen der Aufreinigung über die Säule: Durchfluss (DF), Waschfraktionen (W1-W3), Elutionsfraktionen (E1-E3) und Elutionsfraktionen mit Urea und Triton X-100 (U1-U3)

Durch die Solubilisierung mit Urea und Triton X-100 war es möglich das im Pellet aggregierte Proteine wieder in Lösung zu bringen (Abbildung 3.19, Sol). Da sowohl im Durchfluss als auch in den Waschfraktionen 1 und 2 AmbLOXe Protein auf dem Western Blot (Abbildung 3.20) nachgewiesen werden konnte, scheint die auf die Säule applizierte Menge zu groß gewesen zu sein. In der letzten Waschfraktion (W3) konnte kein Protein mit His-Tag mehr nachgewiesen werden, somit scheint alles überschüssige, ungebundene Protein mit dem Waschpuffer eluiert worden zu sein. Bei der Elution mit Imidazol konnte ein erster Teil des gebundenen Proteins eluiert werden (Abbildung 3.19 und Abbildung 3.20, E1-E3). Ein weitaus größerer Teil konnte jedoch mit einer Kombination aus Imidazol, Urea und Triton X-100 eluiert werden (Abbildung 3.19 und Abbildung 3.20, U1-U3). Mit diesem Versuchsabschnitt konnte gezeigt werden, dass AmbLOXe in unlöslicher Form produziert und solubilisiert werden konnte. Zusätzlich konnte ein His-Tag nachgewiesen werden, welches es ermöglichte, dass das Protein an die Säule bindet und zusätzlich genutzt wurde um die Proteinbanden auf einem Western Blot zu detektieren.

3.3. Produktion und Charakterisierung von Lipoxygenasen aus *Inclusion Bodies*

In *Escherichia coli* heterolog exprimierte *Inclusion Bodies* (IBs), können, wenn sie Protein mit teils korrekt gefalteten Strukturen enthalten, als Reservoir für die Gewinnung von aktivem Enzym genutzt werden. Dabei können die *Inclusion Bodies* direkt eingesetzt werden oder Protein aus diesen extrahiert und solubilisiert werden. Letzteres bedarf zumeist aufwendigerer Protokolle, da die entsprechenden Polypeptide zunächst mittels chaotroper Verbindungen solubilisiert werden müssen und anschließend diese Verbindungen wieder entfernt werden müssen. Die Entfernung dieser Verbindungen verfolgt das Ziel einer Rückfaltung (Refolding) der Proteine. All diese Schritte setzen zusätzlich ein Screening nach den optimalen Bedingungen voraus, da die Entfernung der chaotropen Verbindungen dazu führen kann, dass die solubilisierten Proteine sich nicht in ihre natürliche Form zurückfalten, sondern erneut aggregieren.

Auf Grundlage der Hypothese, dass *Inclusion Bodies* korrekt gefaltetes Protein und somit möglicherweise auch aktives Enzym enthalten, wurden IBs der Lipoxygenasen ALOXe3 und AmbLOXe produziert und charakterisiert. Nachfolgend sind zunächst die Ergebnisse der Produktion und Aufreinigung der *Inclusion Bodies* mit ALOXe3 und AmbLOXe Protein dargestellt. Anschließend wurden die aufgereinigten Lipoxygenasen mittels unterschiedlicher Protokolle solubilisiert und rückgefaltet. Diese Protokolle wurden danach beurteilt inwieweit sich durch diese Rückfaltung dreidimensionale Proteinstrukturen ausgebildet haben (*Thermal Shift Assay*). Zusätzlich wurden die prozessierten Proteine in einem *in vitro* Assay zusammen mit unlöslichen IBs auf Lipoxygenaseaktivität untersucht. Da für die beiden Lipoxygenasen, jedoch im speziellen für AmbLOXe, die genauen Mechanismen ihrer enzymatischen Lipoxygenaseaktivität noch nicht aufgeklärt sind, wurden die unlöslichen IBs zusätzlich in umfassenden Wundheilungsexperimenten in der Zellkultur untersucht. Dadurch sollte unabhängig von spezifischen enzymatischen Aktivitäten die direkte Bioaktivität auf die Wundheilung beurteilt werden.

Im folgenden Abschnitt wurden zunächst ALOXe3 und AmbLOXe IBs in *E. coli* produziert und über ein mehrstufiges Protokoll aufgereinigt. Zusätzlich wurden GST-GFP (grün fluoreszierendes Protein mit Glutathion-S-Transferase Tag, 54 kDa) IBs auf die gleiche Art und Weise produziert und aufgereinigt um als Negativkontrolle für die jeweiligen

Experimente eingesetzt werden zu können. Aufgrund der Fluoreszenz des GFPs kann die Verteilung der eingesetzten *Inclusion Bodies* bei den jeweiligen Experimenten zusätzlich visuell überprüft werden.

3.3.1. Aufreinigung von Lipoxygenase *Inclusion Bodies*

Inclusion Bodies enthalten zum Großteil heterolog produziertes Protein. Dadurch kann nach Abtrennung dieser von anderen Proteinen und Zellbestandteilen davon ausgegangen werden, dass nahezu nur das gewünschte Protein vorliegt. Diese Abtrennung von zellulären Verunreinigungen ist aufgrund ihrer Größe und Dichte sehr gut zu realisieren. Ein zusätzlicher Vorteil von *IBs* ist, dass sie weniger anfällig gegenüber Proteolyse sind. Aus diesen Gründen können sie relativ einfach isoliert werden und in weiteren Versuchen eingesetzt werden [110].

Die Bedingungen einer optimalen Produktion von *Inclusion Bodies* in BL21(DE3) Zellen wurden aus den vorherigen Experimenten zur Produktion von rekombinanten Lipoxygenasen abgeleitet. In diesen zeigte sich, dass eine Induktorkonzentration von 0,5 mM bei Zugabe in der mittleren log-Phase des Wachstums (OD_{600} 0,7) zu einer großen Menge an heterolog produzierten Lipoxygenaseproteinen in unlöslicher Form führt. Als Expressionstemperatur wurde 25 °C gewählt. Bei dieser Temperatur ist ein ausreichendes Wachstum der Zellen gewährleistet, gleichzeitig arbeitet die Proteinsynthesemaschinerie bei diesen Temperaturen langsamer und somit korrekter als beispielsweise bei 37 °C [98]. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von korrekten dreidimensionalen Proteinstrukturen innerhalb der *Inclusion Bodies* höher.

Das Protokoll zu Isolation und Aufreinigung der *IBs* von anderen Zellbestandteilen wurde in Anlehnung an bereits existierende Protokolle durchgeführt [111]. Die einzelnen Schritte umfassten dabei zunächst die Produktion der *Inclusion Bodies*, gefolgt von einer Zellyse auf Basis des Enzyms Lysozym. Zusätzlich wurden Waschschrte mit Detergenzien durchgeführt und DNase zur Entfernung überschüssiger DNA eingesetzt. Ein weiteres wichtiges Element dieses Aufreinigungsprotokolls sind die Zwischenschritte, mit denen auf LB-Agar-Platten überprüft wird, ob noch lebende Bakterienzellen vorhanden sind (Abbildung 3.21). Da die *IBs* in weiteren Experimenten hinsichtlich ihrer Bioaktivität beurteilt werden sollen, wären verbleibende bakterielle Kontaminationen hinderlich, da sie Ergebnisse entsprechender Assays nachhaltig beeinflussen könnten. Die aufgereinigten

Inclusion Bodies wurden zusätzlich dahingehend überprüft, ob sie zu Kontaminationen in der Zellkultur führen können. Dazu wurden die in späteren Experimenten höchste eingesetzte Konzentration an *Inclusion Bodies* in Zellkulturmedium ohne Antibiotika über mehrere Tage bei 37 °C inkubiert und täglich auf eventuelle Kontaminationen hin überprüft.

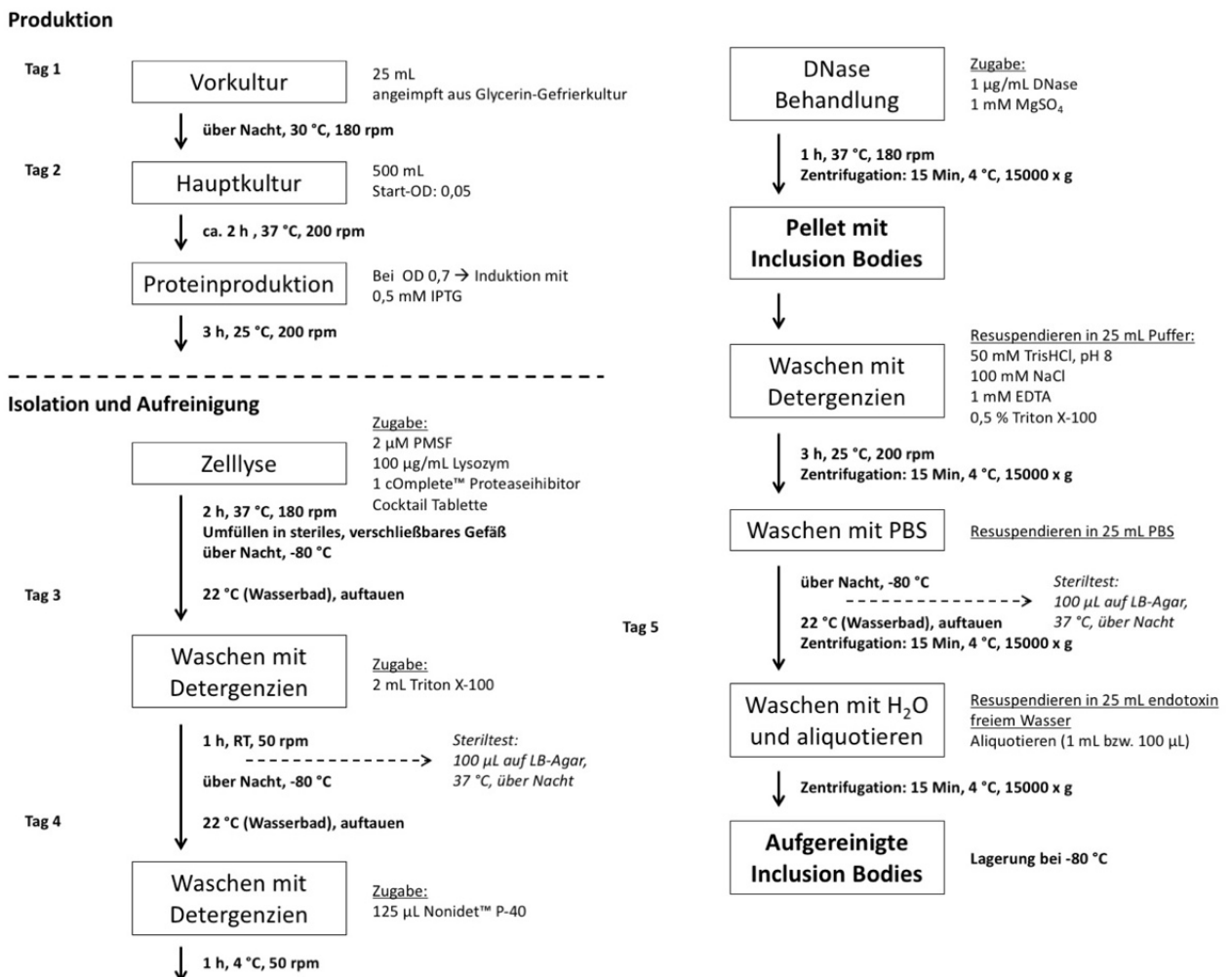


Abbildung 3.21: Fließdiagramm der einzelnen Schritte zur Produktion, Isolation und Aufreinigung von *Inclusion Bodies*

Während des Protokolls zur Produktion, Isolation und Aufreinigung wurden u.a. vor Induktion (vI) und nach Induktion (nI) Proben entnommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 3.22). Zusätzlich wurden Proben der einzelnen Waschschrte über eine SDS-PAGE Gel analysiert um einen eventuellen Verlust von Protein zu dokumentieren (siehe Anhang, Abbildung A.6). Ergänzend zu den beiden Lipoxygenasen ALOXe3 und AmbLOXe wurden auch GST-GFP (54 kDa) *Inclusion Bodies* [112] nach dem gleichen Protokoll produziert und aufgereinigt. Diese wurden als Negativkontrolle bei den

unterschiedlichen Assays verwendet. Die Bestimmung der Konzentration an *Inclusion Bodies* in den aufgereinigten Fraktionen ist mittels der meisten konventionellen Methoden, wie beispielsweise der Messung der Absorption bei 280 nm oder der Bestimmung mittels Bradford Reagenz, nicht möglich, da die Proteine für solch eine Messung in löslicher Form vorliegen müssen. Aus diesem Grund wurde die Proteinkonzentration der aufgereinigten *IBs* über eine densitometrische Auswertung der auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragenen Fraktionen bestimmt. Als Standard zur Erstellung einer Kalibrationskurve wurde Bovines Serumalbumin (BSA) verwendet (Abbildung 3.22).

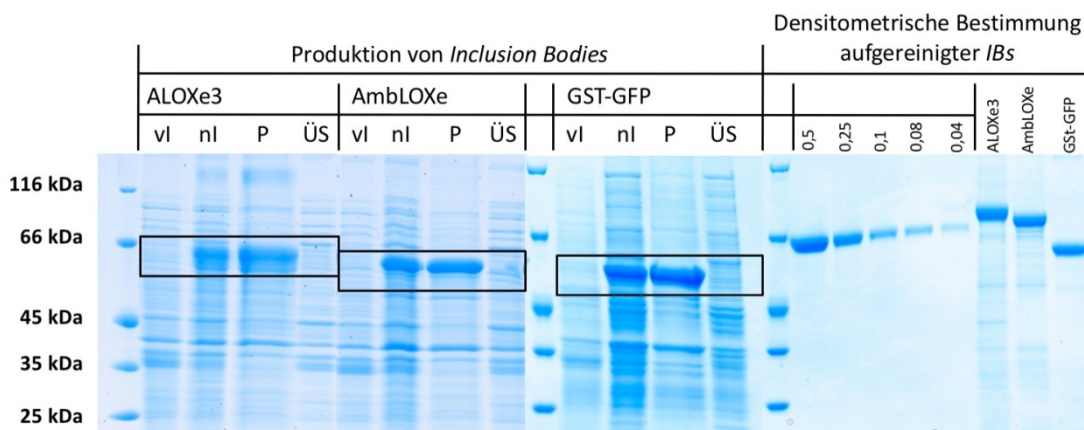


Abbildung 3.22: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Produktion von *Inclusion Bodies* und densitometrische Konzentrationsbestimmung; aufgetragen sind jeweils die Proben direkt vor Induktion (vi), 3 Stunden nach Induktion (ni) (Zellen aufgeschlossen), sowie die Pellet (P) und Überstandfraktion (ÜS) nach Zellaufschluss; zur densitometrischen Konzentrationsbestimmung wurden die *Inclusion Body* Fraktionen (aus Waschschrift mit 25 mL H₂O) 1:10 verdünnt; als Größenstandard diente BSA (0,04 – 0,5 mg/mL)

Die Proteine ALOXe3, AmbLOXe und GST-GFP konnten alle heterolog in Form von unlöslichen *IBs* exprimiert werden (Abbildung 3.22; nach Induktion (ni) und Pellet (P)). Die unterschiedlichen Waschschriffe und Prozessierungen nach Aufschluss der Bakterienzellen ermöglichten eine Aufreinigung der *Inclusion Bodies* (Abbildung 3.22; Densitometrische Bestimmungen aufgereinigter *IBs* ALOXe3, AmbLOXe und GST-GFP (Proben 1:10 verdünnt)). Insgesamt konnten basierend auf einer Kultivierungsmenge von 1 L für ALOXe3, AmbLOXe und GST-GFP jeweils 175 mg, 171 mg und 159 mg *Inclusion Bodies* aufgereinigt werden. Die Steriltests während der Aufreinigungsschritte zeigten keine Kontamination. Zusätzlich zeigte sich bei Analyse der einzelnen Waschfraktionen mittels

SDS-PAGE, dass im Rahmen des Aufreinigungsprozesses kaum Verlust an Zielprotein vorhanden war (siehe Anhang, Abbildung A.6).

Die Fraktionen „nach Induktion“ und die aufgereinigten *Inclusion Body* Fraktionen der Lipoxygenasen ALOXe3 und AmbLOXe wurden zusätzlich mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) analysiert. Dazu wurde die „Bottom-up“ Methode verwendet, bei der die aus dem Gel herausgelösten Banden/Proteine durch Trypsin in Fragmente verdaut werden, diese über eine Flüssigchromatographie getrennt werden und anschließend auf Grundlage ihres Peptidmassenfingerprints identifiziert werden. Dabei konnten in den jeweiligen Proben eindeutig ALOXe3 (Übereinstimmung nach Induktion: 72,48 %, aufgereinigte *IBs*: 80,93 %) bzw. AmbLOXe (nach Induktion: 87 %, aufgereinigte *IBs*: 97,83 %) identifiziert werden. Die LC/MS Messungen wurden von der Zentralen Forschungseinrichtung Proteomics der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Zusammenfassend konnten *Inclusion Bodies* der Proteine ALOXe3, AmbLOXe und GST-GFP produziert und aufgereinigt werden. Dadurch, dass Proteine in Form von *IBs* sehr stabil und wenig anfällig gegenüber äußeren Einflüssen sind, ist eine Lagerung der aufgereinigten *IBs* in Pellets bei -80 °C über einen längeren Zeitraum (mehrere Monate) möglich. Somit stehen die aufgereinigten *Inclusion Bodies* in Aliquots für die unterschiedlichen, folgenden Versuche zur Solubilisierung und Rückfaltung, Aktivitätsbestimmung und für Wundheilungsassays zur Verfügung. Zusätzlich ist eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben, da für die Versuche jeweils *Inclusion Bodies* aus den gleichen Kultivierungen und Aufreinigungen genutzt werden können.

3.3.2. Solubilisierung und Rückfaltung von Lipoxygenasen aus *Inclusion Bodies*

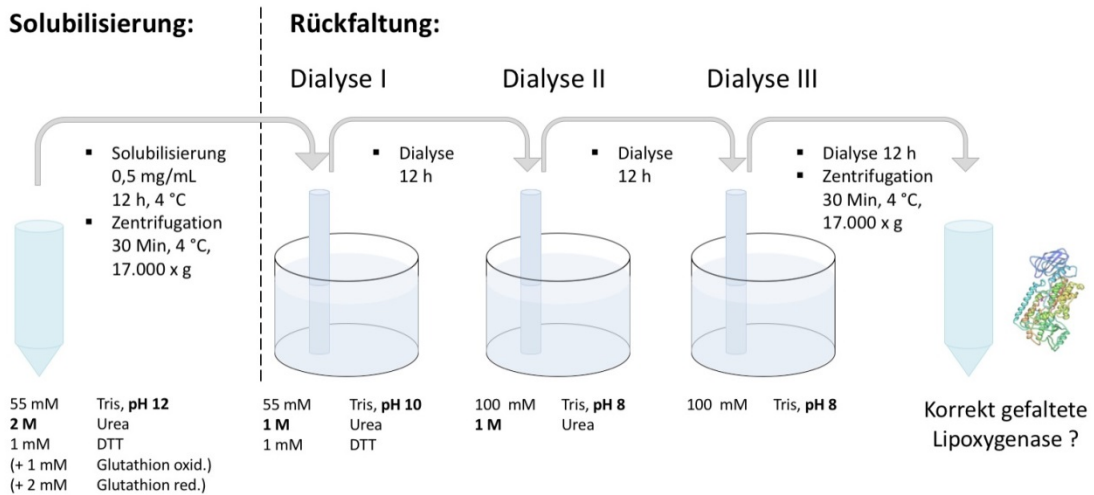
Die Gewinnung von korrekt gefaltetem Protein aus *Inclusion Bodies* umfasst je nach Protokoll zwei bis drei Schritte: Solubilisierung der *IBs*, Rückfaltung des solubilierten Proteins und eventuell eine notwendige Aufreinigung des Proteins [110,113]. Für diesen Versuchsabschnitt wurden unterschiedliche Methoden zur Solubilisierung und Rückfaltung getestet. Bereits bei der Aufreinigung mittel HisPur™ Ni-NTA *Spin Columns* konnte gezeigt werden, dass es möglich ist AmbLOXe durch die Zugabe von 6 M Urea und 0,25 % Triton X-100 aus einer unlöslichen Fraktion zu solubilisieren (3.2.3). In diesem Fall wurde aber nur das Ziel der Solubilisierung verfolgt und keine Rückfaltung durchgeführt.

In diesem Abschnitt der experimentellen Arbeiten wurde die **Solubilisierung** in einem Puffer mit 2 M Urea und einem hohen pH-Wert (pH 12) durchgeführt. Bei klassischen Protokollen zur Solubilisierung von Proteinaggregaten werden zumeist sehr hohe Konzentrationen (>5 M) an chaotropen Denaturierungsmitteln (z.B. Urea oder Guanidiniumhydrochlorid) oder an ionischen Detergenzien (z.B. N-Lauroylsarcosin) zur Solubilisierung eingesetzt [114]. In vorliegendem Fall wurde keine hohe Konzentration an Denaturierungsmittel eingesetzt, da dieses bereits korrekt ausgebildete dreidimensionale Strukturen wieder zerstören könnte. In *Inclusion Bodies* aggregierte Proteine haben häufig bereits einen Großteil ihrer Strukturen ausgebildet, da die Bildung von *IBs* in einer späten Phase des Proteinfaltungsweges stattfindet [113,115]. Urea wirkt in der hier eingesetzten niedrigen Konzentration (2 M) nicht denaturierend und zerstört somit auch nicht bereits ausgebildete Strukturen. Es unterbindet vielmehr die hydrophoben Wechselwirkungen der *IBs* untereinander und wirkt somit unterstützend bei der Solubilisierung, die durch einen hohen pH-Wert herbeigeführt wird. Der hohe pH-Werte des Puffers (pH 12) sorgt für eine Ladungsverteilung von negativer Ladung entlang des Proteins und somit für eine Solubilisierung des Proteins [116].

Zur **Rückfaltung** der Proteine wurden anschließend zwei unterschiedliche Protokolle zur Entfernung der solubilisierenden Substanzen getestet, die schrittweise Dialyse und die Verdünnungsmethode mit anschließender Dialyse (Abbildung 3.23). Das Entfernen der solubilisierenden Substanzen ist ein kritischer Schritt, da ein zu zügiges Entfernen häufig zu Fehlfaltungen oder erneuten Aggregationen führen kann, da freigelegte hydrophobe Oberflächen aufeinander treffen [114,117]. Bei der **schrittweisen Dialyse** wird eine mittlere Konzentration des Denaturierungsmittels als Zwischenstufe in der Dialyse genutzt. Im vorliegenden Fall wurde diese Methode genutzt, um über drei Dialysestufen den pH-Wert zu senken und gleichzeitig Urea zu entfernen. Bei der so genannten **Verdünnungsmethode** wird Protein, welches in einem geringen Volumen an Puffer solubilisiert wurde, kontinuierlich einem größerem Volumen Puffer zugeführt, der keine Denaturierungsmittel enthält. In diesem Puffer findet dann die Rückfaltung statt. Durch die Zugabe eines kleinen Volumens solubilisierten Proteins in eine große Menge Puffer soll eine Aggregation verhindert werden, da die Aggregation eine Funktion der Proteinkonzentration ist und je geringer die Chance ist, dass freigelegte hydrophobe Bereiche der Proteine aufeinander treffen, bevor diese gefaltet sind, desto weniger Aggregation findet statt [114]. In diesem Experiment wurde durch die dreistufige Verdünnungsmethode der pH-Wert

gesenkt und in einem anschließenden Dialyseschritt Urea entfernt. Insgesamt ist die Verdünnungsmethode mit Dialyse aufwändiger und zeitintensiver, arbeitet jedoch mit weniger Puffern. Beide Methoden verfolgen das Ziel, eine Rückfaltung durch Herabsetzen des pH-Wertes und die Entfernung von Urea zu erreichen (Abbildung 3.23).

Schrittweise Dialyse:



Verdünnungsmethode + Dialyse:

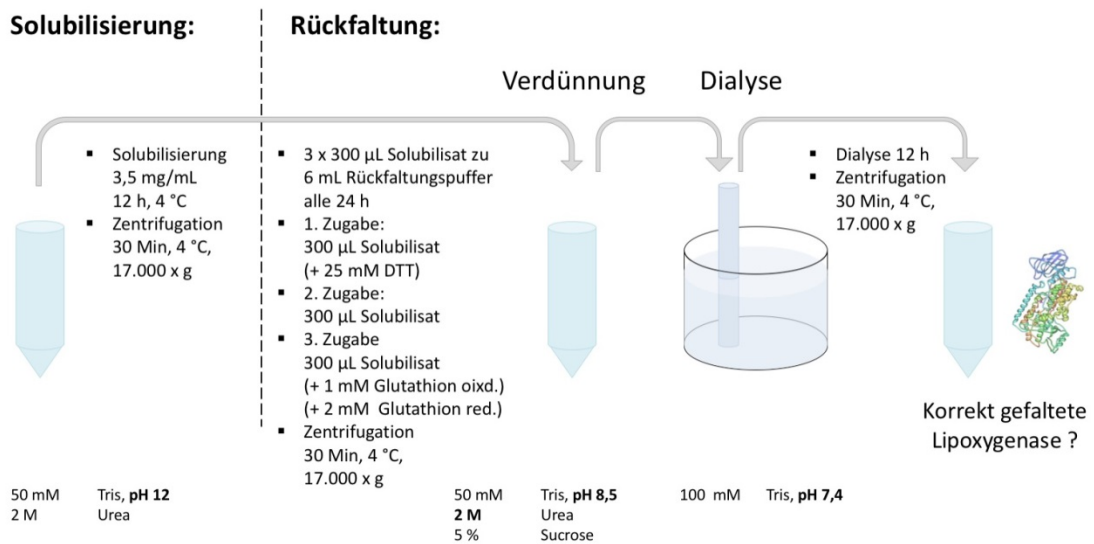


Abbildung 3.23: Schematische Darstellung der Solubilisierungs- und Rückfaltungsprotokolle mittels schrittweiser Dialyse und mittels der Verdünnungsmethode in Kombination mit Dialyse

Des Weiteren wurde sowohl für die Dialyse- als auch für die Verdünnungsmethode überprüft, inwieweit eine Zugabe von Glutathion in seiner reduzierten und oxidierten Form und Dithiothreitol (DTT) die Rückfaltung positiv beeinflussen kann. Für die Lipoxygenasen wurde zwar angenommen, dass in der natürlichen Form der Proteine keine Disulfidbrücken vorhanden sind, jedoch könnte vor allem das reduzierende Glutathion unterstützend wirken, falls sich bei Bildung der Proteinaggregate Disulfidbrückenbindungen gebildet haben, die natürlicherweise nicht vorkommen und dadurch eine Aggregation herbeiführen.

Bei beiden Methoden wurde nach jedem Zentrifugationsschritt eine Probe des Überstandes entnommen, welcher weiter verarbeitet und mittels SDS-PAGE untersucht wurde (Abbildung 3.24 und Abbildung 3.25). Die Proteinkonzentrationen wurden densitometrisch mit BSA als Größenstandard bestimmt (Tabelle 3.4).

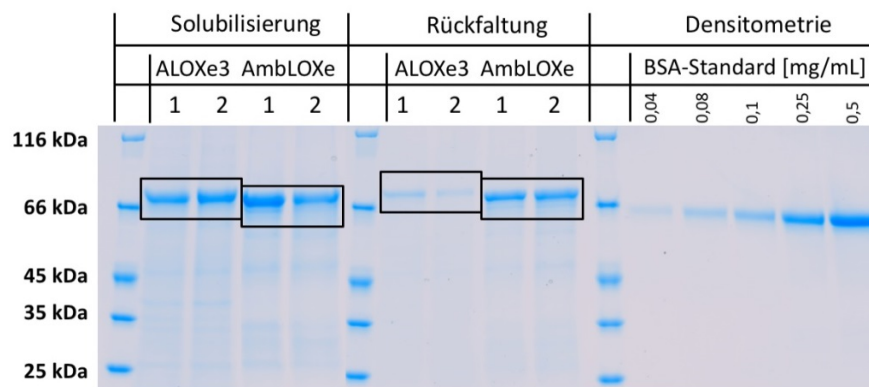


Abbildung 3.24: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; densitometrische Konzentrationsbestimmung der löslichen Proteinen (ALOXe3 und AmbLOXe) nach Solubilisierung und Rückfaltung (schrittweise Dialyse); 1: Puffer mit DTT und ohne Glutathion, 2: Puffer mit DTT und mit Glutathion (oxidiert und reduziert); als Größenstandard diente BSA (0,04 – 0,5 mg/mL)

Tabelle 3.3: Ergebnisse der densitometrischen Konzentrationsbestimmung bei Nutzung von schrittweiser Dialyse zur Rückfaltung

[mg/mL]	ALOXe3 1	ALOXe3 2	AmbLOXe 1	AmbLOXe 2
Ausgangskonzentration	0,50 (100 %)	0,50 (100 %)	0,49 (100 %)	0,49 (100 %)
Nach Solubilisierung	0,31 (62,8 %)	0,36 (71,4 %)	0,55 (113 %)	0,40 (81,7 %)
Nach Rückfaltung/Dialyse	0,04 (7,5 %)	0,01 (1,9 %)	0,18 (36,8 %)	0,20 (41,8 %)

Mit dem Solubilisierungsschritt des Protokolls der schrittweisen Dialyse bei pH 12, 2 M Urea und 1 mM DTT konnte für ALOXe3 63 (ohne Glutathion) bzw. 71 % (mit Glutathion) des ursprünglich in *Inclusion Bodies* vorliegenden Proteins solubilisiert werden. Für AmbLOXe konnten unter den gleichen Bedingungen sogar 100 bzw. 82 % solubilisiert werden. Im weiteren Verlauf des Protokolls lag nach der Dialyse für ALOXe3 7,5 bzw. 2 % des gesamten eingesetzten Proteins in Lösung vor. Für AmbLOXe lagen 37 bzw. 42 % der ursprünglichen Proteinmenge löslich vor.

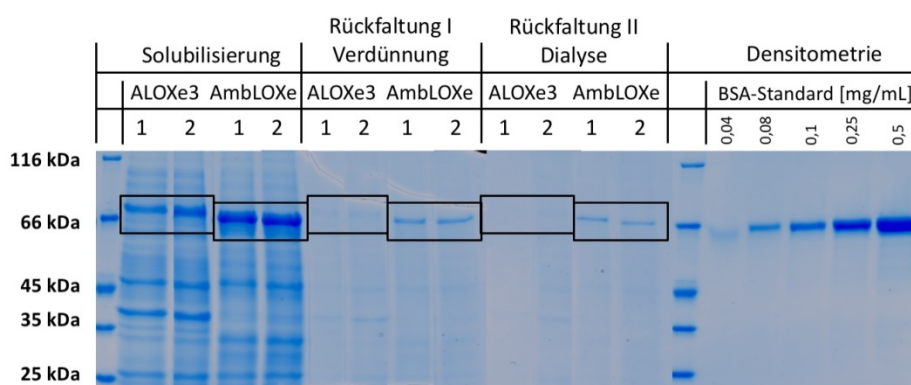


Abbildung 3.25: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; densitometrische Konzentrationsbestimmung der löslichen Proteine (ALOXe3 und AmbLOXe) nach Solubilisierung und Rückfaltung (Verdünnungsmethode und Dialyse); 1: Puffer ohne DTT und ohne Glutathion, 2: Puffer mit DTT (bei Rückfaltung) und mit Glutathion (oxidiert und reduziert); als Größenstandard diente BSA (0,04 – 0,5 mg/mL); Proben normiert (bezogen auf Abbildung 3.24)

Tabelle 3.4: Ergebnisse der densitometrischen Konzentrationsbestimmung bei Nutzung von Verdünnungsmethode und Dialyse zur Rückfaltung

[mg/mL]	ALOXe3 1	ALOXe3 2	AmbLOXe 1	AmbLOXe 2
Ausgangskonzentration	0,50 (100 %)	0,50 (100 %)	0,49 (100 %)	0,49 (100 %)
Nach Solubilisierung	0,11 (21,1 %)	0,20 (39,9 %)	0,31 (64,0 %)	0,37 (75,4 %)
Nach Rückfaltung /Verdünn.	-	-	0,03 (5,8 %)	0,03 (6,4 %)
Nach Dialyse	-	-	0,03 (5,6 %)	0,02 (4,1 %)

Mit dem Solubilisierungsschritt des Verdünnungsprotokolls konnte weniger aggregiertes Protein aus den *IBs* in Lösung gebracht werden. Da bei diesem Protokoll die Zugabe von

DTT und Glutathion erst im Rahmen der Rückfaltung erfolgte, wurden die Proben von ALOXe3 1 und ALOXe3 2 bzw. AmbLOXe 1 und AmbLOXe 2 jeweils im gleichen Puffer (50 mM Tris, pH 12 mit 2 M Urea) solubilisiert. Für ALOXe3 konnten damit 21 bis 40 % der ursprünglichen Proteinmenge solubilisiert werden und für AmbLOXe 64 bis 75 %. Die im anschließenden Protokoll in Lösung befindliche Proteinmenge war für ALOXe3 unterhalb des mittels Densitometrie detektierbaren Bereiches. Für AmbLOXe waren nach Abschluss des Rückfaltungsprotokolls zwischen 4,1 und 5,6 % der ursprünglich eingesetzten Proteinmenge in Lösung.

Dass für das Verdünnungsprotokoll eine kleinere Menge Protein aus den *IBs* solubilisiert werden konnte, kann dabei vor allem an dem geringeren Volumen des eingesetzten Solubilisierungspuffers und somit der höheren Konzentration von 3,5 mg/mL *IBs* liegen. Beim Protokoll der schrittweisen Dialyse wurden die *IBs* mit einer Konzentration von 0,5 mg/mL gelöst. Möglicherweise war dadurch beim Verdünnungsprotokoll das Volumen des Solubilisierungspuffers nicht ausreichend, um alle in *IBs* befindlichen Proteine herauszulösen. Ein weiterer Aspekt könnte die zusätzliche Zugabe von DTT zum Solubilisierungspuffer für die schrittweise Dialyse sein. Durch seine reduzierende Wirkung konnten sich möglicherweise vorhanden Disulfidbrücken leichter auflösen. Die Proteinmengen, die nach Durchführung des Rückfaltungsprotokolls in Lösung vorlagen, waren für die dreistufige Dialyse ebenfalls wesentlich höher als für das Protokoll, welches eine Rückfaltung mittels der Verdünnungsmethode vorsieht. Bei beiden Protokollen konnte für AmbLOXe mehr Protein zurückgefaltet werden, als für ALOXe3.

3.3.2.1. Thermal Shift Assay

Die nach den Rückfaltungsprotokollen in Lösung befindlichen Lipoxygenasen wurden mittels eines *Thermal Shift Assays (TSA)* auf ihre Struktur hin untersucht. Damit sollte herausgefunden werden, ob Interaktionen vorliegen, die auf eine korrekte Faltung der Proteine schließen lassen. Das Prinzip des *TSA* besteht darin, dass der fluoreszierende Farbstoff Sypro® Orange an die hydrophobe Oberfläche eines Proteins bindet. Wenn ein gefaltetes Protein durch die Erhöhung der Temperatur (stufenweise von 25 auf 100 °C) seine ausgebildete, dreidimensionale Struktur auflöst, werden weitere hydrophobe Oberflächen freigelegt, an welche Sypro® Orange bindet. Als Folge dieser vermehrten Bindung entsteht ein Fluoreszenz-Peak im Diagramm (Abbildung 3.26).

Bei allen Messungen wurde die gleiche Probenmengen ($5 \mu\text{M}$ Protein) eingesetzt. Die AmbLOXe Proben nach dreistufiger Dialyse zeigten bereits zu Beginn der Messung einen hohen Fluoreszenzwert (Abbildung 3.26). Es scheinen also entsprechend schon viele hydrophobe Bereiche offen zu liegen. Dieser Wert sinkt mit steigender Temperatur und vergangener Zeit. Gründe hierfür könnten der Photobleachingeffekt oder das Zusammenlagern von hydrophoben Strukturen sein, sodass weniger Sypro® Orange bindet [118]. Zwischen 65 und $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ist ein Fluoreszenzpeak zu erkennen, dieser ist jedoch sehr klein. Ein Teil des AmbLOXe Proteins scheint also Strukturen ausgebildet zu haben, die sich bei dieser Temperatur auflösen, sodass Sypro® Orange an die dadurch offen liegenden hydrophoben Bereiche binden kann. Ein entsprechender Peak ist für AmbLOXe bei der Verdünnungsmethode auch erkennbar, allerdings bei einer wesentlich höheren Temperatur (zwischen 85 und $90 \text{ }^\circ\text{C}$). Für ALOXe3 ist bei keiner der Proben, unabhängig von der Rückfaltungsmethode, ein Peak erkennbar. Somit scheinen sich für ALOXe3 keine dreidimensionalen Strukturen ausgebildet zu haben.

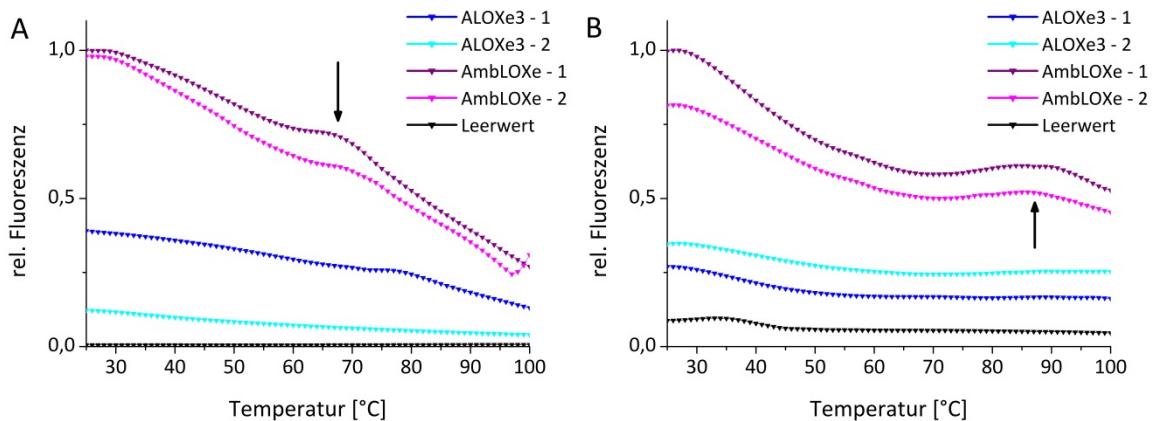


Abbildung 3.26: Thermal Shift Assay für die Rückfaltung mittels Dialyse (A) und für die Rückfaltungskombination aus Verdünnungsmethode und Dialyse (B); dargestellt ist die relative Fluoreszenz bezogen auf den höchsten ermittelten Wert; Dialyse (A): 1: Probe mit DTT und ohne Glutathion, 2: Probe mit DTT und mit Glutathion, Verdünnungsmethode/Dialyse (B): 1: Probe ohne DTT und ohne Glutathion, 2: Probe mit DTT und mit Glutathion; die Peaks sind durch einen Pfeil gekennzeichnet

Zusammenfassend bietet die Solubilisierung ($0,5 \text{ mg/ml IBs}$) mit einem Tris-haltigem Puffer bei einem hohen pH-Wert ($\text{pH } 12$) und unter Zusatz von 2 M Urea und DTT in Kombination mit einer Rückfaltung über eine dreistufige Dialyse eine gute Möglichkeit lösliches Protein zu erhalten. Insbesondere für AmbLOXe konnten dadurch 40% der ursprünglich in *IBs*

vorliegenden Proteine auch nach Entfernung der denaturierenden Bedingungen in Lösung gebracht werden. Der Einsatz von Glutathion hat sich dabei als nicht förderlich herausgestellt. Somit scheinen keine natürlichen Disulfidbrückenbindungen vorzuliegen, welche gespalten und erneut richtig zusammengeführt werden müssen. Die Ausbildung eines hydrophoben Kerns und somit einer wirklich korrekten Faltung der Proteine konnte mittels des TSA für keines der Protokolle eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings deutet der Fluoreszenzpeak zwischen 65 und 70 °C nach dreistufiger Dialyse für AmbLOXe darauf hin, dass sich teilweise Strukturen mit einem hydrophoben Kern ausgebildet haben. Diese Solubilisierungs- und Rückfaltungsmethode liefert somit eine gute Ausgangslage für weitere Untersuchungen und Optimierungen. Um eine mögliche korrekte Rückfaltung nachzuweisen wurde im folgenden Kapitel zusätzlich die Lipoxygenaseaktivität der in Lösung befindlichen Proteine untersucht und mit der Lipoxygenaseaktivität von Proben anderen Ursprungs verglichen.

3.3.3. Lipoxygenase Assay (LOX Assay)

Der genaue Reaktionsmechanismus der epidermalen Lipoxygenasen AmbLOXe ist bisher noch nicht aufgeklärt. Für die epidermale Lipoxygenase ALOXe3 wird angenommen, dass sie an der Oxidation von linolsäurehaltigen Ceramiden der Haut beteiligt ist. Dabei wird die Annahme postuliert, dass ALOXe3 vor allem als Hydroperoxidisomerase fungiert, also Hydroperoxide in Epoxyalkohole umwandelt [41–43]. Aufgrund der Sequenzidentitäten von ALOXe3 und AmbLOXe mit 12-LOX und 15-LOX (3.1) wurde ein Assay zur Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität von 15-LOX genutzt, um mögliche Aktivitäten von ALOXe3 und AmbLOXe nachzuweisen. Das *Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit* (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA), welches normalerweise zur Detektion von Inhibitoren genutzt wird, wurde entsprechend in seiner Durchführung angepasst (keine Inhibitorzugabe, Anpassung des Volumens). Als Substrat in diesem Assay dient Arachidonsäure. Die von Lipoxygenasen katalysierte Addition von molekularem Sauerstoff an das cis,cis-1,4-Pentadien-System dieser Fettsäure wird in dem Assay über das entstehende Hydroperoxid bestimmt. Dieses Hydroperoxid kann aufgrund seiner Reaktion mit einem Chromogen und des daraus resultierenden bei 495 nm absorbierenden Farbstoffes detektiert werden.

Das Assay wurde dazu genutzt die Lipoxygenaseaktivität von Proben zu untersuchen, die mittels unterschiedlicher Verfahren gewonnen wurden. Es wurde die Aktivität von Lipoxygenase *Inclusion Bodies* in Zelllysaten bestimmt. Diese wurden bei unterschiedlichen

Expressionstemperaturen produziert und anschließend mit verschiedenen Aufschlussmethoden aus den Zellen gewonnen. Weitere Proben entstammen der im vorherigen Kapitel beschriebenen Solubilisierungs- und Rückfaltungsversuche. Als dritter Ansatz wurde die Aktivität von Proteinen untersucht, die durch eine geringe, nicht-denaturierende Konzentration von N-Lauroylsarcosin aus aufgereinigten *Inclusion Bodies* extrahiert wurden. Im Rahmen dieses Ansatzes wurden zusätzlich die aufgereinigten *IBs* selbst auf eine mögliche Aktivität hin untersucht.

Zusammenfassend wurden mit dem LOX Assay Proben vermessen, die mittels folgender Verfahren gewonnen worden sind:

- Zellysate (mit *IBs*) produziert bei unterschiedlichen Expressionstemperaturen und mit unterschiedlichen Zellaufschlussmethoden gewonnen
- Aus *IBs* solubilisiertes und im Rückfaltungsprotokoll prozessiertes Protein
- Aus *IBs* mit N-Lauroylsarcosin extrahiertes Protein
- Aufgereinigte *Inclusion Bodies*

Die im LOX Assay analysierten Zellysate wurden bei Expressionstemperaturen von 25 und 30 °C kultiviert und anschließend mittels unterschiedlicher Methoden (BugBuster®, Ultraschall und French Press) aufgeschlossen. Eine densitometrische Auswertung der Proben zeigte keine Unterschiede bei den Konzentrationen der produzierten bzw. aus den Zellen herausgelösten *Inclusion Bodies*. Ebenfalls konnten keine Aktivitäten mit dem LOX Assay für diese Proben detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, ob einer der gewählten Expressionstemperaturen bzw. Aufschlussmethoden zu *Inclusion Bodies* führt, die eine höhere Aktivität aufweisen. Da die untersuchten Proben vor Bestimmung der LOX Aktivität keinen weiteren Aufreinigungsschritten unterzogen wurden, könnten in diesem Fall auch Störstoffe in den Zellysaten dafür verantwortlich sein, dass keine Aktivität ermittelt werden konnte. So können beispielsweise Peroxidasen die Konzentration des synthetisierten Hydroperoxides beeinflussen. Daher scheint das LOX Assay nur in geringem Maße für die Aktivitätsbestimmung in Zellysaten geeignet.

Die im vorangegangenen Kapitel solubilisierten und rückgefalteten Lipoxygenasen ALOXe3 und AmbLOXe wurden ebenfalls mit dem Lipoxygenase Assay auf ihre Aktivität untersucht. Dabei konnte keine Aktivität ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt darauf

schließen, dass durch das Rückfaltungsprotokoll kein Protein entstanden ist, dass das im LOX Assay eingesetzte Substrat umsetzen kann. Dies kann damit zusammenhängen, dass ALOXe3 und AmbLOXe möglicherweise gar keine Aktivität für die Umsetzung von Arachidonsäure haben. Es kann auch bedeuten, dass die Rückfaltung gar nicht oder nicht im erwarteten Umfang und vor allem nicht im katalytischen Zentrum stattgefunden hat. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen des *Thermal Shift Assays*. Dort konnte keine korrekte Faltung der Proteine detektiert werden.

Abschließend wurden Proben untersucht, in denen sich Protein befindet, das mittels Extraktion aus *IBs* gewonnen wurde. Neben dem Extrakt wurde im Rahmen dieses Versuches auch die Aktivität der aufgereinigten *IBs* getestet. Die Extraktion wurde mit einem Puffer mit 0,2 % des Detergenz N-Lauroylsarcosin unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt [78,119,120]. Anschließend wurde die Aktivität der gesamten *IB* Fraktion und die Aktivität des extrahierten Proteins (Fraktion nach Zentrifugation) bestimmt. Als Negativkontrolle dienten aufgereinigte und ebenfalls mittels des Detergenz N-Lauroylsarcosin extrahierte Proteine aus *Inclusion Bodies* des grün fluoreszierenden Proteins (GST-GFP). Die einzelnen Fraktionen (Gesamtfraktion, sowie Überstand und Pellet nach Zentrifugation) wurden auf einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und in ihrer Konzentration bestimmt.

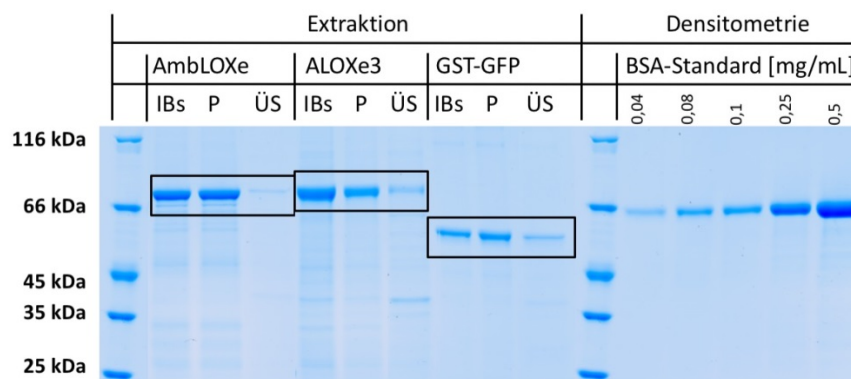


Abbildung 3.27: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; densitometrische Konzentrationsbestimmung der löslichen Proteine (AmbLOXe, ALOXe3 und GST-GFP) nicht-denaturierender Solubilisierung mit N-Lauroylsarcosin; aufgetragen sind jeweils die Proben *Inclusion Bodies* gesamt (*IBs*, 1:10 verdünnt), unlösliche Pelletfraktion nach Solubilisierung (*P*; 1:10 verdünnt) und die lösliche Überstandfraktion nach Solubilisierung (*ÜS*; unverdünnt); als Größenstandard diente BSA (0,04 – 0,5 mg/mL)

Mit dieser nicht-denaturierenden Extraktionsmethode konnte nur eine sehr geringe Menge an ALOXe3 und GST-GFP herausgelöst werden. Die Menge an extrahiertem AmbLOXe Protein war unterhalb der densitometrischen Nachweisgrenze (Abbildung 3.27). Für ALOXe3 und GST-GFP sind jeweils 0,03 mg/mL Protein für das Extrakt ermittelt worden, dies entspricht in beiden Fällen ca. 1 % der eingesetzten Proteinmenge. Allerdings liegen die ermittelten Werte auch am unteren Rand der densitometrischen Nachweisgrenze. Insgesamt konnte keine größere Menge an Protein mit N-Lauroylsarcosin aus den *IBs* isoliert werden.

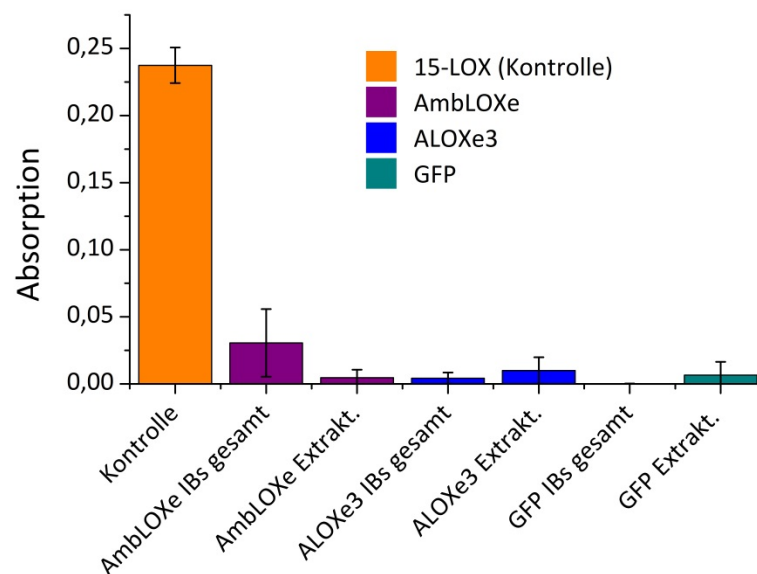


Abbildung 3.28: Lipoxygenase Assay der Extraktion mit N-Lauroylsarcosin; Gesamtfractionen (*IBs* gesamt) und mittels N-Lauroylsarcosin extrahiertes Proteine (Extrakt.); dargestellt sind die absoluten mittleren Absorptionen

Im LOX Assay konnte für die AmbLOXe *IB* Gesamtfraction eine sehr geringe Absorption ermittelt werden (Abbildung 3.28). Da der Absorptionsmittelwert eine sehr hohe Standardabweichung besitzt und im Vergleich zur Positivkontrolle sehr gering ausfällt, ist es fraglich, ob direkte Rückschlüsse auf die Aktivität von AmbLOXe *IBs* gezogen werden können. Für die anderen Proben konnte nur sehr geringe Absorptionen ermittelt werden, die zu vernachlässigen sind. Eine erneute Durchführung der Messung für die AmbLOXe *IBs* führte zu vergleichbaren mittleren Absorptionen (AmbLOXe *IBs* gesamt: $0,026 \pm 0,002$). Somit könnte möglicherweise eine 15-LOX Aktivität für AmbLOXe vorliegen.

Insgesamt konnten mit dem Lipoxygenase Assay jedoch keine signifikanten Aktivitäten für die untersuchten Proben nachgewiesen werden. Dies kann daran liegen, dass entsprechende Aktivitäten nicht vorliegen oder diese durch andere Stoffe gestört werden (dies kann insbesondere bei den Zelllysatsproben der Fall sein). Andererseits wurde angenommen, dass das Assay, welches für das Screening für Inhibitoren der 15-Lipoxygenase gedacht ist, auch äquivalent für die Aktivitätsbestimmung von ALOXe3 und AmbLOXe verwendet werden kann. Da keine signifikante enzymatische Aktivität für die Lipoxygenasen mit diesem Assay detektiert werden konnte und die genauen enzymatischen Mechanismen, insbesondere von AmbLOXe, noch nicht vollständig aufgeklärt sind, wurde im Folgenden ein anderer Weg zur Charakterisierung der Lipoxygenasen gewählt. Dazu wurde in verschiedenen *in vitro* Wundheilungsassays die Bioaktivität der Lipoxygenase *Inclusion Bodies* bestimmt.

3.3.4. *In vitro* Wundheilungsassays

Im folgenden Kapitel wird auf die Beurteilung der Wundheilungseigenschaften der Lipoxygenasen ALOXe3 und AmbLOXe eingegangen. Da die Mechanismen der Aktivität der beiden Lipoxygenasen ALOXe3 und AmbLOXe noch nicht im Detail bekannt sind und somit eine direkte Enzymaktivitätsbestimmung schwer ist, bieten *in vitro* Wundheilungsassays eine gute Möglichkeit die Bioaktivität dieser beiden Enzyme genauer zu beleuchten. Im vorliegenden Fall sollte die Bioaktivität der in *Inclusion Bodies* befindlichen Lipoxygenasen untersucht werden. Dazu wurden die *IBs* auf unterschiedliche Weise in die Versuchsabläufe der Wundheilungsassays eingebunden. Die *IBs* wurden einerseits zur Beschichtung der Zellkulturoberfläche genutzt, bevor die Zellen für ein Wundheilungsassay darauf angesiedelt wurden. Andererseits wurde auch eine direkte Zugabe der *IBs* zum Zellkulturmedium nach Verwundung getestet. In den Experimenten wurden sowohl NiH-3T3 Fibroblasten als auch HaCaT Keratinocyten eingesetzt. Diese beiden Zelltypen eignen sich besonders, um die Bioaktivität der Lipoxygenasen zu beurteilen, da Fibroblasten und Keratinocyten an den natürlichen Wundheilungsvorgängen der Haut beteiligt sind. Daher ist anzunehmen, dass eine Bioaktivität der *Inclusion Bodies* in der Wundheilung mit diesen beiden Zelltypen nachzuweisen ist. Als Wundheilungsassays wurden das *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing Assay (ECIS Assay)*, das *Scratch Assay* und das *Culture-Insert* Wundheilungsassay genutzt.

Allgemein beinhalten Wundheilungsassays folgende Grundschritte: Wachstum einer konfluenten Zellschicht, Verletzung der Zellschicht, Beobachtung des Heilungsprozesses

und Datenaufnahme, sowie Datenauswertung. Die drei in dieser Arbeit genutzten Wundheilungsassays arbeiten dabei mit ganz unterschiedlichen Ansätzen (Abbildung 3.29). Bei der *ECIS* Methode werden Wells mit einer Elektrode genutzt, um die Bildung einer konfluenten Zellschicht, sowie die Migration von Zellen nach Verletzung über das Impedanzsignal dieser Elektrode zu dokumentieren. Die Verwundung selbst erfolgt über das Applizieren einer starken Stromspannung an der Elektrode. Weiterhin wurde das weit verbreitete *Scratch* Assay verwendet. Dieses zeichnet sich vor allem dadurch aus, dass es ein sehr einfaches Protokoll ist, welches mit in jedem Labor vorhandenen Equipment durchgeführt werden kann. Für dieses Assay wird mit einem scharfen Gegenstand (z.B. einer Pipettenspitze) eine konfluente Zellschicht verletzt und anschließend die Wundheilung über Mikroskopiebilder dokumentiert und beurteilt. Abschließend wurden *Culture-Inserts* für ein Wundheilungsassay eingesetzt. Die Nutzung von Silikon *Culture-Inserts* stellt kein Wundheilungsassay im klassischen Sinne dar. Vielmehr bilden die Silikon *Inserts*, die sich in der Mitte eines Wells befinden, eine Barriere, sodass ein definierter Bereich der Zellkulturoberfläche nicht mit Zellen besiedelt wird. Hat sich eine konfluente Zellschicht gebildet, wird das *Insert* entfernt und es entsteht ein „Wundspalt“ mit einer definierten Breite.

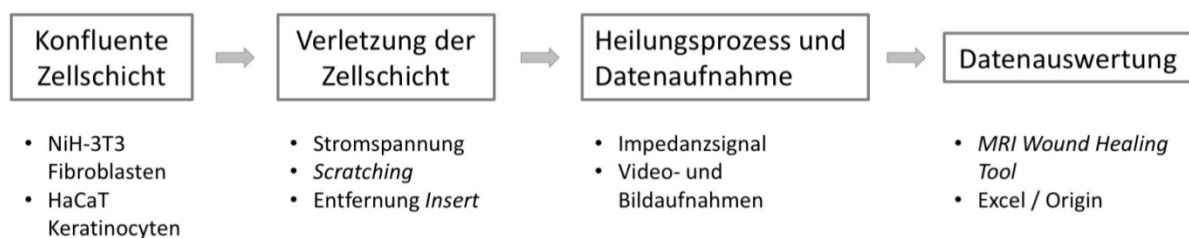


Abbildung 3.29: Übersicht über den allgemeinen Ablauf von Wundheilungsassays und Beispiele für die in dieser Arbeit genutzten Methoden

Die dargestellten Wundheilungsassays unterscheiden sich in ihrer Durchführung und ihrer Verwundungsart. Jedoch wurde bei allen Assays nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht das Standardmedium mit 10 % Fötalem Bovinem Serum (FBS) gegen ein Hungermedium mit 1 % FBS ausgetauscht. Dies sollte ermöglichen, im Rahmen der Wundheilungsassays möglichst nur jene Migration und Proliferation zu messen, die der Wundheilung zugeordnet werden kann und nicht jene, die aufgrund der normalen Zellproliferation stattfindet.

Im nächsten Kapitel wird zunächst in einem kurzen Exkurs auf den kritischen Schritt der Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen der Wunden in Wundheilungsassays genauer eingegangen, der in diesem Fall in Form des ImageJ *MRI Wound Healing Tools* gelöst werden konnte. Anschließend werden die Ergebnisse der einzelnen Wundheilungsassays dargestellt und diskutiert.

3.3.4.1. *ImageJ MRI Wound Healing Tool*

Die Datenauswertung stellt bei vielen naturwissenschaftlichen Versuchen neben der eigentlichen Versuchsdurchführung einen äußerst kritischen Schritt dar. Für die meisten Wundheilungsassays beinhaltet dieser Schritt die Auswertung von Mikroskopiebildern. Auf diesen muss zumeist die Größe der Wundfläche bzw. der Abstand der Wundränder voneinander bestimmt werden. Eine manuelle Datenauswertung ist dabei sehr zeitaufwendig, fehleranfällig und subjektiv. Aus diesen Gründen sind Methoden zu bevorzugen, die eine automatisierte und somit vergleichbare Auswertung der Daten ermöglichen.

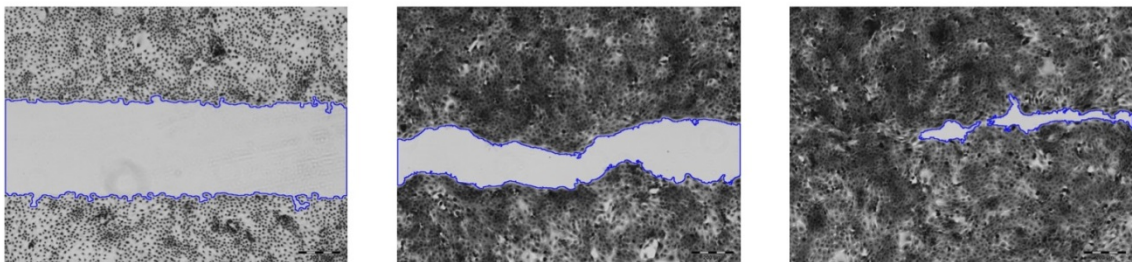


Abbildung 3.30: Beispiele für die Erfassung der Wundränder (blau) mit dem *MRI Wound Healing Tool Macro* in ImageJ

Zur Auswertung der Mikroskopiebilder des *Scratch Assays* und des Wundheilungsassays mit *Culture-Inserts* wurde in der vorliegenden Arbeit das *MRI Wound Healing Tool Macro* für ImageJ verwendet (Abbildung 3.30). Vor Detektion der Wundränder durch das Wundheilungstool wurden alle Bilder im Programm ImageJ in 32-bit Graustufenbilder umgewandelt. Als Parameter wurden die entsprechenden Default Parameter verwendet (*Method: Variance, Variance Filter Radius: 10, Threshold: 50, Radius open: 4, Min size: 10.000*). Der Varianz-Filter-Radius ist dabei jener Radius, der als Filter angewendet wird, um die mit Zellen bewachsenen Bereiche von jenen ohne Zellen zu trennen. Der Radius muss entsprechend groß gewählt werden, sodass die Varianz, die durch Zellen entsteht, von jener

unterschieden werden kann, die durch das allgemeine Rauschen im Bild entsteht. Er sollte allerdings nicht allzu groß gewählt werden, um die Berechnungszeiten nicht zu verlängern. Das aus dem Varianz-Filter resultierende Bild wird auf Grundlage des gewählten *Thresholds* in eine Maske umgewandelt. Der *Radius open* Wert wird zusätzlich genutzt, um kleinere Löcher in der konfluenten Zellschicht zu schließen. Dieser darf gleichzeitig aber nicht zu groß gewählt werden, da sonst kleinere Wundflächen nicht mehr erkannt werden. Die *Min size* gibt jene Größe an, die eine zellfreie Fläche mindestens haben muss, um als solche erkannt zu werden. Die vom Programm gemachten Angaben zur Größe der Wundfläche erfolgen in Pixel und werden vom Programm direkt nach Ausführung des Macros ausgegeben. Die weitere Prozessierung der Daten erfolgt anschließend in externen Datenverarbeitungsprogrammen (z.B. Microsoft© Excel oder OriginPro®).

3.3.4.2. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) mit NiH-3T3 Fibroblasten und HaCaT Keratinocyten

Mit der *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)* Technologie kann die Adhärenz von Zellen auf einer Elektrode in einem Well über die gemessenen Impedanz-, Widerstands- und Kapazitätswerte beobachtet werden. Dies ist aufgrund der isolierenden Wirkung der Plasmamembran der Zellen möglich. Neben der Adhärenz können zusätzlich Veränderungen im zellulären Verhalten detektiert werden. Bei Verwendung der *ECIS* Technologie in einem Wundheilungsassay erfolgt die Messung bei geringer Stromstärke und hoher Frequenz. Zur Durchführung der Wundheilungsassays wurden *ECIS* Arrays mit acht Wells benutzt, die jeweils eine einzelne lineare Messelektrode mit einer Länge von 667 µm und Breite von 150 µm enthalten (Typ-Bezeichnung: 8W2LE PET) (Abbildung 3.31).

In Vorarbeiten zur *ECIS* Technologie für ein *in vitro* Wundheilungsassay mit *Inclusion Bodies* im Rahmen dieser Arbeit musste zunächst bestimmt werden, inwieweit und in welchen Aussaatdichten sich NiH-3T3 Fibroblasten und HaCaT Keratinocyten für solch ein Assay eignen. Nach Testung unterschiedlicher Aussaatdichten und unterschiedlichen Zeitpunkten und Verletzungsmodi für NiH-3T3 Zellen zeigte sich, dass diese eher ungeeignet für die vorliegenden Experimente sind. Die Fibroblasten weisen nicht nur eine große Adhärenz zur Zellkulturoberfläche auf, sondern auch die jeweiligen Zellen zueinander. Dadurch bildet sich bereits bei geringen Zellaussaatdichten und kurzen Wachstumsphasen ein zusammenhängender Zellrasen aus NiH-3T3 Zellen. Bei Verwundung durch Anlegen einer Spannung lösten sich bei den *ECIS* Experimenten daher immer unterschiedlich große

Bereiche an Fibroblastenzellen ab. In vielen Fällen löste sich nur ein Teil der auf der Elektrode befindlichen Zellen ab. Eine erneute Verwundung war danach nicht mehr möglich, da zur Verwundung mittels Anlegen einer Spannung eine durchgängige, konfluente Zellschicht nötig ist. Zellen und Zellfetzen verblieben auf der Elektrode und das Impedanzsignal konnte nicht auf den Ausgangswert zurückfallen. Somit konnten keine uniformen Ausgangsbedingungen geschaffen werden. Dieses Phänomen zeigte sich bei allen durchgeführten *ECIS* Experimenten mit NiH-3T3 Zellen, unabhängig von den eingesetzten Zellmengen, Wachstumszeiten und Verletzungsmodi. Dass Fibroblasten für ein Wundheilungsassay unter Nutzung der *ECIS* Technologie weniger geeignet sind, wurde bereits in der Literatur postuliert [64]. Dort wird ebenfalls vermutet, dass die Zellen sich nach Verwundung nicht komplett von der Elektrode ablösen und dadurch das Signal nicht auf seinen Ausgangswert abfällt. Zusätzlich verhindern diese toten Zellen, dass neue, migrierende Zellen die Fläche der Elektrode komplett besiedeln können, wodurch das Signal nicht wieder auf jenes einer komplett bewachsenen Elektrode ansteigen kann.

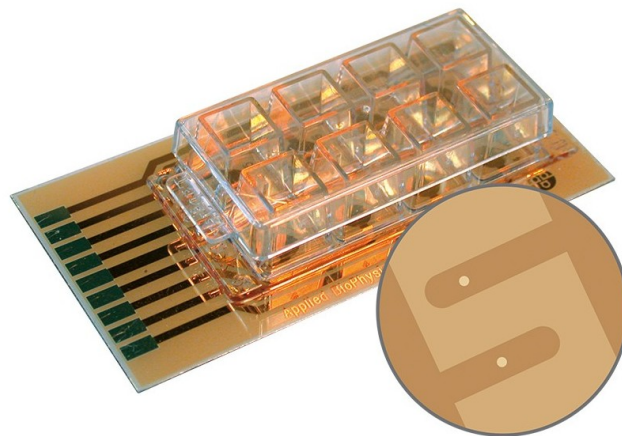


Abbildung 3.31: 8W2LE PET *ECIS* Array mit einer linearen Messelektrode (Länge: 667 μm , Breite: 150 μm); im vergrößerten Ausschnitt ist die lineare Messelektrode und die Gegenelektrode eines Wells dargestellt; Quelle: <https://ibidi.com/impedance-measurement/161-ecis-cultureware-8w2le-pet.html>

Ein weiterer im *ECIS* Assay eingesetzter Zelltyp sind HaCaT Keratinocyten. Auch bei diesen Zellen muss beachtet werden, dass sie bei Kultivierung eine starke Adhärenz zueinander aufweisen. Für diesen Zelltyp wurden ebenfalls unterschiedliche Zellaussaatdichten und Verletzungsmodi getestet. Dabei konnten Parameter für die Durchführung des Assays etabliert werden, die es ermöglichen, in allen Wells vergleichbare Ausgangsbedingungen zu schaffen. Die Experimente zeigten, dass sich eine Zelinokulationskonzentration von

$2,25 \cdot 10^5$ Zellen/cm² am besten eignet. Startet man mit dieser Zellmenge, ist nach ca. 24 Stunden eine konfluente Zellschicht entstanden und das Standardmedium kann gegen das Hungermedium (24 h) ausgetauscht werden. Bei Versuchen bezüglich der optimalen Parameter zur Verwundung der Zellschicht zeigte sich, dass für HaCaT Zellen eine Verwundung über 25 Sekunden bei einer Spannung von 5 V und einer Frequenz von 60 kHz optimal ist. Nach dem Verletzungsschritt wurde das Hungermedium gegen frisches Hungermedium ausgetauscht um verbleibende Zelltrümmer zu entfernen. Weiterhin sollte bei Zellaussaat die Hälfte des finalen Mediovolumens bereits mit Medium ohne Zellen in den Wells vorgelegt und vorgewärmt werden. Dies verhindert, dass nach Zugabe der Zellsuspension durch ein Aufwärmen des Arrayinhalts Konvektion stattfindet, die zu einer ungleichmäßigen Verteilung der sich adhätierenden Zellen führen kann, da die Zellen über den konvektiven Fluss des Mediums zum Rand des Wells gedrängt werden können.

Alle folgenden *ECIS* Versuche mit HaCaT Keratinocyten wurden mit diesen optimierten Parametern durchgeführt. Zur Beschichtung wurden die Wells der Arrays vor der Zellaussaat mit Lösungen von ALOXe3, AmbLOXe und GFP *Inclusion Bodies* inkubiert. Nach Sedimentation der *IBs* (ca. zwei Stunden bei 4 °C) wurde die überstehende Lösung vorsichtig abgenommen, sodass die *IBs* auf der Zellkulturoberfläche verblieben. Zusätzlich wurde in einem weiteren Experiment getestet, wie sich eine andere Zugabeart der *IBs* auswirkt. Dazu wurden *Inclusion Bodies* in derselben Konzentration nicht zur Beschichtung der Zellkulturoberfläche genutzt, sondern den Zellen im Rahmen eines Medienwechsels nach Verletzung hinzugefügt. Da sich auf jedem Array nur acht Wells befinden und aufgrund des Aufbaus der Apparatur nur zwei Arrays im Rahmen eines Versuches vermessen werden können, ist die Anzahl der genutzten Wells pro Versuch auf 16 beschränkt. Durch diese Limitierung konnte bei Mehrfachbestimmung für die einzelnen *Inclusion Body* Typen und unter Einbeziehung von Kontrollen nur eine Konzentration für jede *Inclusion Body* Art einbezogen werden. Im vorliegenden Experiment wurde eine *IB* Konzentration von $0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ für die Beschichtung bzw. die Zugabe gewählt.

Der erwartete Ablauf der Impedanzmessung für ein *ECIS* Wundheilungsassay ist, dass nach Erreichen einer konfluente Zellschicht im Well ein konstantes Impedanzsignal auf der Elektrode gemessen werden kann (Abbildung 3.32 und Abbildung 3.33). Darauf folgend findet zunächst der Austausch von Standardmedium zu Hungermedium statt. Der Impedanzwert bleibt anschließend weiter konstant. Nach der Verwundung durch Anlegen

einer erhöhten Stromspannung fällt der Impedanzwert der betroffenen Elektroden auf das Ausgangsniveau bzw. das Referenzniveau der Wells ohne Zellen (Leerwert) zurück. Anschließend kann die Neubesiedlung der Elektrode mit Zellen durch Migration der Zellen vom Wundrand beobachtet werden. Die Geschwindigkeit der Neubesiedlung der Elektrode mit Zellen korreliert mit der Steigung des gemessenen Impedanzwertes. Somit lässt eine größere Steigung auf eine schnellere Wundheilung schließen.

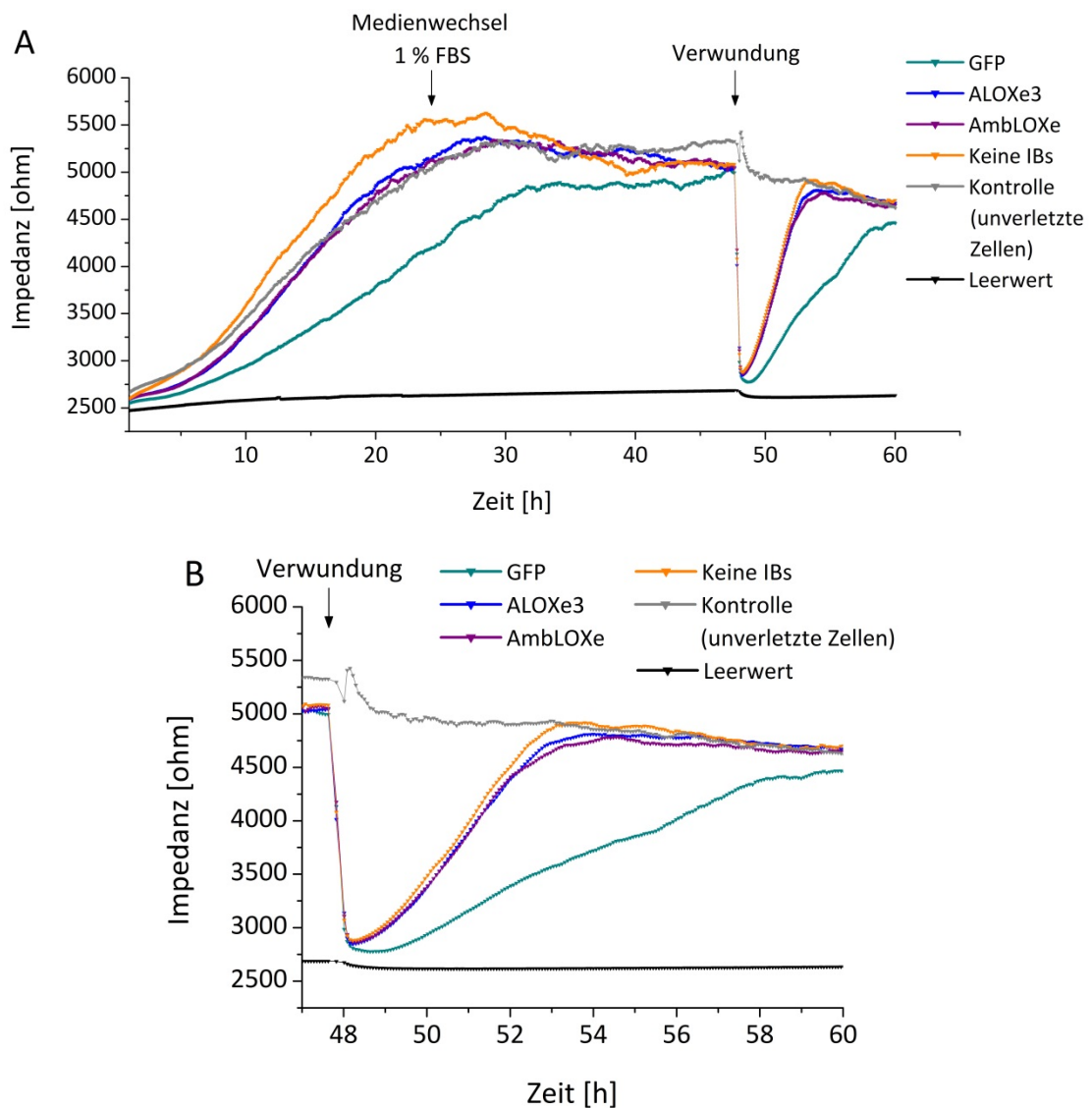


Abbildung 3.32: ECIS Assay mit *Inclusion Bodies*; Beschichtung der Zellkulturoberfläche mit *IBs* ($0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) vor Zellaussaat; A: kompletter Verlauf der Messung des Impedanzsignals bei 32 kHz, B: vergrößerte Darstellung des Verlaufs der Messung des Impedanzsignals bei 32 kHz ab Verwundung

Im vorliegenden Experiment konnte bei Beschichtung mit *Inclusion Bodies* eine konfluente Zellschicht nach ca. 24 h beobachtet werden (Abbildung 3.32, A). Wurde keine Beschichtung vorgenommen und die *IBs* erst im Rahmen der Verwundung hinzugefügt, war nach ca. 18 h ein konstantes Impedanzsignal und somit eine konfluente Zellschicht erreicht (Abbildung 3.33, A). Dieser Unterschied scheint nicht in Zusammenhang mit der Beschichtung mit *IBs* zu stehen, da jene Kontrollwerte ohne *IB* Beschichtung/Zugabe (orange) ebenfalls zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein konstantes Impedanzsignal erreicht haben.

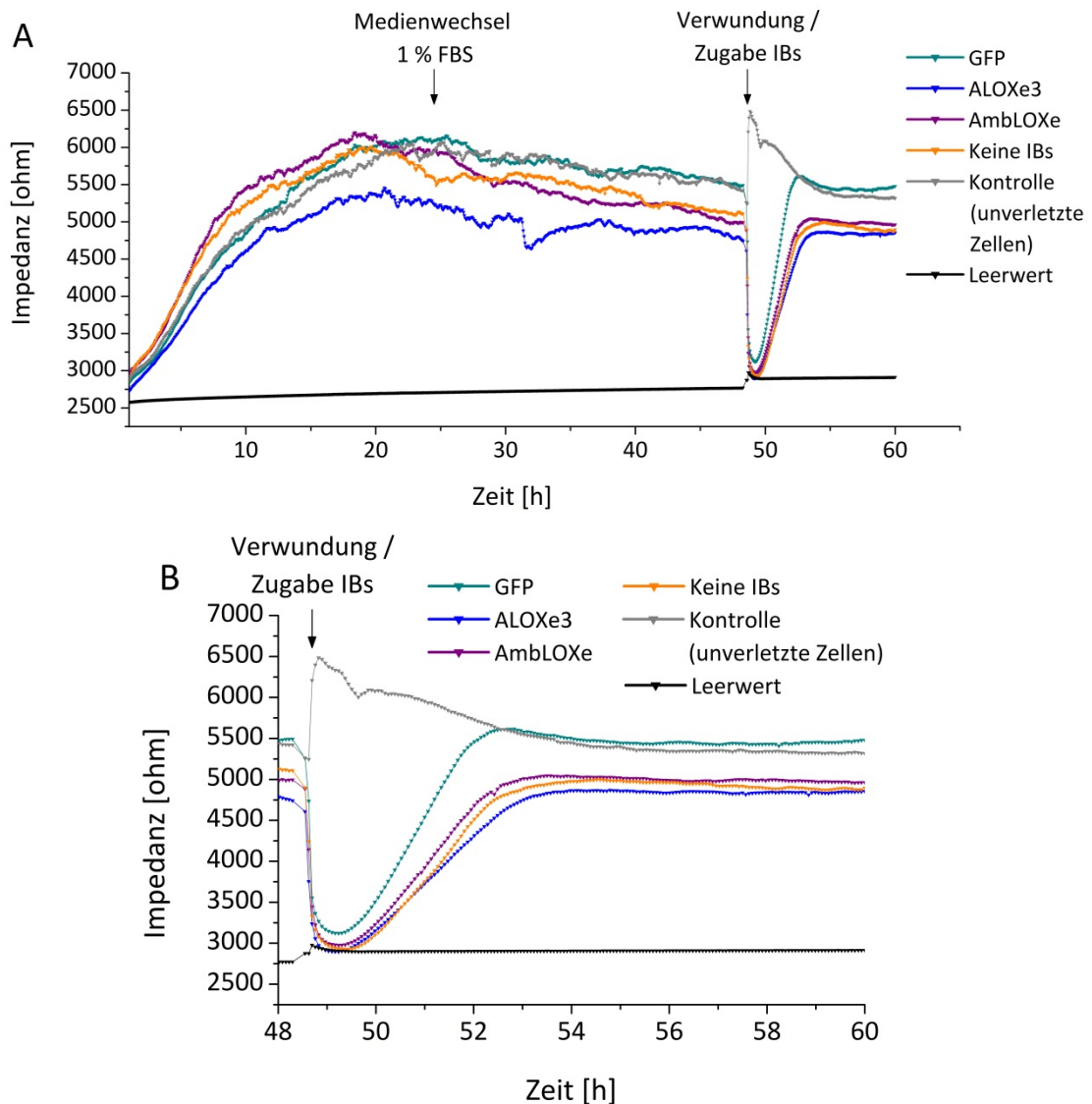


Abbildung 3.33: ECIS Assay mit *Inclusion Bodies*; Zugabe von *IBs* ($0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) nach Verwundung; A: kompletter Verlauf der Messung des Impedanzsignals bei 32 kHz, B: vergrößerte Darstellung des Verlaufs der Messung des Impedanzsignals bei 32 kHz ab Verwundung

Durch Anlegen einer Spannung von 5 V über 25 Sekunden konnte bei beiden Versuchen eine Verwundung der Zellschichten auf den Elektroden erreicht werden und die gemessenen Impedanzwerte der betroffenen Wells fielen auf das Ausgangsniveau zurück (Abbildung 3.32, B und Abbildung 3.33, B).

Bei der Beschichtung mit *IBs* (Abbildung 3.32) zeigte der Mittelwert jener Wells mit GFP Beschichtung das niedrigste Niveau nach Verwundung und das Ansteigen dieses Wertes ist wesentlich geringer als bei den anderen Proben. Jedoch zeigten diese Wells auch zuvor einen niedrigeren Impedanzwert. Somit scheint dieser erniedrigte Mittelwert nicht mit der Wirkung der GFP *Inclusion Bodies* in Verbindung zu stehen, sondern hängt vielmehr mit den vermessenen Wells und dem Wachstum der darin befindlichen Zellen zusammen. Beim Vergleich der Steigung der Impedanzwerte ohne Beschichtung und mit ALOXe3 und AmbLOXe Beschichtung konnten keine signifikanten Unterschiede entdeckt werden.

Für das Experiment, in dem die *IBs* nach Verwundung zum Zellkulturmedium gegeben wurden (Abbildung 3.33), zeigten jene Wells mit GFP Zugabe ein bis drei Stunden nach Verwundung den größten Anstieg (983 Ohm/h) im Vergleich zu ALOXe3 (581 Ohm/h), AmbLOXe (730 Ohm/h) und jener Wells ohne *IB* Zugabe (711 Ohm/h). Der Mittelwert jener Wells bei denen nach Verwundung eine Zugabe von GFP erfolgte, lag jedoch auch zuvor (zusammen mit der Kontrolle an unverletzten Zellen) am höchsten. Somit scheint auch in diesem Fall nicht die Zugabe einer bestimmten *IB* Art eine schnellere Wundheilung zu beeinflussen, sondern das allgemeine Wachstum der Zellen in diesem Well bzw. den Wells auf denen der Mittelwert gebildet wurde.

Insgesamt lässt sich aufgrund der schwankenden Bedingungen in den einzelnen Wells vor Verwundung keine Aussage darüber treffen, ob Lipoxigenase *Inclusion Bodies* in einem *ECIS* Assay die Wundheilung bei Beschichtung bzw. Zugabe positiv beeinflussen. Durch weitere Anpassungen in der oben dargestellten Versuchsdurchführung konnte diese Problematik leider nicht behoben werden. Da Keratinocyten, wie Fibroblasten, zu einer verstärkten Adhärenz neigen, könnte in zukünftigen Versuchen zusätzlich die sogenannte *Electric-Fence*-Methode untersucht werden. Dabei wird eine Spannung nicht erst zur Verwundung angelegt, sondern mit Beginn des Experiments wird in definierten Zeitabständen eine hohe Spannung an der Elektrode angelegt, sodass diese erst gar nicht von Zellen besiedelt wird. Mit Start der Beobachtung des Heilungsvorgangs wird diese Spannung nicht mehr angelegt

und die Neubesiedlung der Elektrode mit Zellen über den Anstieg des Impedanzsignals bestimmt [57].

3.3.4.3. Scratch Assay mit NiH-3T3 Fibroblasten

Das *Scratch Assay* stellt die einfachste Form der Wundheilungsassays dar. Im vorliegenden Experiment wurde eine Pipettenspitze mittlerer Größe (max. Volumen: 200 μL) zur Verletzung der konfluenten Zellschicht verwendet. Zunächst wurden für das Wundheilungsassay die Oberflächen einer 24-Well-Platte mit Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen an ALOXe3, AmbLOXe und GST-GFP *IBs* beschichtet. Nach Sedimentation der *IBs* (ca. 2 Stunden bei 4 °C) wurde die überstehende Lösung abgenommen. Anschließend wurden NiH-3T3 Fibroblasten mit einer Zelldichte von $5,3 \cdot 10^3$ Zellen/ cm^2 ausgesät. Nach ca. 48 Stunden hatten die Zellen vollständige Konfluenz erreicht und das genutzte Medium wurde gegen ein Hungermedium mit 1 % FBS ausgetauscht und für weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde in allen Wells mittig über den kompletten Durchmesser des Wells die Zellschicht mit einer Pipettenspitze verletzt. Durch einen Mediumswechsel wurden Zelltrümmer entfernt und das Zellwachstum wurde anschließend über mehrere Stunden beobachtet. Nach zwölf Stunden wurde die Kultivierung gestoppt, die Zellen fixiert und zur weiteren Dokumentation angefärbt. Nach Fixierung und Färbung wurden mikroskopische Aufnahmen der einzelnen Wells gemacht und mit dem *MRI Wound Healing Tool Macro* für ImageJ die Größe der Wunde bestimmt. Auf Grundlage der Ausgangswundgröße wurde der Anteil der verheilten Wundfläche bestimmt.

Insgesamt wurden für das *Scratch Assay* mit NiH-3T3 Fibroblasten fünf unterschiedliche Konzentrationen zur *Inclusion Body* Beschichtung (0,005 – 0,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), sowie eine Kontrolle ohne *IBs* verwendet. Dabei wurden für jede Konzentrationsstufe drei Replikate untersucht (Abbildung 3.34).

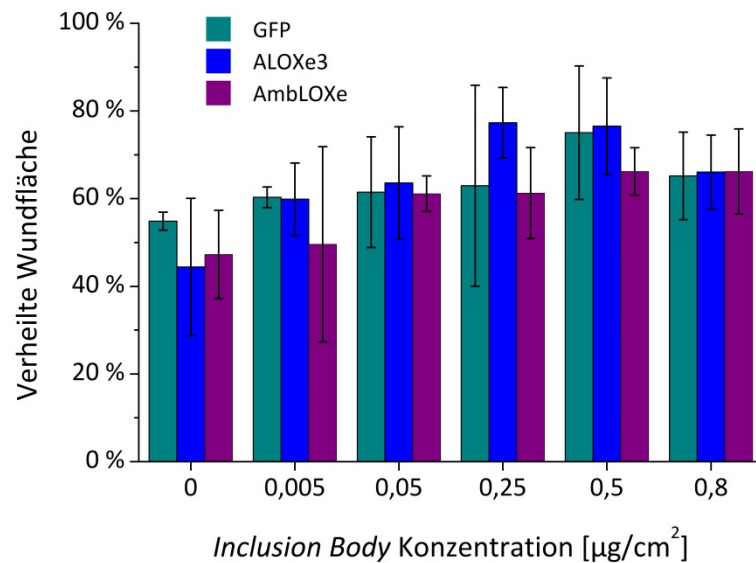


Abbildung 3.34: Scratch Assay mit Inclusion Bodies; prozentualer Anteil der verheilten Wundfläche zwölf Stunden nach Verwundung; Beschichtung der Zellkulturoberfläche mit Inclusion Bodies vor Zellaussaat (0 – 0,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

Zwölf Stunden nach Verwundung liegt der Anteil der verheilten Wundfläche zwischen 44 und 77 %. Allgemein scheint eine höhere *Inclusion Body* Konzentration, unabhängig davon, ob Lipoxigenase *IBs* oder GST-GFP *IBs* verwendet wurden, zu einer schnelleren Wundheilung zu führen (Abbildung 3.34). Dieser Trend könnte auf den Textureffekt, also den Einfluss der Topographie der Zellkulturoberfläche auf die Zellmigration, zurückzuführen sein. Dieser wurde von Park *et al.* für Krebszellen beschrieben, die abhängig von der Textur der Zellkulturmatrix in ihrer Migrationsrichtung beeinflusst werden [121]. Somit könnte die unter den Zellen befindliche Topographie, die sich durch die Beschichtung mit *Inclusion Bodies* ergibt auch einen Einfluss auf die Migrationsrichtung der Zellen nach Verwundung haben.

Bei *IB* Konzentrationen von 0,05, 0,25 und 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ könnte im Mittel für ALOXe3 der größte Anteil an verheilter Wundfläche erreicht werden. Bei einer *IB* Konzentration von 0,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ war der Anteil der verheilten Wundfläche bei allen drei genutzten *IB* Arten nahezu gleich. Insgesamt lässt sich keine klare Aussage darüber treffen, ob eine Art an *Inclusion Bodies* die Wundheilung besonders fördert. Die Werte der einzelnen Replikate schwanken sehr stark. Dies ist vor allem auf die ungleichen Ausgangsbedingungen zurückzuführen. Die Verwundung wird manuell mit einer Pipettenspitze durchgeführt. Aus diesem Grund können keine uniformen Ausgangsbedingungen geschaffen werden. Die

größte Limitierung des *Scratch Assays* liegt somit in der Reproduzierbarkeit der Verwundungen. Zusätzlich kann bei einer Verletzung der Zellschicht mit dieser Methode nicht ausgeschlossen werden, dass die Beschichtung der Zellkulturoberfläche ebenfalls zerstört wird. Weiterhin können durch die Kratzbewegung Zellen am Wundrand akkumulieren. Diese Faktoren könnten die Zellmigration nach der Verwundung beeinflussen und dadurch entsprechend die Ergebnisse verfälschen.

Zusätzlich neigen die NiH-3T3 Fibroblasten, wie bereits beim *ECIS Assay* beschrieben, zu einer starken Adhärenz untereinander und zu der Zellkulturoberfläche. Somit lösen sich oftmals nicht einzelne Zellen ab, sondern ganze Abschnitte des ausgebildeten Zellrasens. Dies trägt zusätzlich zu Unregelmäßigkeiten in den Ausgangswundgrößen bei. Gleichzeitig ist es nicht möglich von allen *Inclusion Body* Konzentrationen und Replikaten (insgesamt 54 Wells) die entsprechenden Ausgangsbedingungen zu dokumentieren. Würde eine solche Dokumentation stattfinden, würden sich die Zellen für einen längeren Zeitraum außerhalb des Inkubators befinden, was ihre Viabilität nachhaltig beeinflussen würde und somit auch die Ergebnisse verfälschen würde. Aus diesem Grund wurden jeweils nur exemplarisch die Ausgangswundgrößen einiger Wells erfasst und deren Mittelwert als Grundlage verwendet um zu beurteilen wie hoch der Anteil der verheilten Wundfläche ist. Insgesamt stellt somit das *Scratch Assay* nur eine unzureichende Form dar um den Einfluss von *Inclusion Bodies* auf die Wundheilung zu beurteilen.

Aufgrund dieser allgemeinen Limitierungen des *Scratch Assays* existieren bereits viele Weiterentwicklungen dieses Assays. Diese führen zumeist eine Form der Automatisierung im Verwundungsschritt ein, sodass die Ausgangswundgrößen reproduzierbarer sind und Ergebnisse besser miteinander verglichen werden können [53–55,122]. Da für solche Ansätze spezielle Gerätschaften verwendet werden müssen, ist der Hauptvorteil des *Scratch Assays*, die Durchführung mit einfachem Laborequipment, nicht mehr gegeben.

3.3.4.4. Culture-Insert Wundheilungsassay mit HaCaT Keratinocyten

Nachdem das *ECIS Assay* und das *Scratch Assay* es nicht ermöglichten uniforme Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden *Culture-Inserts* zur Durchführung eines Wundheilungsassays genutzt. Ein Wundheilungsassay mit Silikon *Culture-Inserts* stellt kein Wundheilungsassay im klassischen Sinne dar. Vielmehr bilden die Silikon *Inserts*, die sich in jedem Well befinden, eine Barriere, sodass ein definierter Bereich der Zellkulturoberfläche

nicht mit Zellen besiedelt wird. Hat sich auf der übrigen Zellkulturoberfläche eine konfluente Zellschicht gebildet, wird das *Insert* entfernt und es entsteht eine Wunde mit einer definierten Breite (500 μm). Trotzdem entstehen auch Wundränder, da die Zellen am Rand des *Inserts* an das *Insert* selbst adhäreren. Wird dieses entfernt, werden die Zellen am Rand zum *Insert* somit auch verletzt. Hierdurch entsteht ein „echter“ Wundrand. Im Rahmen des Wundheilungsassays mit *Culture-Inserts* wurde, wie beim *ECIS* Wundheilungsassay, sowohl die Beschichtung der Zellkulturoberfläche mit *Inclusion Bodies* vor der Zellaussaat, als auch die Zugabe von *Inclusion Bodies* nach Entfernung des *Culture-Inserts* getestet (jeweils 62,5 ng/cm^2). Der Konzentrationswert von 62,5 ng/cm^2 wurde auf Grundlage der Ergebnisse des *Scratch Assays* (3.3.4.3) gewählt. Dort konnte für Konzentrationswerte in diesem Bereich der größte Anteil an verheilter Wundfläche ermittelt werden.

Zur Durchführung des Wundheilungsassays mit *Culture-Inserts* wurden HaCaT Keratinocyten mit einer Konzentration von $2,4 \cdot 10^5$ Zellen/ cm^2 ausgesät. Nach 24 Stunden Zellwachstum wurde das Medium gegen ein Hungermedium mit 1 % FBS ausgetauscht und weitere 18 Stunden kultiviert. Anschließend wurde das *Culture-Insert* entfernt und nach zwölf Stunden das Assay durch Fixierung der Zellen gestoppt. Das Zellwachstum und die Wundheilung nach Entfernung des *Inserts* wurden mit einem LumaScope 600 Mikroskop für ein ausgewähltes Well dokumentiert (Abbildung 3.35). Durch unterschiedliche Vorversuche zeigten sich die oben genannte Aussaatdichte und Kultivierungsparameter als optimal um gleichbleibende Wundgrößen zu erhalten. Ist die Zellschicht bereits überkonfluent bei Entfernung der *Inserts*, ergeben sich Irregularitäten an den Wundrändern (Abbildung 3.36).

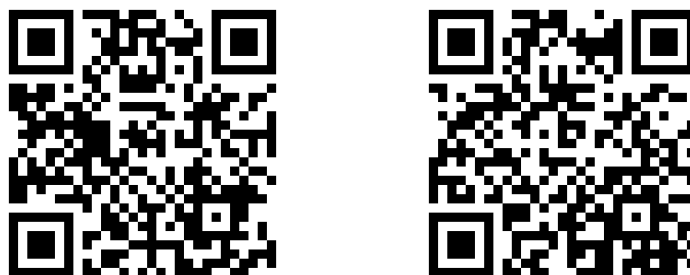


Abbildung 3.35: QR Code (YouTube) mit Videos zum Wachstum von HaCaT Zellen (links) und zum Heilungsprozess nach der Entfernung eines *Culture-Inserts* (rechts)

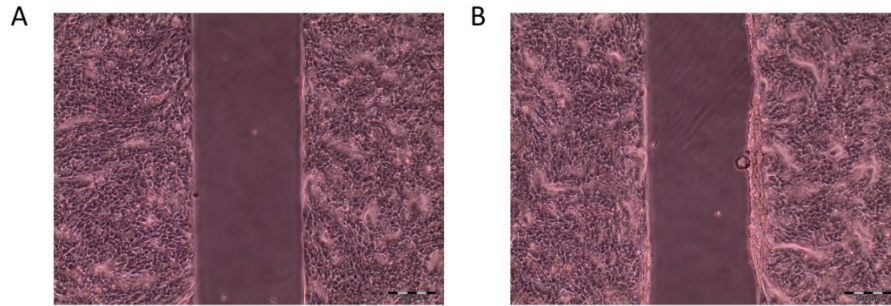


Abbildung 3.36: Vergleich der Wundränder nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten von HaCaT Keratinocyten in Medium mit 10 % FBS; Zellaussaatdichte $2,4 \cdot 10^5$ Zellen/cm²; A: Kultivierung für 24 h, B: Kultivierung für 36 h

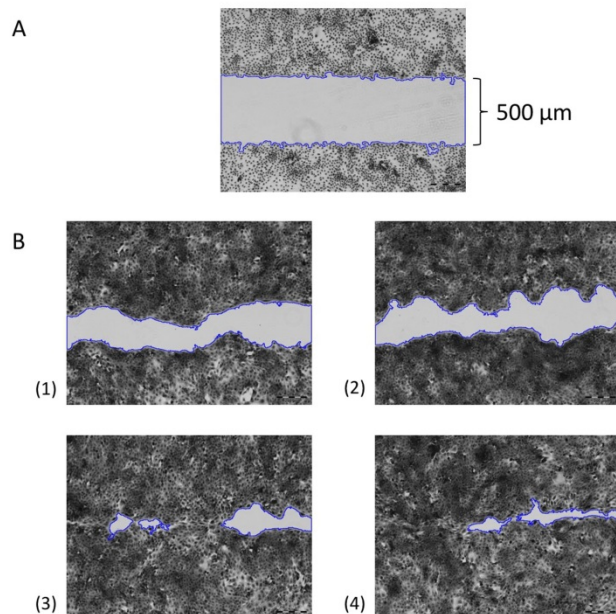


Abbildung 3.37: Bestimmung der Wundgröße mit dem *MRI Wound Healing Tool Macro* für *ImageJ*; Beschichtung mit *Inclusion Bodies* ($62,5 \text{ ng/cm}^2$); A: nach Entfernung des *Culture-Inserts* ($t=0 \text{ h}$); B: nach Fixierung und Anfärbung der Zellen ($t=12 \text{ h}$), (1) Kontrolle ohne *IBs*, (2) Beschichtung mit *GST-GFP IBs*, (3) Beschichtung mit *ALOXe3 IBs*, (4) Beschichtung mit *AmbLOXe IBs*

Das durchgeführte Wundheilungsassay mit *Culture-Inserts* ermöglichte zunächst die Schaffung von einheitlichen Ausgangsbedingungen bezüglich der Wundgröße. Exemplarisch wurde bei jedem Experiment die Wundfläche in 2-3 Wells einer 24-Well-Platte mikroskopisch dokumentiert (Abbildung 3.37; A). Zusätzlich wurden in allen 24 Wells die Wunden auf Irregularitäten überprüft. Dabei zeigte sich, dass bei Nutzung von *Culture-*

Inserts von uniformen Wundgrößen ausgegangen werden kann. Dies ist allerdings nur gewährleistet, wenn eine optimale Aussaatdichte und Wachstumsphase gegeben ist (Abbildung 3.36).

Sowohl für die Beschichtung mit *IBs* als auch für die Zugabe von *IBs* zu Kulturmedium wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Vergleicht man die Ergebnisse bei Beschichtung mit GFP, ALOXe3, AmbLOXe als auch bei Zugabe dieser *IBs* mit einer Kontrolle ohne *Inclusion Bodies*, zeigt sich, dass ALOXe3 und AmbLOXe *Inclusion Bodies* die Wundheilung beschleunigen (Abbildung 3.38). Dabei zeigte AmbLOXe in beiden Anwendungsmodi (Beschichtung und Zugabe) einen größeren Effekt auf die Wundheilung. Für den Teil des Experiments, in dem eine *IB*-Beschichtung gewählt wurde, waren nach zwölf Stunden bei Beschichtung mit ALOXe3 89,1 % der Wunde verschlossen und bei Beschichtung mit AmbLOXe 90,3 %. Die Kontrollen mit GFP *IBs* und ohne *IBs* zeigten einen Wundverschluss von 49,5 % und 53,4 %. Dadurch, dass der Anteil der verheilten Wundfläche bei Beschichtung mit GFP *IBs* ähnlich dem Wert ohne *IBs* war, konnte gezeigt werden, dass der bessere Wundverschluss bei ALOXe3 und AmbLOXe Beschichtung nicht auf einen Textureffekt zurückzuführen ist. Vergleichbare Ergebnisse, analog denen der Beschichtung, konnten ebenfalls mit einer Zugabe von *Inclusion Bodies* erreicht werden. Wurden ALOXe3 *IBs* dem Medium hinzugefügt, waren nach zwölf Stunden 73,3 % der Wunde verschlossen, bei Zugabe von AmbLOXe 91,5 % und bei Zugabe von GFP 70,3 %. Sowohl für die Beschichtung als auch für die Zugabe von *Inclusion Bodies* zeigte AmbLOXe somit den größten Effekt bei der Wundheilung.

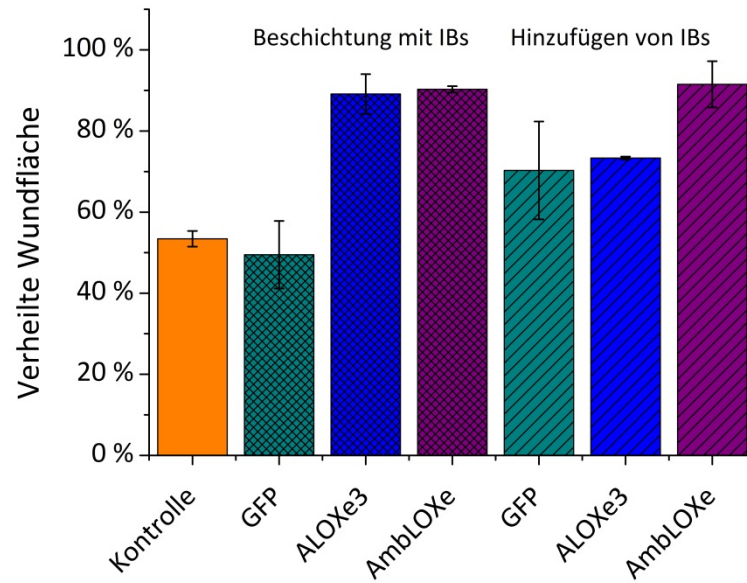


Abbildung 3.38: *Culture-Insert* Assay mit *Inclusion Bodies*; prozentualer Anteil der verheilten Wundfläche zwölf Stunden nach Verwundung/Entfernung des *Culture-Inserts*; Beschichtung der Zellkulturoberfläche mit *Inclusion Bodies* vor Zellaussaat und Zugabe von *Inclusion Bodies* nach Verwundung (jeweils $62,5 \text{ ng/cm}^2$); Kontrolle: ohne *Inclusion Bodies*

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Darstellung und Charakterisierung der epidermalen Lipoxygenase AmbLOXe aus dem Axolotl und ihres menschlichen Homologes ALOXe3. AmbLOXe, das während der Regeneration von Gliedmaßen im Axolotl produziert wird, ist für mögliche therapeutische Anwendungen in der menschlichen Wundheilung interessant. Herausforderungen ergaben sich vor allem in der heterologen Produktion beider Proteine in *Escherichia coli* und in der Beurteilung der (Bio)Aktivität der Lipoxygenasen.

Zur heterologen Produktion wurde *Escherichia coli* gewählt. Dieser Produktionsorganismus ist sehr detailliert charakterisiert und lässt sich leicht und kostengünstig kultivieren. Für AmbLOXe und ALOXe3 wurde angenommen, dass sie über keine posttranslationalen Modifizierungen, wie Glykosilierungen oder Disulfidbrücken verfügen. Diese Annahme wurde aufgrund der verfügbaren Daten zu anderen ähnlichen Lipoxygenasen getroffen. Die Produktion in *E. coli* zielte sowohl auf lösliche Proteine als Endprodukt als auch auf Proteine in Form von *Inclusion Bodies* ab.

Da in ersten Kultivierungsansätzen keine lösliche Produktion der Lipoxygenasen erreicht werden konnte, wurde der Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsparameter untersucht und beurteilt. Zu den untersuchten Parametern zählen die Expressionstemperatur, die Zusammensetzung des Mediums, der Induktionszeitpunkt und die Induktorkonzentration. Trotz Variation der oben genannten Parameter konnte keine lösliche Produktion der beiden Lipoxygenasen erreicht werden. Ergänzend zur Variation der Kultivierungsparameter wurde auch der Einfluss der Coexpression unterschiedlicher Chaperone untersucht. Diese Coexpression von Chaperonen führt nicht zu einer Verbesserung der Löslichkeit. Die eingesetzten Chaperone können zwar die Proteine bei der Faltung unterstützen, stellen zugleich aber auch einen erhöhten Stress für die Zelle dar, da diese Chaperone ebenfalls von der Zelle selbst produziert werden müssen. Eine lösliche Produktion der epidermalen Lipoxygenasen ALOXe3 und AmbLOXe konnte somit in *E. coli* nicht erreicht werden. Bei AmbLOXe (74 kDa) und ALOXe3 (84 kDa) handelt es sich um relativ große Proteine. Es konnte bereits für andere Proteine gezeigt werden, dass *E. coli* in der Lage ist, heterologe

Protein bis zu einer Größe von 100 kDa zu produzieren [86]. Jedoch zeigen sich ab einer Größe von 60 kDa häufig Probleme und eine lösliche Expression ist nur schwer zu realisieren [92]. Somit könnte die Größe der beiden Proteine ein entscheidendes Hindernis für die lösliche Produktion sein und dieses Hindernis konnte im vorliegenden Fall durch die Variation der Kultivierungsparameter und den Einsatz von Chaperonen nicht überwunden werden.

Die zum Versuch einer löslichen Produktion gemachten Erkenntnisse, wurden genutzt, um *Inclusion Bodies* der epidermalen Lipoxygenasen mit möglichst korrekt gefaltetem, funktionellem Protein zu produzieren. So wurde beispielsweise eine Expressionstemperatur von 25 °C gewählt, um ein langsames und somit korrektes Arbeiten der Proteinbiosynthesemaschinerie zu erreichen. Über ein Aufreinigungsprotokoll mit einer milden enzymatischen Zellyse und mehreren Waschschrinen, konnten reine *IBs* ohne bakterielle Kontaminationen gewonnen werden. Zusätzlich zeigte sich, dass diese für den Einsatz in der Zellkultur geeignet sind und dort nicht zu Kontaminationen führen. Verunreinigungen durch andere Proteine, die mit den *IBs* aufgereinigt wurden, waren unterhalb der Detektionsgrenze der densitometrischen Messung. Auf 1 L Kultivierungsmenge bezogen konnten für AmbLOXe 171 mg *IBs* und für ALOXe3 175 mg *IBs* isoliert werden. Über eine LC/MS Messung konnte ergänzend sichergestellt werden, dass es sich um die gewünschten Aminosäuresequenzen handelt.

Für AmbLOXe ist bisher noch nicht aufgeklärt, in welchen Stoffwechselweg es involviert ist und es ist somit auch noch nicht bekannt, welches Substrat durch AmbLOXe umgesetzt wird. Das menschlichen Homolog ALOXe3 wirkt hauptsächlich als Hydroperoxidisomerase, verfügt jedoch auch über eine latente Dioxygenaseaktivität. Damit unterscheidet sich die epidermale Lipoxygenase ALOXe3 in ihrer Aktivität von den meisten anderen Lipoxygenasen, die eine Dioxygenierung als hauptsächlich katalysierte Reaktion zeigen. Um eine Charakterisierung von AmbLOXe zu ermöglichen, musste eine Assaymethode etabliert werden, die es ermöglicht die Bioaktivität dieser Lipoxygenase zu beurteilen. Da im Rahmen dieser Arbeit vor allem ein potentieller Einsatz von AmbLOXe bei Therapien in der Wundheilung untersucht werden soll, eignen sich *in vitro* Wundheilungsassays mit Fibroblasten und/oder Keratinocyten hervorragend um die Bioaktivität direkt zu untersuchen. Die dabei genutzten Wundheilungsassays (*Scratch Assay*, *ECIS* und *Culture-*

Inserts) mussten in ihrer Durchführung angepasst werden, um die Applikation der IBs einzubinden.

Während der Versuche zeigte sich, dass sich das *Scratch Assay* nicht eignet, da durch die manuelle Durchführung des Verletzungsvorgangs zu große Variationen der Ausgangswundgrößen vorhanden waren. Durch unterschiedliche Ausgangswundgrößen waren die ermittelten Wundgrößen nach Beendigung des Assays nicht miteinander vergleichbar. Im Rahmen des *ECIS Assays* stellte ebenfalls der Verwundungsschritt einen limitierenden Faktor dar. Die genutzten Keratinocyten Zellen neigen zu starker Adhärenz, sowohl zueinander, als auch gegenüber der Zellkulturoberfläche. Dadurch konnten durch Anlegen eines Stromimpulses die Zellen zwar verletzt werden, jedoch lösten sich diese nicht komplett von der Elektrode. Aus diesem Grund war es in diesem Assay ebenfalls nicht möglich vergleichbare Ausgangsbedingungen zu schaffen.

Konstante Ausgangswundgrößen konnten hingegen durch Verwendung von *Culture-Inserts* erreicht werden. Faktoren, die für die Schaffung einer konstanten Ausgangswundgröße entscheidend waren, sind bei diesem Assay die Zellaussaatdichte und die Wachstumszeit bis zur Entfernung der *Inserts*. Die optimalen Parameter hierfür ($2,4 \cdot 10^5$ Zellen/cm², 42 h) konnten in Versuchen ermittelt werden. Die Verwendung von *Culture-Inserts* ist kein klassisches Wundheilungsassays, da die konfluente Zellschicht nicht direkt verletzt wird, sondern durch eine Barriere (*Culture-Insert*) ein definierter Bereich zellfrei gehalten wird. Durch die Etablierung konstanter Ausgangsbedingungen konnte der Effekt von AmbLOXe IBs und ALOXe3 IBs auf die Migration der Zellen eindeutig bestimmt werden. Die *Inclusion Bodies* wurden dabei zur Beschichtung der Zellkulturoberfläche vor Aussaat der Zellen eingesetzt oder dem Zellkulturmedium nach Verwundung hinzugefügt. Bei Beschichtung mit IBs anderer Proteine konnte bereits gezeigt werden, dass diese die Adhäsion und Proliferation von Zellen beeinflussen können [123]. Dabei konnte u.a. für Zytokine eine doppelte Rolle, als bioaktiver Stoff und topographisches Stimulans, nachgewiesen werden [83]. Durch zwei Applikationsformen der IBs (Beschichtung und Zugabe) konnte untersucht werden, ob der Einfluss der Lipoxygenase IBs auf die Wundheilung auf einem topographischen Effekt beruht, der die Zellen stimuliert, oder ob die IBs eine bioaktive Wirkung bei der Wundheilung haben.

Zwölf Stunden nach Entfernung des *Inserts* waren bei Beschichtung der Zellkulturoberfläche mit AmbLOXe *IBs* 90,3 % der Wundfläche und bei Beschichtung mit ALOXe3 *IBs* 89,1 % der Wundfläche verschlossen. Kontrollen ohne *IBs* und mit GFP *IBs* erreichten Werte um die 50 %. Dies lässt darauf schließen, dass kein topographischer Effekt vorliegt. Die Ergebnisse zur Zugabe von *IBs* bestätigten diese Theorie zusätzlich. Hier waren nach zwölf Stunden 91,5 % der Wundfläche bei AmbLOXe und 73,3 % bei ALOXe3 verschlossen. Somit kann ein topographischer Effekt ausgeschlossen werden und der ermittelte positive Einfluss der Lipoxygenasen auf die Wundheilung kann mit deren Bioaktivität assoziiert werden. *IBs* haben eine amyloidähnliche Struktur, die es erleichtert diese als Biokatalysator und *Nanopills* einzusetzen. Zusätzlich können *IBs* von Säugertierzellen aufgenommen werden [84]. Es ist allerdings noch nicht aufgeklärt, ob im vorliegenden Fall die *IBs* als Ganzes aufgenommen werden, oder Proteine ans Medium abgegeben werden und dadurch wirken können.

Zusammenfassend können AmbLOXe *IBs* als bioaktive *Nanopills* betrachtet werden, die einen Einfluss auf die Wundmigration von Keratinocyten haben und somit ein Potential für die Anwendung in der Wundheilungstherapie besitzen. Die genauen Mechanismen, die dieser Wirkung zu Grunde liegen, müssen noch aufgeklärt werden. Zukünftig muss daher vor allem der Mediator, der durch AmbLOXe umgesetzt wird, identifiziert werden.

4.1. Ausblick

Zu Beginn des Jahres 2018 konnte erstmalig das gesamte 32 Gigabasenpaar große Genom des Axolotls entschlüsselt werden [124]. Das Genom des Axolotls ist damit etwa zehnmal so groß wie das menschliche Genom. Diese Entschlüsselung ermöglicht es, bisher gemachte Erkenntnisse über die außerordentliche Regenerationsfähigkeit des Axolotls besser in den Gesamtkontext der Stoffwechselwege dieses Schwanzlurches zu integrieren. Dadurch sollte es möglich sein den einzelnen Molekülen leichter ihre jeweiligen Schlüsselrollen zuzuordnen. Weiterhin ermöglichen moderne Technologien, wie die CRISPR/Cas-Methode zukünftig die Genexpression in Axolotl Modelltieren zu modifizieren und somit, zusätzlich zu mRNA Expressionsanalysen während der Regeneration, weitere Faktoren der Regeneration beim Axolotl zu ermitteln. All diese Wege sollten es in Zukunft leichter machen, die molekularen Ereignisse im Axolotl zu verstehen.

Auf Grundlage der hier dargestellten Ergebnisse, konnte gezeigt werden, dass AmbLOXe *IBs* die Wundheilung fördern. Weiterführende Untersuchungen könnten an unterschiedlichen Stellen anknüpfen. Es ist noch nicht geklärt, ob der positive Wundheilungseffekt der Lipoxygenase *IBs* darauf zurückzuführen ist, dass diese von den Zellen aufgenommen werden, oder das Enzym in das Zellkulturmedium abgegeben wird. Zusätzlich könnte durch Einsatz von Lipoxygenaseinhibitoren geprüft werden, ob die beobachtete Bioaktivität auf eine Lipoxygenaseaktivität der *Inclusion Bodies* zurückzuführen ist. Nachdem die Bioaktivität der *IBs* in *in vitro* Wundheilungsassays gezeigt werden konnte, könnte die Testung der Lipoxygenase *IBs* auf *ex vivo* Gewebeproben ausgeweitet werden. Solche Assays bieten eine kosteneffektive und ethische Alternative zu Tiermodellen. Zusätzlich könnten Studien von löslichem AmbLOXe Enzym dazu beitragen, das genaue Substrat des Enzyms zu detektieren und die biochemischen Stoffwechselwege, die in die Regeneration des Axolotls involviert sind, besser zu verstehen. Eine lösliche Produktion der Lipoxygenasen könnte dabei beispielsweise durch eine heterologe Expression in Säugerzellen realisiert werden.

A. ANHANG

A.1. Material

Die im Folgenden (A.1 Material und A.2 Methoden) verwendeten Bezeichnung Wasser bzw. H₂O, zur Herstellung von wässrigen Lösungen meint immer doppelt-deionisiertes Wasser, welches aus einem arium® 611 Reinstwassersystem stammt. Die angegebenen pH-Werte wurden jeweils bei Raumtemperatur angepasst.

A.1.1. Verbrauchsmaterialien

Tabelle A.1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller, Ort
1 Liter Flaschen IBs	Nalgene™ Quadratische Flaschen (PP)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
24-Well-Platte	TC Plate 24 Well, Standard	Sarstedt, Nürnberg
Bechergläser	Duran® Becher niedrige und hohe Form mit Ausguss; verschiedene Volumina	Duran Group, Wertheim/Main
Blotpapier	Western Blotting Filterpapier, extra dick	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dialyseschlauch	ZelluTrans/Roth Dialysiermembran T1	Carl Roth, Karlsruhe
ECIS Array	8W2LE PET; 8 Well Array mit einer einzelnen linearen Elektrode 667 µm x 150 µm; ideal für Wundheilungsassays und Migrationsstudien	Applied Biophysics Inc., Troy, USA
Fertigele	10 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Proteingele, 15 Wells, 15 µL #4568036	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Filter / Filterpumpaufsatz	Sartolab® Vakuumfilter	Sartorius, Göttingen
Glaspipetten	Pasteurpipetten (kurz und lang)	Brand, Wertheim
Glasplatte und Spacer	Mini-PROTEAN® Short Plates; Mini-PROTEAN® Spacer Plates with 0,75 mm Integrated Spacers	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Halb-Mikro Küvetten	Höhe: 45 mm, Schichtdicke: 10 mm, Polystyrol, nestsortiert	Sarstedt, Nürnberg

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Ibidi Culture Inserts 2 Well Singles	Culture-Insert 2 Well in μ -Dish 35 mm, high; ibiTreat, ready to use, tissue culture treated, sterilisiert	Ibidi GmbH, Martinsried
Ibidi Culture Inserts 2 Well 24-Well-Platte	Culture-Insert 2 Well in μ -Plate 24 Well; ibiTreat, ready to use, tissue culture treated, sterilisiert	Ibidi GmbH, Martinsried
Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) Säulen	HisPur™ Ni-NTA Spin Columns; 0,2 mL resin bed	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kämme (10 und 15 Taschen)	Mini-PROTEAN® Comb 10 Wells, 0,75 mm, 33 μ L; Mini-PROTEAN® Comb 15 Wells, 0,75 mm, 20 μ L	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Kryoröhre (2 mL)	CryoPure mit QuickSeal Schraubverschluss	Sarstedt, Nürnbrecht
Laborflasche	Duran® Laborglasflasche mit DIN Gewinde	Duran Group, Wertheim/Main
Messzylinder	Duran® Messzylinder mit Sechskantfuß; verschiedene Volumina	Duran Group, Wertheim/Main
PCR-Gefäß	PCR Einzelgefäß 0,2 mL	Brand, Wertheim
Pipetten (2, 5, 10, 25 und 50 mL)	Corning® Costar® Stripette®	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pipettenspitzen	10, 200 und 1000 μ L max. Volumen	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen für Multipette®	Combitip advanced® (5 mL und 10 mL); steril (Eppendorf Biopur®), einzeln verpackt	Eppendorf, Hamburg
Plastikpetrischalen	Petrischalen Greiner Bio-One	VWR, Darmstadt
PVDF Membran	Immun-Blot® PVDF Membran	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Reagenz- und Zentrifugenröhre	15 und 50 mL konisch, Schraubverschluss, pyrogen-frei	Corning, Corning, USA
Reaktionsgefäße	1,5 und 2 mL SafeSeal Reagiergefäß mit anhängendem Deckel und breitem Rand	Sarstedt, Nürnbrecht
96-Well-Platte (PCR)	0,2 mL Wells, Platte ohne Rahmen	Brand, Wertheim
Schüttelkolben/Schikanenkolben	100, 500 und 2000 mL	Duran Group, Wertheim/Main
T175 Flasche	TC Flask T175, Stand., Vent. Cap	Sarstedt, Nürnbrecht
T75 Flasche	TC Flask T75, Stand., Vent. Cap	Sarstedt, Nürnbrecht
Zellfilter	Falcon™ Cell Strainer 40 μ m	Corning, Corning, USA

A.1.2. Laborgeräte

Tabelle A.2: Auflistung der verwendeten Laborgeräte

Geräteart	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Autoklav	Systec V 150	Systec, Linden
Brutschrank	Brutschrank IN	Memmert, Schwabach
Brutschrank	Heracell™ 240	Heraeus, Hanau
ECIS Gerät	ECIS 1600R	Applied Biophysics, Troy, USA
Eismaschine	Scotsman AF103	Hubbard Systems, Ipswich, Großbritannien
Elektronischer Dispenser	Multipette® E3	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresesystem	Mupid®-One Submarine	Mupid, Tokyo, Japan
French Press	M-110 L Microfluidizer® Processor	Microfluidics, Newton, USA
Gefrierbehälter	Mr. Frosty™	Thermo Scientific, Waltham, USA
Gel/WB-Scanner	Epson Perfection V750 Pro	Epson, Meerbusch
Geldokumentation	Intas UV System	Intas, Göttingen
Inkubationsschüttler (1)	KS 4000 I control	IKA, Staufen
Inkubationsschüttler (2)	Certomat® BS-1	Sartorius, Göttingen
Inkubationsschüttler (3)	New Brunswick™ Innova® 44	Eppendorf, Hamburg
Kryotank	Orion ET-44	Chart Industries, Luxemburg
Laborgefrierschrank (-80 °C)	Forma™ 900 series	Thermo Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer	IKA® RH basic 2	IKA®-Werke, Staufen
Mikroliterpipetten	Transferpette® S	Brand, Wertheim
Mikroskop (1)	Olympus IX50 Inversmikroskop	Olympus, Hamburg
Mikroskop (2)	Olympus CKX41 Inversmikroskop	Olympus, Hamburg
Mikroskop (3)	LumaScope 600	Etaluma, Carlsbad, USA
NanoDrop	NanoDrop 1000 Mikrovolumen-Spektralphotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Netzteil (1)	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Netzteil (2)	PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Neubauer Zählkammer	Neubauer Zählkammer; 0,1 mm Tiefe	Brand, Wertheim
pH-Meter (1)	Metrohm 605	Metrohm, Filderstadt
pH-Meter (2)	HI 221	Hanna Instruments, Québec, Kanada
Photometer (1)	Multiskan® Spectrum	Thermo Scientific, Waltham, USA
Photometer (2)	Multiskan® GO	Thermo Scientific, Waltham, USA
Plattformschüttler	Infros HT Tischrundschtüttler	Infros, Bottmingen, Schweiz

Geräteart	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Real-time PCR System	iQ-5	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Reinstwassersystem	arium® 611	Sartorius, Göttingen
SDS-Gel-Gießstation & Gelelektrophoreseapparatur	Mini-Protein® Tetra Handcast System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Sterilwerkbank	HERAsafe KS 18	Thermo Scientific, Waltham, USA
Temperaturschüttler	ThermoMixer® comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermostatischer Zirkulator	MultiTemp III	Amersham Biosciences, Amersham, Großbritannien
Überkopf-Schüttler	Labnet Revolver™	Labnet, Edison, USA
Ultraschall-Homogenisator	LABSONIC® M	Sartorius, Göttingen
Ultraschall-Wasserbad	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin electronic, Berlin
Waage (1)	U 3600	Sartorius, Göttingen
Waage (2)	AC 210 S	Sartorius, Göttingen
Waage (3)	AC 211 S	Sartorius, Göttingen
Waage (4)	Denver Summit Standard Analysewaage	Denver Instrument, Bohemia, USA
Wasserbad	TW12	Julabo, Seelbach
Wasserbad	WNB 29	Memmert, Schwabach
Western Blot Apparatur	Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Zentrifuge (1)	Heraeus™ Multifuge™ X3 FR	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge (2)	Heraeus™ Multifuge™ X1 R	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge (3)	Heraeus™ Frsco™ 21	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge (4)	Mikro Star 17	VWR, Darmstadt
Zentrifuge (5)	Zentrifuge 5702	Eppendorf, Hamburg

A.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle A.3: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller, Ort
2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure (MES)	4432-31-9	Carl Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	60-24-2	Carl Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	1132-61-2	Carl Roth, Karlsruhe
Agar	9002-18-0	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	9012-36-6	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	7727-54-0	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	7783-20-2	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	9048-46-8	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller, Ort
Bromphenolblau	115-39-9	Merck Millipore, Billerica, USA
Chloramphenicol	56-75-7	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue G250	6104-58-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	7758-11-4	AppliChem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	67-68-5	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	7558-79-4	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	3483-12-3	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNase I	9003-98-9	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	64-19-7	AppliChem, Darmstadt
Ethanol 100 %	64-17-5	Merck Millipore, Billerica, USA
Ethanol 70 %	64-17-5	Merck Millipore, Billerica, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	60-00-4	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA Na-Salz)	6381-92-6	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehyd	50-00-0	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	56-81-5	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	56-40-6	Carl Roth, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	50-01-1	AppliChem, Darmstadt
Hefeextrakt	8013-01-2	Carl Roth, Karlsruhe
Imidazol	288-32-4	AppliChem, Darmstadt
Isopropanol	67-63-0	Merck Millipore, Billerica, USA
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	367-93-1	VWR, Darmstadt
Kaliumchlorid	7447-40-7	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	7778-77-0	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhexacyanoferrat (III)	13746-66-2	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	25389-94-0	Carl Roth, Karlsruhe
Kristallviolett	548-62-9	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Arabinose	5328-37-0	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutathion oxidiert	27025-41-8	AppliChem, Darmstadt
L-Glutathion reduziert	70-18-8	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lysozym	9001-63-2	Carl Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	999999-99-4	BD, Franklin Lanes, USA
Magnesiumchlorid	7786-30-3	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	7487-88-9	AppliChem, Darmstadt
Methanol	67-56-1	Merck Millipore, Billerica, USA

Chemikalie	CAS-Nummer	Hersteller, Ort
N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure (CHES)	103-47-9	AppliChem, Darmstadt
N-Lauroylsarcosin	97-78-9	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumcarbonat	497-19-8	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	7647-14-5	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	144-55-8	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydroxid	1310-73-2	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	151-21-3	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	7772-98-7	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Octoxinol 9 (Triton® X-100)	9002-93-1	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Octylphenoxy poly(ethylenoxy) ethanol (Nonidet™ P-40)	9002-93-1	Carl Roth, Karlsruhe
ortho-Phosphorsäure 85 %	7664-38-2	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	30525-89-8	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	329-98-6	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polysorbat 20 (Tween 20)	9005-64-5	Carl Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	9003-39-8	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rotiphorese® 30	79-06-1	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® 40	79-06-1	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	7647-01-0	Carl Roth, Karlsruhe
Silbernitrat	7761-88-8	AppliChem, Darmstadt
Sucrose	57-50-1	Carl Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	60-54-8	Carl Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	110-18-9	AppliChem, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris Base)	77-86-1	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris HCl)	1185-53-1	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau	72-57-1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypton	91079-40-2	Carl Roth, Karlsruhe
Urea	57-13-6	Carl Roth, Karlsruhe

Tabelle A.4: Auflistung der verwendeten Antibiotika

Antibiotikastammlösung	Konzentration/Hersteller
Chloramphenicol	20 mg/mL in 100 % Ethanol, sterilfiltrieren
Kanamycin	30 mg/mL in H ₂ O, sterilfiltrieren
Penicillin/Streptomycin	10 mg/mL (Biochrom, Berlin)
Tetracyclin	0,5 mg/mL in 70 % Ethanol, sterilfiltrieren

Tabelle A.5: Auflistung der verwendeten Reagenzien

Sonstige Reagenzien	Konzentration/Hersteller
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat (T0565)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	25 %ige Lösung in H ₂ O
Benzonase® Nuklease	250 U/μL (Merck Millipore, Billerica, USA)
Bovines Serumalbumin (BSA) Standard (23209)	2 mg/mL in H ₂ O (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
BugBuster® 10x Proteinextraktionsreagenz	Merck Millipore, Billerica, USA
cOmplete™ EDTA-freie Proteaseinhibitor Cocktail Tabletten	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cystein	10 mM in H ₂ O, sterilfiltrieren
DNase I	100 mg/mL in H ₂ O
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – high glucose (D7777)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Endotoxin freies Wasser (HyClone™ Water, Cell Culture Grade)	GE Healthcare Life Sciences, Logan, USA
FastDigest Green Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom, Berlin
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	200 mM in H ₂ O, sterilfiltrieren
L-Arabinose	0,5 g/mL in H ₂ O, sterilfiltrieren
Lysozym	100 mg/mL in H ₂ O
PageRuler™ Prestained Protein Ladder #26616	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler™ Unstained Protein Ladder #26614	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PBS Tabletten (Gibco®)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pierce™ Unstained Protein MW Marker #26610	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
rLysozym™ (71110-3), 30 KU/μL (Stocklösung)	2 KU/μL (Arbeitslösung) (Merck Millipore, Billerica, USA)
Roti®-GelStain	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS (1 %)	1 %ige und 10 %ige Lösung in H ₂ O
Sypro® Orange	5000x konzentriert in DMSO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tris HCl , pH 6,8	1,5 M in H ₂ O
Tris HCl , pH 8,8	1,5 M in H ₂ O

A.1.4. Puffer. Lösungen und Medien

Tabelle A.6: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Agarose-Gelelektrophorese: 50 x TAE-Puffer	Tris Base 242 g/L Essigsäure 57,1 mL/L EDTA 14,6 g/L → ad 1000 mL H ₂ O (pH 8)

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	
Gefrierkulturen: Glycerin 43 %	Glycerin (86 %) H ₂ O	50 mL 50 mL
	→ autoklavieren	
Inclusion Body Aufreinigung: Lysispuffer (pH 8)	Tris HCl Tris Base Natriumchlorid EDTA Triton X-100	6,61 g/L 0,97 g/L 5,844 g/L 0,292 g/L 5 mL/L
	→ ad 1000 mL H ₂ O, autoklavieren	
<i>Inclusion Body</i> Aufreinigung: Magnesiumsulfatlösung (1 M)	Magnesiumsulfat	120 g/L
	→ ad 1000 mL H ₂ O, autoklavieren	
Ni-NTA Aufreinigung: Äquilibrierungspuffer	Tris HCl Natriumchlorid DTT Imidazol	6,06 g/L 5,84 g/L 154,25 mg/L 0,680 g/L
	→ ad 1000 mL H ₂ O (pH 7,5)	
Ni-NTA Aufreinigung: Elutionpuffer	Tris HCl Natriumchlorid DTT Imidazol	6,06 g/L 5,84 g/L 154,25 mg/L 17,02 g/L
	→ ad 1000 mL H ₂ O (pH 7,5)	
Ni-NTA Aufreinigung: MES-Puffer	MES Natriumchlorid	3,904 g/L 5,844 g/L
Ni-NTA Aufreinigung: Waschpuffer	Tris HCl Natriumchlorid DTT Imidazol	6,06 g/L 5,84 g/L 154,25 mg/L 1,362 g/L
	→ ad 1000 mL H ₂ O (pH 7,5)	
Rückfaltung Dialyse: Solubilisierungs- und	Tris Base, pH 12 Urea DTT (Glutathion oxidiert) (Glutathion reduziert)	55 mM 2 M 1 mM 1 mM 2 mM
Dialysespuffer	Tris Base, pH 10 Urea DTT	55 mM 1 M 1 mM
	Tris Base, pH 8 Urea	55 mM 1 M
	Tris Base, pH 8	55 mM

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	
Rückfaltung Verdünnungsmethode: Solubilisierungs-,	Tris Base, pH 12 Urea	50 mM 2 M
Rückfaltungs- und	Tris Base, pH 8,5 Urea Sucrose (DTT (Glutathion oxidiert) (Glutathion reduziert)	50 mM 2 M 5 % 25 mM) 1 mM) 2 mM)
Dialysepuffer	Tris HCl, pH 7,4	100 mM
SDS-PAGE: 10 x TGS Puffer	Tris Base Glycin SDS → ad 1000 mL H ₂ O (pH 8,3 in 1 X TGS)	30,3 g/L 144,1 g/L 10 g/L
SDS-PAGE: Coomassie Färbelösung	H ₂ O Phosphorsäure 85 % Ammoniumsulfat Coomassie G-250 Methanol	367 mL 48 mL 40,8 g 490 mg 82 mL
SDS-PAGE: Probenpuffer	Tris HCl EDTA (Na-Salz) SDS Bromphenolblau → ad 80 mL H ₂ O + 10 mL Glycerin + 10 mL 2-Mercaptoethanol	0,315 g 74,4 mg 5 g 20 mg
Silberfärbung: Essigsäurelösung	Essigsäure → ad 1000 mL H ₂ O	50 mL/L
Silberfärbung: Farmers Reducer	Kaliumhexacyanoferrat Natriumthiosulfat → ad 100 mL H ₂ O	1 Spatelspitze 1 Spatelspitze
Silberfärbung: Fixierer/Entfärber	Ethanol Essigsäure → ad 1000 mL H ₂ O	450 mL/L 100 mL/L
Silberfärbung: Formaldehydlösung	Formaldehyd → ad 1000 mL Natriumcarbonatlösung	3 mL/L
Silberfärbung: Natriumcarbonatlösung	Natriumcarbonat → ad 1000 mL H ₂ O	25 g/L
Silberfärbung: Silbernitratlösung	Silbernitratlösung → ad 100 mL H ₂ O	1 Spatelspitze
Western Blot: 10 x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Natriumchlorid Kaliumchlorid Dinatriumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat → ad 1000 mL H ₂ O	80 g/L 2 g/L 14,4 g/L 2,4 g/L
Western Blot: Blocklösung	Magermilchpulver Polyvinylpyrrolidon Tween 20 10 x PBS Puffer → ad 150 mL H ₂ O	7,5 g 3 g 1,5 mL 15 mL

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Western Blot: Transferpuffer (Towbin Transfer Puffer)	Tris Base 0,45 g Glycin 2,25 g Methanol 30 mL SDS (10 %) 1,5 mL → ad 150 mL H ₂ O
Western Blot: Wachlösung	10 x PBS 100 mL H ₂ O 890 mL Tween 20 10 mL
Zellyse: Lysispuffer 1 (Standard)	Tris HCl 6,06 g/L Natriumchlorid 5,84 g/L DTT 154,25 mg/L → ad 1000 mL H ₂ O (pH 7,5)
Zellyse: Lysispuffer 2	Tris HCl 6,06 g/L Natriumchlorid 5,844 g/L Glycerin 50 mL/L → ad 1000 mL H ₂ O (pH 7,5)
Zellyse: Lysispuffer 3	MOPS 10,47 g/L Magnesiumchlorid 0,952 g/L DTT 154,25 mg/L Glycerin 10 mL/L → ad 1000 mL H ₂ O (pH 7,5)
Zellyse: Lysispuffer 4	Tris HCl 6,06 g/L Natriumchlorid 29,22 g/L Magnesiumchlorid 0,476 g/L → ad 1000 mL H ₂ O (pH 8)
Zellyse: Lysispuffer 5	Tris HCl 2,42 g/L Natriumchlorid 2,92 g/L Triton X-100 2 mL/L → ad 1000 mL H ₂ O (pH 7,5)
Zellyse: Lysispuffer 6	BugBuster

Tabelle A.7: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Medien

Medien	Zusammensetzung
10 x TB-Salze	Kaliumdihydrogenphosphat 23,1 g/L Dikaliumhydrogenphosphat 125,4 g/L → ad 1000 mL H ₂ O, autoklavieren
DMEM-Medium	DMEM (4,5 g/L Glukose, 2 mM L-Glutamin) 13,47 g/L Natriumhydrogencarbonat 3,7 g/L → ad 1000 mL H ₂ O (pH 7,2), sterilfiltrieren
LB-Agar-Platten	Trypton 10 g/L Hefeextrakt 5 g/L Natriumchlorid 10 g/L Agar 15 g/L → ad 1000 mL H ₂ O (pH 7), autoklavieren

Medien	Zusammensetzung
LB-Medium	Trypton 10 g/L Hefeextrakt 5 g/L Natriumchlorid 10 g/L → ad 1000 mL H ₂ O (pH 7), autoklavieren
TB-Medium	Trypton 12 g/L Hefeextrakt 24 g/L Glycerin 5 g/L → ad 900 mL H ₂ O, autoklavieren + 100 mL 10 x TB-Salze

A.1.5. Zellen, Plasmide und Primer

Tabelle A.8: Auflistung der verwendeten Zellen

Zellen	Hersteller, Ort
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	New England Biolabs, Ipswich, USA
<i>E. coli</i> TOP10	IBA, Göttingen, Deutschland
HaCaT (300493)	Cell Lines Service (CLS), Eppelheim
NIH-3T3 (ACC 59)	DSMZ, Braunschweig

Tabelle A.9: Auflistung der verwendeten und hergestellten Plasmide

Plasmide	Resistenz	Größe	Hersteller, Ort
pMK-RQ_His-TEV-ALOXE3	Kanamycin	4501 bp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pMK-RQ_His-TEV-AmbLOXe	Kanamycin	4237 bp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pET28b(+)	Kanamycin	5369 bp	Merck Millipore, Billerica, USA
pET28b_His-TEV-ALOXE3	Kanamycin	7441 bp	Anne Stamm, Institut für Technische Chemie
pET28b_His-TEV-AmbLOXe	Kanamycin	7177 bp	Anne Stamm, Institut für Technische Chemie
pETM30_His-GST-GFP	Kanamycin	7,8 kbp	Zhaopeng Li, Institut für Technische Chemie
pG-KJE8	Chloramphenicol	11,1 kbp	Takara Bio, Kusatsu, Japan
pGro7	Chloramphenicol	5,4 kbp	Takara Bio, Kusatsu, Japan

Plasmide	Resistenz	Größe	Hersteller, Ort
pKJE7	Chloramphenicol	7,2 kbp	Takara Bio, Kusatsu, Japan
pG-Tf2	Chloramphenicol	8,3 kbp	Takara Bio, Kusatsu, Japan
pTf16	Chloramphenicol	5 kbp	Takara Bio, Kusatsu, Japan

Tabelle A.10: Auflistung der hergestellten Stämme (Glycerin-Gefrierkulturen)

Stämme
<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pET28b_His-TEV-ALOXe3
<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pET28b_His-TEV-ALOXe3 + pG-KJE8
<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pET28b_His-TEV-ALOXe3 + pG-Tf2
<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pET28b_His-TEV-ALOXe3 + pGro7
<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pET28b_His-TEV-ALOXe3 + pKJE7
<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pET28b_His-TEV-ALOXe3 + pTf16
<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pET28b(+) + pG-KJE8
<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pET28b(+) + pGro7
<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pET28b(+) + pKJE7
<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pET28b_His-TEV-AmbLOXe
<i>E. coli</i> BL21(DE3) + pETM30_His-GST-GFP
<i>E. coli</i> TOP10 + pET28b
<i>E. coli</i> TOP10 + pET28b_His-TEV-ALOXe3
<i>E. coli</i> TOP10 + pET28b_His-TEV-AmbLOXe
<i>E. coli</i> TOP10 + pMK-RQ_His-TEV-ALOXe3
<i>E. coli</i> TOP10 + pMK-RQ_His-TEV-AmbLOXe

Tabelle A.11: Auflistung der verwendeten Primer

Primer	Sequenz
Mid_ALOXE3	5'-GGCATCTCTGGGCATGAAACTG-3'
Mid_AmbLOXe	5'-TGCAGAAGGGTAACATCTACATC-5'
T7 Promotor	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 Terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

A.1.6. Enzyme und Antikörper

Tabelle A.12: Auflistung der verwendeten Enzyme und Antikörper

Enzyme und Antikörper	Hersteller, Ort
6x-His-Tag Antikörper (Kaninchen; PA1-983B)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Enzyme und Antikörper	Hersteller, Ort
e-LOX-3 Antikörper (Kaninchen; PA5-21833)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Maus Anti-Kaninchen (IgG (HRP Konjugat; 31464))	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penta-His Antikörper (Maus; 34660)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ziege Anti-Maus (IgG (HRP Konjugat; 401215))	Merck Millipore, Billerica, USA
FastDigest NcoI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FastDigest XhoI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin-EDTA Lösung (10x) (T4174)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

A.1.7. Reaktionskits

Tabelle A.13: Auflistung der verwendeten Reaktionskits

Reaktionskits	Hersteller, Ort
Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

A.1.8. Software

Tabelle A.14: Auflistung der für die experimentellen Arbeiten verwendeten Software

Software	Bezeichnung (Hersteller)
Bioinformatik Software zur <i>in silico</i> Analyse von Klonierungen etc.	Clone Manager (Sci-Ed, Denver, USA)
DNA Geldokumentationssoftware	Intas GDS (Intas, Göttingen)
ECIS Software	Applied Biophysics Software V 1.2.186.0 (Applied Biophysics, Troy, USA)
Lumascope Software	Lumaview 600 (Etaluma, Carlsbad, USA)
Mikroskopie Software	cellSens Standard (Olympus, Hamburg)
Mikroskopie-Bildanalyse Software	ImageJ + MRI Wound Healing Tool
NanoDrop Software	ND-1000 Operating Software V 3.8.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Photometer (Plate Reader) Software	SkantIt™ RE for Multiskan Go
SDS-PAGE Gel Scanner Software	Adobe® Photoshop CS2
Thermal Shift Assay Software	Bio-Rad iQ™ 5 Potical System Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)

A.2. Methoden

A.2.1. Molekularbiologische Arbeiten

A.2.1.1. *Präparation von Plasmid-DNA*

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* kamen unterschiedliche *Kits* der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) zum Einsatz. Alle *Kits* machen sich dabei die alkalische Lyse zunutze um die Bakterienzellen aufzuschließen, die darin befindliche Plasmid-DNA herauszulösen und gleichzeitig chromosomale DNA zu zerstören [125]. Um störende RNA zu entfernen, wird dem dabei genutzten Puffer zusätzlich RNase hinzugefügt. Anschließend wird das Lysat neutralisiert und weiter mit der Aufreinigung verfahren. Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus kleineren Kulturmengen (5-10 ml), beispielsweise für Sequenzierungen, wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* genutzt. Zur Aufreinigung aus größeren Kulturmengen (50-100 ml) z.B. zur Lagerung, für weitere molekularbiologische Arbeiten und/oder Transformationen wurde das *Qiagen Plasmid Midi Kit* genutzt. Es wurde jeweils entsprechend der den *Kits* beiliegenden Anleitungen verfahren.

Unabhängig davon, welches *Kit* genutzt wird, werden zunächst 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden selektiven Antibiotikum versetzt und mit einer einzelnen Kolonie transformierte *E. coli* TOP10 Zellen von einer Agar-Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Wird nur eine kleiner Menge Plasmid-DNA benötigt, wird diese direkt mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* aus dem bakteriellen Pellet dieser 5 ml aufgereinigt. Für größere Mengen Plasmid-DNA wird aus der entsprechenden Vorkultur eine Hauptkultur mit einem Volumen von 50 ml LB-Medium und Antibiotikum angeimpft (Start-OD₆₀₀ = 0,1) und zwölf bis 16 Stunden bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Diese Kulturmenge wird nach Zentrifugation dann genutzt um daraus Plasmid-DNA mit dem *Qiagen Plasmid Midi Kit* aufzureinigen.

Bei Nutzung des *Midi Prep Kits* wird das durch Zentrifugation aufgereinigte Lysat mit Plasmid-DNA in einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration auf die Säule gegeben. Verunreinigungen werden danach mit einer leicht erhöhten Salzkonzentration entfernt. Die Plasmid-DNA selbst wird schließlich mit einem Puffer mit einer hohen Salzkonzentration eluiert. Nach der Aufreinigung der DNA über die *Qiagen-tip 100* Säule des *Midi Kits* muss die Plasmid-DNA durch die Zugabe von Isopropanol aus dem hochsalzigen Puffer gefällt

werden, das daraus entstandene Pellet mit Ethanol gewaschen und anschließend in einem gewünschten Puffer oder Wasser gelöst werden.

Bei Nutzung des *QIAprep Spin Mini Prep Kits* entfallen diese Schritte. Nach der Zellyse wird das neutralisiert Lysat bereits mit einem hochsalzigen Puffer versetzt. Nach Zentrifugation wird es auf die *QIAprep* Silicamembran gegeben. Danach erfolgt ein Waschschriff und die aufgereinigte DNA kann direkt mit dem gewünschten Puffer bzw. Wasser in einem definierten Volumen von der Säule eluiert werden.

Die Konzentration der Plasmid-DNA kann anschließend bei 260 nm mit dem *NanoDrop 1000* Mikrovolumen-Spektralphotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) und der zugehörigen Software bestimmt werden. Anschließend wird die Plasmid-DNA aliquotiert und bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert.

A.2.1.2. Native Agarose-Gelelektrophorese für DNA

Sowohl zur Überprüfung von Klonierungsarbeiten, als auch zur Durchführung dieser Klonierungsarbeiten müssen die DNA und DNA-Fragmente nach Restriktion einer Probe oftmals entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dies erfolgt mittels einer nativen Agarose-Gelelektrophorese, in der die negative Nukleinsäuremoleküle bei Anlegung eines elektrischen Feldes, entsprechend ihrer mit der Größe korrelierenden Ladung, durch das quervernetzte Agarose-Gel zur Anode wandern.

Zur Herstellung eines 1 %igen Agarose-Gels wird 1 g Agarose eingewogen und mit 100 mL 1 x TAE-Puffer versetzt. Zum Lösen der Agarose wird das Gemisch für zwei Minuten bei 700 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wird es rührend bei RT auf 50-60 °C abgekühlt und mit 5 µL des DNA-bindenden, grün-fluoreszierendem Farbstoffs *Roti®-GelStain* versetzt. Nach Einsetzen des Taschenkammes wird ein max. 5 mm dickes, luftblasenfreies Gel gegossen. Nachdem das Gel fest geworden ist, wird es mit 1 x TAE-Puffer überschichtet und die komplette Kammer mit diesem Puffer gefüllt. Die aufzutragenden Proben (DNA nach Restriktion) sind durch Verwendung des Puffers *FastDigest Green* bereits mit Probenauftragspuffer versetzt. Pro Tasche werden 10 µL Probe aufgetragen und in eine weitere Tasche 10 µL des *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* Größenstandards. Für die Laufzeit von einer Stunde wird eine Spannung von 70 V angelegt. Mittels des Intas UV Systems wird ein Bild des Gels aufgenommen und die entsprechenden

Banden der benötigten DNA-Abschnitte werden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten.

A.2.1.3. Extraktion und Aufreinigung von DNA aus einem Agarose-Gel

Zur Aufreinigung von DNA und DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* verwendet. Das Kit ermöglicht die Entfernung von einzelnen Nukleotiden, Salzen, Enzymen, Agarose und weiteren Verunreinigungen. Bis zu 80 % der im Gel befindlichen DNA kann damit aufgereinigt werden. Dabei wird eine Aufreinigung über eine Silicamembran nach demselben Prinzip der Bindung, Waschung und Elution wie für das *QIAprep Spin Mini Prep Kit* durchgeführt. Die aus dem Agarose-Gel ausgeschnittenen DNA-Fragmente werden zunächst in einem Puffer mit pH-Indikator gelöst. Der pH-Indikator ist notwendig um sicherzustellen, dass der $\text{pH} \leq 7,5$ ist und somit eine effektive Bindung an das Membranmaterial möglich ist. Anschließend wird die im Puffer gelöste DNA über die Silicamembran aufgereinigt. Pro Extraktion können so bis zu 400 mg Agarose-Gel aufgearbeitet werden. Es wurde entsprechend des dem *Kit* beiliegenden Protokolls verfahren.

Nach Elution der aufgereinigten DNA in einem definierten Volumen Puffer bzw. Wasser kann die Konzentration der Plasmid-DNA bei 260 nm mit dem *NanoDrop 1000* Mikrovolumen-Spektralphotometer und der zugehörigen Software bestimmt werden. Werden DNA-Fragmente direkt nach Restriktionsverdau aus dem Gel aufgereinigt, können diese direkt weiter in einer Ligation verwendet werden.

A.2.1.4. Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Die Restriktionen für die molekularbiologischen Arbeiten im Rahmen dieser Arbeit wurden mit den Enzymen *FastDigest NcoI* und *FastDigest XhoI* durchgeführt. Der Restriktionsverdau erfolgte dabei entsprechend der Empfehlung des Herstellers Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Der dargestellte Restriktionsansatz wird vermischt, kurz herunterzentrifugiert und für zehn bis 15 Minuten bei 37 °C im Thermoschüttler bzw. Wasserbad inkubiert. Das Volumen an Wasser kann entsprechend angepasst werden, wenn ein größeres Volumen Plasmid-DNA eingesetzt werden muss. Optional kann anschließend eine thermische Inaktivierung der

Enzyme erfolgen. Diese ist allerdings nicht notwendig, wenn mit den Proben direkt weitere verfahren wird und diese beispielsweise auf ein Agarose-Gel aufgetragen werden.

Tabelle A.15: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes mit *FastDigest* Enzymen

Komponente	Volumen
H ₂ O	12 µL
10 x FastDigest Puffer	2 µL
Plasmid-DNA (max. 2 µg)	4 µL
Restriktionsenzym 1 (NcoI)	1 µL
Restriktionsenzym 2 (XhoI)	1 µL
Gesamtvolumen	20 µL

Um eine Ligation von DNA-Fragmenten, die beispielsweise aus einem Agarose-Gel aufgereinigt werden, durchzuführen, wurde das Enzym T4 DNA Ligase verwendet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Entsprechend des vom Hersteller zu Verfügung gestellten Protokolls wird für eine Ligationsreaktion folgender Ansatz hergestellt.

Tabelle A.16: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes mit T4 DNA Ligase

Komponente	Volumen
Vektor-DNA	20-100 ng (\approx ca. 5 µL DNA-Fragment nach Gelextraktion)
Insert-DNA	1:5 molare Ratio (Vektor:Insert) (\approx ca. 10-12 µL DNA-Fragment nach Gelextraktion)
10 x T4 DNA Ligase Puffer	2 µL
T4 DNA Ligase (5 Weiss U/µL)	0,2 µL
H ₂ O	x µL
Gesamtvolumen	20 µL

Der Ligationsansatz wird vermischt, kurz herunterzentrifugiert und für zehn Minuten bei RT (kann bis auf eine Stunde verlängert werden) inkubiert. Bis zu 5 µL solch eines Ansatzes können zur Transformation von 50 µL chemisch kompetenter Zellen genutzt werden.

A.2.2. Stammherstellung und –erhaltung

A.2.2.1. Transformation chemisch kompetenter Zellen

Zur Transformation von 50 µL chemisch kompetenter *E. coli* Zellen können 1 µL aufgereinigte Plasmid-DNA oder 5 µL eines Ansatzes aus einer Ligation (A.2.1.4) verwendet werden. *E. coli* TOP10 Zellen (IBA, Göttingen) werden zur Plasmid-Propagation genutzt. Durch Glycerin-Gefrierkulturen von erfolgreich transformierten Kolonien kann nach einer Kultivierung so immer wieder neue Plasmid-DNA aufgereinigt werden. Transformierte *E. coli* BL21(DE3) Zellen (New England Biolabs, Ipswich, USA) werden zur effektiven heterologen Proteinproduktion genutzt. Für beide Formen chemisch kompetenter Zellen wurde nach den Empfehlungen des Herstellers vorgegangen. Nach Entnahme aus der Lagerung bei -80 °C werden die Zellen langsam für fünf bis zehn Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wird die entsprechende Menge Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz hinzugefügt und durch leichtes Anschnipsen des Reaktionsgefäßes vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis werden die Zellen in einem Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen (fünf Minuten bei 37 °C für *E. coli* TOP10 und zehn Sekunden bei 42 °C für *E. coli* BL21(DE3)). Nach einer fünfminütigen Inkubationsphase auf Eis werden die Zellen unter sterilen Bedingungen mit 950 µL vorgewärmten SOC-Medium versehen. Die Zellen werden für eine Stunde bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend werden 100 µL dieses Ansatzes, sowie 100 µL einer 1:10 Verdünnung auf bei RT vorgewärmten LB-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der restliche Transformationsansatz kann zur Sicherheit über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden. Am nächsten Tag können einzelnen Kolonien von der Platte gepickt und weiter kultiviert und charakterisiert werden.

A.2.2.2. Anlegen von Glycerin-Gefrierkulturen

Nach erfolgreicher Transformation (A.2.2.1) kann eine Kolonie gepickt und in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht schüttelnd bei 37 °C kultiviert werden. Zur Stammerhaltung in Glycerin-Gefrierkulturen werden jeweils 500 µL dieser Übernachtskultur mit 500 µL sterilem 43%-igem Glycerin versetzt und bei -80 °C in Kryovials bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Zum Animpfen aus diesen Glycerin-Gefrierkulturen wird mit einer Impföse eine kleine Menge des noch gefrorenen Materials abgenommen und eine

Vorkultur damit angeimpft. Somit kann eine Glycerin-Gefrierkultur mehrmals zum Animpfen genutzt werden.

A.2.3. Kultivierung

Alle zur Kultivierung von *E. coli* Zellen verwendete Materialien, Medien, Lösungen etc. werden vor Nutzung für 20 Minuten bei 120 °C autoklaviert bzw. sterilfiltriert, wenn das Autoklavieren aufgrund der Inhaltsstoffe der Lösungen nicht möglich ist.

A.2.3.1. Herstellung von Medium und Platten

LB- und TB-Medium werden entsprechend der in A.1.4 aufgelisteten Zusammensetzung hergestellt. Zur Herstellung von Agar-Platten aus LB-Medium wird den Komponenten des LB-Medium zusätzlich noch 15 g/L Agar hinzugefügt. Nach dem Autoklavierungsschritt wird gewartet bis die LB-Agar-Lösung auf ca. 50-60 °C abgekühlt ist, bevor das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt wird. Anschließend werden die Platten gegossen (ca. 20 mL pro Platte), abgekühlt und bis zur weiteren Verwendung verschlossen bei 4 °C gelagert.

A.2.3.2. Kultivierung und Offline-Analytik

Zur Kultivierung der verschiedenen *E. coli* Stämme wird zunächst jeweils eine Vorkultur (Übernachtskultur) des Stammes aus einer zuvor hergestellten und bis zum Zeitpunkt der Verwendung bei -80 °C gelagerten Glycerin-Gefrierkultur angeimpft. Das Animpfen erfolgt mit einer Impföse. Mittels dieser Impföse wird von der noch gefrorenen Glycerin-Gefrierkultur ein wenig Material abgenommen und dem mit Antibiotikum versetztem LB-Medium (5-10 mL) hinzugefügt. Nach Kultivierung dieser Übernachtskultur bei 30 °C und 180 rpm wird diese zum Animpfen der Hauptkultur genutzt. Das Volumen der Hauptkultur beträgt dabei in den meisten Fällen (z.B. Screening der optimalen Kultivierungsbedingungen) 50 mL. Das mit Antibiotikum versetzte Medium der Hauptkultur wird nach Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) der Vorkultur mit dieser so inokuliert, dass mit einer Start- OD_{600} von 0,05 die Hauptkultivierung gestartet wird. Bei Kultivierungen zur heterologen Proteinproduktion wird normalerweise bei einer OD_{600} zwischen 0,6 und 0,8 die Proteinproduktion mit IPTG induziert. Zur Bestimmung der OD_{600} mittels Photometer (Multiskan® GO) wird diese jeweils gegen einen Leerwert mit Saline (0,9 % NaCl-Lösung) gemessen. Da die Messung nur bis zu einem Wert von $OD_{600} = 0,8$

linear ist, wird bei Werten oberhalb dieses Bereiches eine entsprechende Verdünnung mit Saline vorgenommen.

A.2.3.3. Zellernte

Nach zwei bis 24 Stunden Kultivierung der Hauptkultur werden die Zellen geerntet. Dazu wird die Kulturbrühe mit den *E. coli* Zellen in ein Zentrifugationsgefäß umgefüllt und für 15 Minuten bei 4 °C und 17.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das daraus resultierende Zellpellet wird direkt weiter verarbeitet oder zunächst bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

A.2.4. Proteinanalytik

Die zur Proteinanalytik verwendeten Proben werden entsprechend normiert um eine Vergleichbarkeit aller Proben zu erhalten (Unabhängig von Dauer der Kultivierung/Menge der Zellen), Das Volumen an Kulturbrühe bei der Zellernte (A.2.3.3) wird dabei so gewählt, dass in dem angestrebten Volumen Lysispuffer nach Resuspendierung des Zellpellets für den Zellaufschluss ein OD₆₀₀-Wert von 15 vorliegt.

A.2.4.1. Zellaufschluss (Ultraschall, BugBuster® und French Press)

Ultraschall

Bei Verwendung von Ultraschall zum Zellaufschluss, z.B. zur Testung der verschiedenen Kultivierungsbedingungen, wird immer mit einem Volumen von 300 µL Lysispuffer gearbeitet. Die durch Zentrifugation gewonnen Zellpellets werden in dem entsprechendem Volumen Lysispuffer resuspendiert. Um die Zelllyse zu unterstützen, wird dem Lysispuffer Lysozym in einer finalen Konzentration von 1 mg/mL hinzugefügt. Das in Lysispuffer resuspendierte Zellpellet wird für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen in vier Zyklen mit Ultraschall (100 % Amplitude, 0,6 s Pulsation/Zyklus, 1,5 Minuten/Zyklus) auf Eis aufgeschlossen. Die Pausen zwischen den Zyklen werden jeweils dazu genutzt, die weiteren Proben zu bearbeiten. Nach Zugabe von DNase (0,3 mg/mL) werden die Proben erneut für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Proben bei 17.000 x g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Die lösliche Proteinfraktion befindet sich anschließend im Überstand.

BugBuster®

Bei der Verwendung von BugBuster® zur Zellyse wird neben dem eigentlichen Proteinextraktionsreagenz zusätzlich mit Ultraschall gearbeitet um einen vollständigen Aufschluss der Zellen zu gewährleisten. 2 mL BugBuster® Lösung wird jeweils mit 1 µL Benzonase (250 U/µL) und 2 µL rLysozym™ (2 KU/µL) versehen. Das Volumen dieser BugBuster™ Lösung zur Resuspendierung und zum Aufschluss der Zellen wird äquivalent zur oberen Behandlung mit Ultraschall gewählt. Die in der Arbeitslösung resuspendierten Pellets werden kurz gevortext. Anschließend wird das Lysat für 30 Minuten bei 27 °C und 350 rpm auf einem Temperaturschüttler inkubiert. Anschließend werden die Zellen in 4 Zyklen mit Ultraschall (100 % Pulsation, 60 % Amplitude, 1,5 Minuten/Zyklus) auf Eis aufgeschlossen. Die Pausen zwischen den Zyklen werden jeweils dazu genutzt, die weiteren Proben zu bearbeiten. Anschließend werden die Proben bei 17.000 x g und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Die lösliche Proteinfraction befindet sich anschließend im Überstand.

French Press

Die French Press als Aufschlussmethode kann vor allem dann genutzt werden, wenn größere Mengen an Zellen aufgeschlossen werden sollen oder aber, wenn Nachteile der anderen beiden Aufschlussmethoden vermieden werden sollen. Die Kulturbrühe mit Zellen wird in einen Zentrifugationsbecher gefüllt und bei 17.000 x g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird nach Zentrifugation verworfen und das Gewicht des Zellpellets bestimmt (zuvor wurde das Taragewicht des Zentrifugationsbehältnisses bestimmt). Für den Aufschluss mittels French Press ist ein Mindestvolumen von 20 mL Zelllysat notwendig. Pro g Zellmasse werden 10 mL Puffer eingesetzt. Das Pellet wird in einem entsprechenden Volumen an Puffer gelöst und für 30 Minuten gerührt. Die Aufschlusskammer, durch die das Zelllysat mit hohem Druck geleitet wird, muss mit Eis gekühlt werden. Zusätzlich wird die Anlage mit Kühlwasser versorgt. Die Druckluftzufuhr der Anlage wird auf 9 K eingestellt. Das zur Sterilisation in der Anlage befindliche Isopropanol wird abgepumpt und die Anlage wird insgesamt 4-mal mit Wasser gespült. Nach den ersten beiden Spülschritten mit Wasser wird zusätzlich einmal mit 1 M NaOH-Lösung gespült. Abschließend wird einmal mit dem zur Zellyse verwendeten Puffer gespült, sodass sich im gesamten Volumen der Anlage Puffer befindet. Die aufzuschließende Probe wird mehrmals durch die Anlage gepumpt (jeweils aufgefangen und erneut

eingefüllt). Nach 8-10 Durchläufen wird mit 20 mL Puffer die restliche Probe aus der Anlage gespült (dadurch verdünnt sich die Probe weiter). Sollen weitere Proben aufgeschlossen werden, müssen zwischen jeder Probe erneut Waschschriffe mit Wasser, NaOH und Puffer erfolgen. Sind alle Proben aufgeschlossen, muss das Gerät gesäubert und für die Lagerung vorbereitet werden. Hierzu wird das Gerät erneut mit Wasser und NaOH gespült. Zur Lagerung wird das Gerät mit Isopropanol gespült und dieses wird bis zur weiteren Verwendung im Gerät belassen.

A.2.4.2. SDS-PAGE (mit Coomassie- und Silberfärbung)

Zur Durchführung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophores (SDS-PAGE) werden sowohl selbst hergestellte Gele als auch kommerziell erhältliche Fertiggele verwendet. Die selbst hergestellten Gele werden je nach gewünschtem Vernetzungsgrad (prozentualer Anteil Polyacrylamid) gemäß der in Tabelle A.17 und Tabelle A.18 dargestellten Zusammensetzung hergestellt.

Tabelle A.17: Zusammensetzung eines 12 %igen SDS-Trenngels

Komponente	Volumen
Acrylamid-,Bisacrylamid-Stammlösung (37,5 : 1, 40 %ig) (Rotiphorese® 40)	1,5 mL
SDS-Lösung (1 %)	0,5 mL
Tris HCl (1,5 M, pH 8,8)	1,4 mL
H ₂ O	1,6 mL
TEMED	10 µL
APS (25 %ig)	10 µL
Gesamtvolumen	5,02 mL

Tabelle A.18: Zusammensetzung eines 8 %igen SDS-Sammelgels

Komponente	Volumen
Acrylamid-,Bisacrylamid-Stammlösung (37,5 : 1, 40 %ig) (Rotiphorese® 40)	750 µL
SDS-Lösung (1 %)	300 µL
Tris HCl (1,5 M, pH 6,8)	630 µL
H ₂ O	3,770 mL
TEMED	10 µL
APS (25 %ig)	10 µL
Gesamtvolumen	5,47 mL

Zum Gießen der Gele wird das Mini-Protein® Tetra Handcast System verwendet. Die zum System gehörende Glas(spacer)platten werden mit Wasser und Isopropanol gereinigt und die Gießstation entsprechend der Anleitung aufgebaut und auf ihre Dichtigkeit geprüft. Das Trenngel wird gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Aushärtung dieses Trenngels (20-30 Minuten) wird das Isopropanol entfernt, das Sammelgel gegossen und vor Aushärtung mit einem Kamm zur Ausformung der Probestaschen versehen. Ist das Sammelgel ebenfalls ausgehärtet, kann das gesamte Gel aus der Gießvorrichtung entnommen und direkt verwendet oder bei 4 °C in feuchten Tüchern für mehrere Tage gelagert werden. Werden kommerziell vertriebene Fertiggele genutzt, entfallen diese Schritte und es wird nach der entsprechenden Anleitung der Fertiggele verfahren.

Die für die SDS-PAGE vorgesehenen Proben wurden jeweils mit einem äquivalenten Volumen an 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für fünf Minuten aufgekocht. Für den Gellauf werden die Gele in die Elektrophoresemodule-Einsätze eingespannt und der Zwischenraum zwischen zwei Gelen wird mit 1 x TGS Laufpuffer gefüllt und auf seine Dichtigkeit geprüft. Anschließend wird der Kamm entfernt und die Taschen mit Proben (je 10 µL) und Proteinmarker (je 7 µL) gefüllt. Das Modul samt Gelen wird dann in die entsprechende Vorrichtung des Laufkammertanks eingesetzt und dieser bis zur Markierung ebenfalls mit 1 x TGS-Puffer befüllt. Nach Aufsetzen des Deckels mit der richtigen Orientierung der Kontakte wird der Gellauf zunächst für 10-15 Minute bei 100 V durchgeführt. Anschließend wird die Spannung für weitere 45-60 Minuten auf 150 V erhöht.

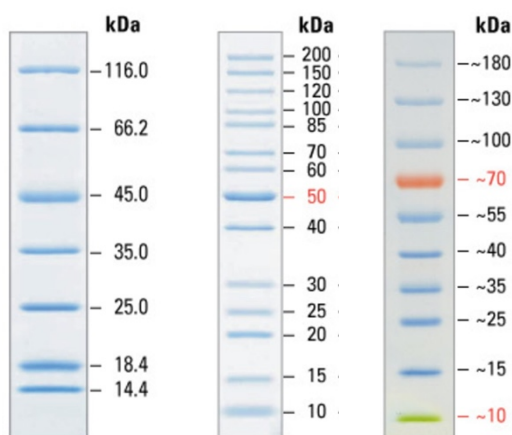


Abbildung A.1: Proteinmarker Pierce™ Unstained Protein MW Marker (#26610; 14-116 kDa), Proteinmarker PageRuler™ Unstained Protein Ladder (#26614; 10-200 kDa) und PageRuler™ Prestained Protein Ladder (#26616; 10-170 kDa)

Coomassie-Färbung

Nach dem Gellauf wird das Gel kurz mit Wasser abgespült und über Nacht in der Coomassie-Färbelösung schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag kann das Gel in mehreren Schritten mit Wasser wieder entfärbt werden, bis der Hintergrund farblos ist.

Silber-Färbung

Nach dem Gellauf wird das Gel kurz mit Wasser abgespült und für 20 Minuten in eine Fixierlösung gelegt. Dann wird das Gel zweimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wird das Gel für 2,5 Minuten in Farmes Reducer geschwenkt und zwei bis dreimal je fünf Minuten mit Wasser gewaschen. Danach wird das Gel für 30 Minuten in Silbernitratlösung schüttelnd inkubiert, erneut zwei- bis dreimal je 30 Sekunden in Wasser gewaschen und kurz in einer Natriumcarbonatlösung geschwenkt. Die Lösung wird verworfen und eine mit Formaldehyd versetzte Natriumcarbonatlösung wird hinzugeben. Wenn sich deutliche Banden entwickelt haben, wird die Lösung zügig verworfen. Die Reaktion wird durch die 10-minütige Zugabe einer Essigsäurelösung gestoppt. Anschließend kann das Gel in Wasser gelagert werden.

A.2.4.3. Proteinaufreinigung über Ni-NTA Spin columns

Das komplette Aufreinigungsverfahren mittels Ni-NTA Spin columns (0,2 mL Säulenmaterial) erfolgt, soweit möglich, auf Eis. Das Zielprotein enthält ein Hexa-Histidin-Tag und kann dadurch über das Material der Säulen aufgereinigt werden. Es wird entsprechend des Herstellerprotokolls verfahren, welches Schritte zur Äquilibrierung, Proteinbindung, Reinigung und Elution vorsieht. Dabei finden Puffer mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen (Äquilibrierung: 10 mM, Reinigung: 20 mM, Elution: 250 mM) Anwendung.

Kurz zusammengefasst, die Säulenspitze wird entfernt und die Säule für zwei Minuten bei 700 x g zentrifugiert um den Lagerungspuffer zu entfernen. Es wird 400 µL Äquilibrierungspuffer aufgetragen, kurz inkubiert und danach für zwei Minuten bei 700 x g zentrifugiert. Die Säulenspitze wird wieder aufgesetzt, der Überstand nach Zellyse mit einem zum Lysispuffer äquivalentem Volumen Äquilibrierungspuffer vermischt (mind. 0,4 mL Gesamtvolumen), das gesamte Gemisch auf die Säule gegeben und für 30 Minuten auf Eis schüttelnd inkubiert. Anschließend wird die Säulenspitze entfernt und die Säule für

zwei Minuten bei 700 x g zentrifugiert (Durchflussfraktion). Insgesamt wird dreimal mit je 400 µL Waschpuffer gewaschen (zwei Minuten, 700 x g; drei Waschfraktionen). Danach wird dreimal mit je 200 µL Elutionspuffer das Zielprotein von der Säule eluiert (zwei Minuten, 700 x g; drei Elutionsfraktionen). Zur Regeneration der Säule wird diese mit zehn Volumen (insg. 2 mL) MES-Puffer sowie mit zehn Volumen Wasser gewaschen. Anschließend wird zur Lagerung bei 4 °C ein Volumen (0,2 mL) 20%iges Ethanol auf die Säule gegeben.

A.2.4.4. Densitometrische Quantifizierung von Proteinen

Zur Quantifizierung der Proteinfractionen im SDS-Gel wird eine densitometrische Analyse durchgeführt. Hierzu wird, neben den zu analysierenden Proteinfractionen, ein BSA-Kalibrationsreihe unterschiedlicher Konzentrationen auf das Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fraktionen wird das Gel mittels Coomassie eingefärbt und in Form einer Bilddatei dokumentiert. Zur Bestimmung der relativen Farbdichte der einzelnen Proteinbande wird die Bildanalysesoftware ImageJ verwendet. Für jede Probenspur wird dabei ein gleichgroßer rechteckiger Ausschnitt analysiert. Anschließend wird über die Software ein Profilplot für den Ausschnitt der Probenspur erstellt. Dieser enthält Peaks für jede einzelnen Bande in diesem Ausschnitt. Die Größe des Peaks korreliert mit der Intensität der Bande und somit auch mit der vorhandenen Menge an Protein. Anhand der Fläche der Farbdichtepeaks der Standardreihe kann eine Kalibration erstellt werden und die Proteinkonzentration der Proben anhand ihrer Peakfläche ermittelt werden.

A.2.4.5. Western Blot

Als Vorbereitung auf den Western Blot muss zunächst eine SDS-PAGE mit einem gefärbten Marker durchgeführt werden. Dabei werden zwei identische SDS-PAGE Gele erzeugt. Eines der Gele wird mit Coomassie angefärbt, das andere wird für den Western Blot genutzt. Das Western Blot Protokoll kann in drei Schritte unterteilt werden: das Blotting der Membran, das Blocken der Membran und die Immunmarkierung der Membran.

Zum **Blotting der Membran** wird zunächst die in einer Schutzfolie befindliche PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten. Das Gel wird nach der SDS-PAGE mit Wasser abgespült und die Membran gleichzeitig für fünf Minuten in Methanol aktiviert und anschließend für zehn Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Die Platten, zwischen denen sich das Gel befindet werden geöffnet und das Gel wird auf eine dieser Platten belassen. Das

Gel wird ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtet und die äquilibrierte Membran passend auf das Gel gelegt. Ein ebenfalls in Transferpuffer getränktes Blotpapier wird auf die Membran gelegt. Dies alles erfolgt blasenfrei, eventuell entstehende Luftblasen können durch Rollen herausgedrückt werden. Das dadurch entstandene „Sandwich“ wird mit dem Gel nach oben auf die Oberfläche der Western Blot Apparatur gegeben. Auf das Gel wird ein weiteres, in Transferpuffer getränktes Blotpapier, gelegt. Die Apparatur wird verschlossen und für 50 Minuten eine Spannung von 15 V angelegt. Ob der Blottingvorgang funktioniert hat, lässt sich u.a. an der Übertragung des gefärbten Markes vom Gel auf die Membran erkennen.

Zum **Blocken der Membran** wird diese über Nacht bei 4 °C in einer Blocklösung inkubiert. Alternativ kann eine Inkubation bei Raumtemperatur für zwei Stunden gewählt werden. Das Blocken der Membran ist wichtig um nichtbesetzte Position auf der Oberfläche der Membran abzusättigen, da an diese ansonsten der Antikörper binden würde.

Als Vorbereitung für die **Immunmarkierung** wird die Membran nach einer kurzen Aufwärmphase bei RT (30 Minuten) dreimal jeweils fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die Antikörperdiluentslösung setzt sich aus einem Teil Blocklösung und einem Teil Waschlösung zusammen. Zur Inkubation der Membran mit den primären und sekundären Antikörpern in einer 50 mL Reagenzröhre unter Bewegung ist jeweils ein Volumen von 4 mL Antikörperlösung nötig. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper (Anti-His bzw. Anti-ALOXe3) werden jeweils 1:5.000 verdünnt. Die entsprechenden sekundären Antikörper mit einem HRP-Konjugat werden 1:10.000 verdünnt. Die Membran wird für eine Stunde in den jeweiligen Antikörperlösungen inkubiert und zwischen den einzelnen Schritten je für dreimal fünf Minuten mit Waschpuffer gereinigt. Nach Bindung des zweiten Antikörpers und eines Reinigungsschrittes wird 1 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) mehrmals über die Membran geträufelt. Nach Entwicklung von Banden wird die Reaktion mit Wasser abgestoppt. Das Ergebnis wird im Auflichtmodus eingescannt.

A.2.5. Aufbereitung und Charakterisierung *Inclusion Bodies*

A.2.5.1. *Aufreinigung der Inclusion Bodies*

Das Protokoll zur Aufreinigung von *Inclusion Bodies* dient dazu, diese möglichst schonend aus den Bakterienzellen, die zur Kultivierung genutzt wurden, herauszulösen und sie

anschließend von den Zellbestandteilen und anderen Verunreinigungen zu trennen. Ein wichtiges Element dieses Aufreinigungsprotokolls sind die Zwischenschritte, mit denen überprüft wird, ob noch lebende Bakterienzellen vorhanden sind. Für das Endprodukt dieses Aufreinigungsprotokolls muss zusätzlich überprüft werden, ob es zu Kontaminationen in der Zellkultur führen kann. Das Protokoll zur Produktion und Aufreinigung von *Inclusion Bodies* dauert insgesamt 5 Tage.

Die Kultivierung zur Gewinnung von *Inclusion Bodies* wird in LB-Medium (+Antibiotikum) durchgeführt. Als Vorkultur werden 25 mL mit einer Glycerin-Gefrierkultur angeimpft und anschließend über Nacht bei 30 °C und 180 rpm kultiviert. Die Hauptkultur (500 mL LB-Medium (+ Antibiotikum) in einem 2-L-Erlenmeyerkolben) wird aus dieser Vorkultur mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Ist eine OD₆₀₀ von 0,7 erreicht wird die Temperatur auf 25 °C gesenkt und die Proteinproduktion mit 0,5 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Drei Stunden nach Induktion wird die Kultivierung gestoppt.

Nach dem Stoppen der Kultivierung werden 2 μM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 100 μg/mL Lysozym und eine cOmplete™ EDTA-freie Proteaseinhibitor Cocktail Tablette zur Kulturbrühe hinzugefügt und das ganze geschüttelt (2 h, 37 °C, 180 rpm). Die Kulturbrühe wird anschließend in eine sterile 1 L quadratische Flasche (PP) von Nalgene™ gefüllt und über Nacht bei -80 °C eingefroren.

Am nächsten Tag wird die Flasche mit der Kulturbrühe in einem Wasserbad (22 °C) aufgetaut, 2 mL steriles Triton-X-100 hinzugefügt und inkubiert (1 h, RT, 50 rpm). 100 μL dieser Lösung werden auf einer LB-Agar-Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert um zu überprüfen, ob noch lebende Bakterienzellen vorhanden sind. Die verbleibende Kulturbrühe wird bei -80 °C eingefroren.

Nachdem die Lösung am nächsten Tag erneut in einem Wasserbad (22 °C) aufgetaut wird, wird 125 μL steriles Nonidet™ P-40 hinzugefügt und inkubiert (1 h, 4 °C, 50 rpm). 1 μg/mL DNase und 1 mM MgSO₄ werden der Lösung hinzugefügt und diese wird geschüttelt (1 h, 37 °C, 180 rpm). Die gesamte Kulturbrühe wird dann zentrifugiert (15 Min, 4 °C, 15.000 x g), der Überstand verworfen, das resultierende Pellet mit 25 mL sterilem Lysispuffer gewaschen und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und das resultierende Pellet in 25 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)

resuspendiert. 100 μ L dieser Lösung werden auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert um die Sterilität zu überprüfen. Die restliche Lösung wird über Nacht bei -80 °C eingefroren.

Diese wird am nächsten Tag erneut in einem Wasserbad (22 °C) aufgetaut, zentrifugiert (15 Min, 4 °C, 15.000 x g), der Überstand verworfen und das Pellet in 25 mL endotoxin freiem Wasser resuspendiert. Diese Suspension aus *Inclusion Bodies* wird entsprechend aliquotiert (1 mL und/oder 100 μ L pro Aliquot), zentrifugiert (15 Min, 4 °C, 15.000 x g), der Überstand verworfen und die Pellets bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Bevor diese *Inclusion Bodies* in der Zellkultur eingesetzt werden, werden sie erneut auf Sterilität auf LB-Agar-Platten und in den in der Zellkultur verwendeten Medien ohne Antibiotika getestet. Zusätzlich wurde vor Nutzung der *Inclusion Bodies* ihre Konzentration densitometrisch bestimmt und die Proteine zusätzlich per LC-MS-Messung nachgewiesen.

A.2.5.2. Solubilisierung und Rückfaltung

Zur Solubilisierung und Rückfaltung wurden zwei unterschiedliche Methoden getestet:

Solubilisierung und Rückfaltung I (schrittweise Dialyse): Ein Pellet mit *Inclusion Bodies* (ca. 3,5 mg) wird in 7 mL Puffer resuspendiert (finale Konzentration: 0,5 mg/mL). Nach Resuspendierung wird der Ansatz zur Solubilisierung schüttelnd über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben für 30 Minuten bei 17.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird zur weiteren Verarbeitung in einen Dialyseschlauch (ZelluTrans/Roth Dialysiermembran T1; Carl Roth, Karlsruhe) umgefüllt (zuvor Probe für SDS-PAGE entnehmen). Durch Wechsel des die Dialyseschläuche umgebenden Puffers alle zwölf Stunden wird eine langsame Umpufferung der im Dialyseschlauch befindlichen Proteinlösung erreicht. Dadurch wird der pH-Wert gesenkt und sukzessiv die Konzentration an Glutathion, Urea, DTT etc. gesenkt. Abschließend erhält man eine Proteinlösung in Tris-Puffer (pH 8). Nach Umpufferung wird die Lösung erneut bei 17.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Das in Lösung gegangene und gefaltete Protein befindet sich danach im Überstand, das aggregierte Protein im Pellet. Vom Überstand wird erneut eine Probe genommen und mit anderen Proben, die während der Solubilisierung und Rückfaltung entnommen worden sind, in einer SDS-PAGE analysiert. Mit dem Überstand wird zusätzlich ein Thermal Shift Assay und eine LOX Assay durchgeführt.

Tabelle A.19: Übersicht der eingesetzten Puffer für die Solubilisierung und Rückfaltung mittels einer dreistufigen Dialyse

Puffer	1	2
Solubilisierung	55 mM Tris Base pH 12 2 M Urea 1 mM DTT	55 mM Tris Base pH 12 2 M Urea 1 mM DTT 1 mM Glutathion oxid. 2 mM Glutathion red.
Dialyse I	55 mM 1 M 1 mM	Tris Base pH 10 Urea DTT
Dialyse II	100 mM 1 M	Tris Base pH 8 Urea
Dialyse III	100 mM	Tris Base pH 8

Solubilisierung und Rückfaltung II (Verdünnungsmethode und Dialyse): Ein Pellet mit *Inclusion Bodies* (ca. 3,5 mg) wird in 1 mL Puffer resuspendiert (finale Konzentration: 3,5 mg/mL). Nach Resuspendierung wird der Ansatz zur Solubilisierung schüttelnd über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben für 30 Minuten bei 17.000 x g zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Probe für die Analyse mittels SDS-PAGE entnommen. Um zunächst den pH-Wert langsam anzupassen, werden in drei Schritten alle 24 Stunden 300 µL in 6 mL Puffer mit dem entsprechenden pH-Wert gegeben. Zusätzlich wird getestet, ob die Zugabe von 25 mM DTT bei der ersten Zugabe der 300 µL, sowie die Zugabe von 1 mM oxidiertem Glutathion und 2 mM reduziertem Glutathion bei Zugabe der letzten 300 µL die Rückfaltung positiv beeinflusst. Die daraus resultierenden Lösungen werden bei 17.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand in einen Dialyseschlauch überführt und zusätzlich eine Probe für die SDS-PAGE entnommen. Nach erfolgter Dialyse (24 h, 4 °C) wird erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und eine Probe des Überstandes für die SDS-PAGE entnommen. Diese wird mit anderen Proben, die während der Solubilisierung und Rückfaltung entnommen worden sind, in einer SDS-PAGE analysiert. Mit dem Überstand wird zusätzlich ein Thermal Shift Assay und eine LOX Assay durchgeführt.

Tabelle A.20: Übersicht der eingesetzten Puffer für die Solubilisierung und Rückfaltung mittels Verdünnungsmethode/Dialyse

Puffer	1	2
Solubilisierung	50 mM 2 M	Tris Base, pH 12 Urea
Verdünnungsmethode	50 mM Tris Base, pH 8,5 2 M Urea 5 % Sucrose	50 mM Tris Base, pH 8,5 2 M Urea 5 % Sucrose 25 mM DTT 1 mM Glutathion oxid. 2 mM Glutathion red.
Dialyse	100 mM	Tris HCl pH 7,4

A.2.5.3. *Thermal Shift Assay*

Zur Durchführung des Thermal Shift Assays wird eine Proteinprobe mit einer Konzentration von ca. 5 μM benötigt. Von einer 5.000 x Sypro® Orange Lösung wird mit dem Puffer, in dem auch die Proteine gelöst sind, eine 200 x Lösung hergestellt. 22,5 μL der Proteinprobe werden mit 2,5 μL dieser 200 x Stocklösung in den Wells einer PCR-Platte vermischt. Es erfolgt eine Dreifachbestimmung aller Proben. Als Negativkontrolle dient ein Well, welches 22,5 μL Puffer anstatt der Proteinprobe enthält. Zur Durchführung des Assays wird das Real-time PCR System iQ™-5 mit der iQ™-5 Optical System Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) genutzt. Mit einem SYBR Green Filter wird die Fluoreszenz erfasst und die Temperatur von 25 °C stufenweise um 1 °C pro Minute auf 100 °C erhöht.

A.2.5.4. *LOX Assay*

Zur Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität der in Form von *Inclusion Bodies* produzierten epidermalen Lipoxygenasen ALOXe3 und AmbLOXe wurde das *Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay Kit* der Firma Cayman Chemical (Ann Arbor, USA) genutzt. Das Kit wurde entsprechend der Anleitung genutzt. Da es allerdings grundsätzlich für die Messung von Lipoxygenaseinhibitoren gedacht ist und in diesem Fall die Lipoxygenaseaktivität gemessen werden sollte, wurde es in diesem Punkt entsprechend angepasst. Als Substrat für das Assay diente Arachidonsäure. Dabei katalysieren die meisten Lipoxygenasen eine Addition von molekularem Sauerstoff an das cis,cis-1,4-Pentadien-System dieser Fettsäure. Bei dieser Addition wird Hydroperoxid produziert, welches mit diesem Assay detektiert und gemessen wird.

Der *Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay* Puffer (10x) wird entsprechend mit Wasser verdünnt um einen 1x Puffer zu erhalten. Dieser Puffer wird vor allem zur Verdünnung von Proben und des Lipoxygenasestandards verwendet. Die Entwicklungsreagenzien 1 und 2 werden in gleichen Anteilen vermischt um das Chromogen zu erhalten, welches mit dem Hydroperoxid reagiert. Der mitgelieferte 15-Lipoxygenase-Standard sowie die zu untersuchenden Proben werden vor Einsatz im Assay 1:100 verdünnt. Das Substrat Arachidonsäure wird mit einem äquivalenten Anteil Kaliumhydroxid vermischt und mit dem Assaypuffer auf eine finale Konzentration von 1 mM verdünnt.

Die mit dem Assay durchgeführten Experimente enthalten jeweils eine Dreifachbestimmung. Neben den eigentlichen Proben werden zusätzlich Proben ohne Enzym vermessen (Blanko-Wert) sowie Positivkontrollen mit der im Assay enthalten Lipoxygenase. In den Wells einer 96-Well-Platte werden zunächst 100 µL Volumen vorgelegt. In den Blanko-Wells 100 µL Assaypuffer, in der Positivkontrolle sowie in den zu vermessenden Proben jeweils 90 µL Enzym/Probe und 10 µL Assaypuffer. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Reaktion durch Zugabe von 10 µL Substrat (Arachidonsäure) gestartet. Die 96-Well-Platte wird anschließend für 10 Minuten schüttelnd inkubiert. Dann werden 100 µL des Chromogens hinzugegeben um die Enzymkatalyse zu stoppen und die Farbreaktion zu starten. Nach einer Inkubation von fünf Minuten auf dem Schüttler wird die Absorption bei 495 nm bestimmt.

A.2.6. Arbeiten in der Zellkultur

Soweit nicht anders angegeben, werden alle genutzten Materialien, falls diese nicht bereits steril geliefert werden, autoklaviert. Alle benutzten Lösungen werden ebenfalls entsprechend autoklaviert oder sterilfiltriert, wenn das Autoklavieren nicht möglich ist, da dadurch Inhaltsstoffe der entsprechenden Lösungen beschädigt werden würden. Alle Zellen (NiH-3T3 und HaCaT) werden im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % bzw. 1 % Fötalem Bovinem Serum (FBS) bei Nutzung von Hungermedium.

A.2.6.1. Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung sollten die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % aufweisen und einen Tag vor dem geplanten Einfrieren sollte das Medium gewechselt werden. Der

Gefrierbehälter (Mr. Frosty) muss zur Vorbereitung mit Isopropanol bis zur Markierung gefüllt werden und über Nacht im Kühlschrank gelagert werden. Die Zellen werden entsprechend des Protokolls zum Passagieren trypsinisiert und gezählt. Die Zellsuspension wird bei 300 x g für drei Minuten herunterzentrifugiert und in einem entsprechenden Volumen ($2 \cdot 10^6$ Zellen/mL) Kryomedium (70 % DMEM Medium, 20 % FBS, 10 % DMSO (sterilfiltriert)) resuspendiert. Jedes Kryovial wird mit 1 mL Zellsuspension gefüllt und im Gefrierbehälter über Nacht bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag werden die Kryovials in einen Kryotank mit flüssigem Stickstoff überführt.

A.2.6.2. Revitalisierung von Zellen

Das gefrorene Kryovial wird dem Kryotank entnommen und ein bis drei Minuten schwenkend in einem Wasserbad (37 °C) angetaut bis nur noch ca. 1/3 des Volumens gefroren ist. Der Inhalt wird in eine größere Zentrifugenröhre überführt und 8 mL vorgewärmtes Medium langsam hinzugefügt. Der gesamte Inhalt wird in eine T75 Kultivierungsflasche überführt und bei 37 °C , 5 % CO_2 kultiviert. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt und nach 2-4 Tagen haben die Zellen eine Konfluenz $>90\%$ erreicht und müssen passagiert werden.

A.2.6.3. Ernten und Passagieren von Zellen

Das im Folgenden dargestellte Passageprotokoll für Zellen bezieht sich in seinen Angaben auf eine Kultivierungsflasche mit einer Fläche von 75 cm^2 . Diese Angaben können entsprechend auch auf Flaschen mit anderen Flächengrößen übertragen werden.

Haben die Zellen eine Konfluenz $>90\%$ erreicht sollten sie passagiert werden. Dazu wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend werden 4 mL Trypsin-EDTA hinzugegeben und für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 4 mL Medium wird die Trypsinierung gestoppt. Das gesamte Volumen von 8 mL wird in ein Zentrifugengefäß überführt und bei 300 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wird in frischem Medium (3 mL) resuspendiert und die Zellen können gezählt werden oder bei einem einfachen Passagevorgang in einer bestimmten Verdünnung weiter kultiviert werden.

Zusätzliche Schritte für das Ernten und Passagieren von HaCaT Zellen:

Nachdem das PBS abgesaugt wurde, werden 2,5 mL 0,05 %ige EDTA-Lösung hinzugegeben um die spätere Ablösung mittels Trypsin zu unterstützen. Dies wird für zehn Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend abgesaugt. 2,5 mL Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin, 0,025 % EDTA) werden hinzugefügt und für ein bis zwei Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 mL Medium zum Abstoppen der Trypsinierung wird wie oben beschrieben weiter verfahren. Da HaCaT Zellen zu Verklumpung neigen, wird vor und nach der Zentrifugation durch Vortexen und Pipettieren versucht, dies möglichst zu verhindern. Zusätzlich können die Zellen noch durch einen Zellfilter (Falcon™ Cell Strainer 40 µm) vereinzelt werden. Dies ist insbesondere wichtig, wenn die Zellen in *in vitro* Assays eingesetzt werden sollen.

A.2.6.4. Zählen von Zellen

Zur Ermittlung der Zellzahl werden 20 µL der Zellsuspension entnommen und mit 20 µL 0,4 %igen Trypanblau-Lösung versetzt. Das Deckglas wird auf die Neubauer-Zählkammer gesetzt und jeweils 10 µL in die beiden Kompartimente der Zählkammer gegeben. In jedem Kompartiment werden zwei Quadranten ausgezählt. Anhand des Mittelwerts dieser Auszählung und unter Berücksichtigung der Verdünnung mit Trypanblau (1:2) kann so die Zellzahl ($\cdot 10^4$) pro mL bestimmt werden.

A.2.6.5. Fixieren und Färben von Zellen

Im Folgenden sind die Protokolle zum Fixieren und Färben von Zellen in einer 24-Well-Platte (1,9 cm²) aufgeführt. Das Protokoll kann natürlich entsprechend an kleinere bzw. größere Kultivierungsflächen angepasst werden.

Sollen Zellen fixiert werden, muss zunächst das Medium abgenommen werden. Anschließend werden die Zellen mit 500 µL PBS gewaschen. Das PBS wird abgesaugt und 200 µL Paraformaldehyd pro Well werden hinzugegeben. Dies wird für zehn Minuten bei RT inkubiert und danach abgesaugt. Zur weiteren Lagerung werden in jedes Well 500 µL PBS gefüllt und diese bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank belassen.

Zur Färbung der Zellen wird das PBS abgenommen und pro Well 200 µL einer 0,02 %igen Kristallviolett-Lösung auf die Zellen gegeben. Die Zellen werden mit der Färbelösung fünf Minuten bei RT inkubiert. Die Färbelösung wird abgenommen und die Zellen solange mit Wasser gewaschen bis die Lösung klar ist.

A.2.6.6. *ECIS (Wundheilungsassay I)*

Die Arrays werden zunächst mit 200 µL 10 mM Cysteinlösung pro Well vorbehandelt. Diese wird für 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend abgesaugt und das Well zweimal mit sterilem Wasser gespült. Zur Beschichtung mit aufgereinigten *Inclusion Bodies* (A.2.5.1) wird mit 0,15 M Natriumchloridlösung eine Verdünnungsreihe hergestellt. Jeweils 200 µL der *Inclusion-Body*-Lösung werden in jedes Well gegeben und für zwei bis drei Stunden bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und in jedes Well werden 200 µL Medium vorgelegt. Das Array wird an das Impedanzgerät *ECIS* 1600R im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) angeschlossen. Die Verbindung aller Elektroden wird in der Software überprüft und der Start-Impedanzwert für jedes Well bestimmt. Die Elektroden werden über die Software einmal vor der Aufwärmphase und einmal nach der 30-minütigen Aufwärmphase stabilisiert. Danach werden erneut die Impedanzwerte bestimmt.

Die Zellen werden entsprechend der Protokolle geerntet und gezählt. Es wird eine Zellsuspension mit $9 \cdot 10^5$ Zellen/mL hergestellt und 200 µL ($1,8 \cdot 10^5$ Zellen) dieser Zellsuspension werden zu den bereits vorgewärmten 200 µL Medium gegeben. Dies führt zu einer Zellaussaatdichte von $2,25 \cdot 10^5$ Zellen/cm. Die Arrays werden erneut in das Gerät eingesetzt und vor dem Start der Messung wird die Verbindung überprüft und die initialen Impedanzwerte bestimmt. Um die Adhärenz der Zellen zu dokumentieren, erfolgt eine Messung bei 40 kHz über den kompletten Zeitraum des Experiments.

Nach ca. 24 Stunden haben die Zellen eine vollständige Konfluenz erreicht, d.h. das Impedanzsignal ist über einen längeren Zeitraum (>2 h) konstant. Das Standardkultivierungsmedium (mit 10 % FBS) wird gegen ein Hungermedium (mit 1 % FBS) ausgetauscht und die Messung wird weiter fortgesetzt. Nach weiteren 20-24 Stunden kann mit der Verletzung der Zellen auf den Elektroden begonnen werden. Dazu wird pro Well über 25 Sekunden eine Spannung von 5 V bei 60 kHz angelegt. Nach dem Verwundungsprozess wird pausiert die Messung und das Hungermedium wird gegen frisches Hungermedium ausgetauscht (u.a. auch um die abgelösten Zellen zu entfernen). Anschließend wird die Impedanzmessung bei 40 kHz für weitere zwölf Stunden fortgeführt um den Heilungsprozess zu dokumentieren.

Wird anstatt einer Beschichtung mit *Inclusion Bodies* eine Zugabe von *Inclusion Bodies* nach dem Verwundungsprozess gewählt, wird der Beschichtungsschritt nicht durchgeführt und

stattdessen nach der Verwundung das Hungermedium gegen Hungermedium mit *Inclusion Bodies* in der entsprechenden Konzentration ausgetauscht.

Zudem hat sich bewährt die Arrays nach Start der Messung nicht mehr aus der Messvorrichtung zu entfernen (auch wenn die Messung pausiert), sondern stattdessen Medienwechsel entsprechend direkt am Inkubator durchzuführen. Ein Entfernen der Arrays führt zu einem großen Shift in der Messung und zudem traten nach erneutem Einsetzen der Arrays Probleme bei der Verbindung mit den elektronischen Kontakten des *ECIS* Gerätes auf.

A.2.6.1. Scratch Assay (Wundheilungsassay II)

Zur Durchführung des Scratch Assays werden die Oberflächen einer 24-Well-Platte zunächst mit *Inclusion Bodies* beschichtet. Dazu wird eine Verdünnungsreihe der aufgereinigten *Inclusion Bodies* (A.2.5.1) in einer 0,15 M Natriumchlorid-Lösung hergestellt. Entsprechend der gewünschten Anzahl an Replikaten für jede Verdünnungsstufe werden jeweils 200 μL pro Well verteilt. Die Platte wird für die *Inclusion-Body*-Beschichtung für zwei Stunden bei 4 °C inkubiert.

Die genutzten Zellen werden entsprechend des Protokolls geerntet und ausgezählt (A.2.6.3 und A.2.6.4). Es wird eine Zellsuspension mit $10 \cdot 10^4$ Zellen/mL hergestellt und in jedes Well 100 μL ($1 \cdot 10^4$ Zellen) gegeben ($5,263 \cdot 10^3$ Zellen/ cm^2). Nach ca. 48 Stunden haben die Zellen eine vollständige Konfluenz erreicht. Das verwendete Medium (DMEM + 10 % FBS) wird gegen ein Hungermedium (DMEM + 1 % FBS) ausgetauscht und die Zellen für weitere 24 Stunden in diesem Medium belassen.

Nach Ablauf dieser 24 Stunden werden die Zellen mittig im Well gescratcht. Dazu wird mit einer mittelgroßen Pipettenspitze (max. Volumen: 200 μL) mittig im Well von oben nach unten durch die konfluente Zellschicht gekratzt. Um dabei entstehende Zellaggregate zu entfernen wird das Hungermedium gegen frisches Hungermedium ausgetauscht. Es werden exemplarisch von 2-3 Wells die Ausgangsbedingungen in Form von Mikroskopiebildern dokumentiert. Des Weiteren werden alle Wells auf eventuelle Irregularitäten geprüft. Das nachfolgende Zellwachstum kann mit einem LumaScope 600 Mikroskop für ein Well live exemplarisch dokumentiert werden (A.2.6.4). Nach zehn bis zwölf Stunden wird das Assay

durch Fixierung der Zellen (A.2.6.5) gestoppt. Diese können im Anschluss zur besseren Dokumentation auf Mikroskopiebildern angefärbt werden (A.2.6.5).

A.2.6.2. *Ibidi Cell Culture-Inserts (Wundheilungsassay III)*

Zur Durchführung eines Wundheilungsassays mit *Ibidi Cell Culture-Inserts* wird ein Aliquot der aufgereinigten *Inclusion Bodies* (A.2.5.1) aufgetaut und in 0,15 M Natriumchloridlösung gelöst und entsprechend verdünnt (0,2 µg/mL). 70 µL dieser verdünnten *Inclusion Body* Lösung werden in jedes der beiden Kompartimente eines *Cell Culture-Inserts* gegeben und für zwei bis drei Stunden bei 4 °C inkubiert (finale IB Konzentration: 62,5 ng/cm²).

Die Zellen werden entsprechend des Protokolls geerntet und gezählt (A.2.6.3 und A.2.6.4). Es wird eine Zellsuspension mit 7,5·10⁵ Zellen/mL hergestellt und 70 µL dieser Zellsuspension in jedes der zwei Kompartimente des *Culture-Inserts* gegeben. Dies führt zu einer Zellaussaatdichte von 2,4·10⁵ Zellen/cm. Nach 24 Stunden Zellwachstum wird das Medium von Standardmedium (mit 10 % FBS) in Hungermedium (mit 1 % FBS) gewechselt. Das Zellwachstum wird für weitere 18 Stunden in Hungermedium fortgeführt.

Nach Ablauf dieser Zeit wird das *Culture-Insert* aus Silikon mit einer sterilen Pinzette entfernt und dadurch ein Wundspalt von 500 µm Breite erzeugt. Nach Entfernung des Silikoninserts wird das komplette Well mit Hungermedium gefüllt. Es werden exemplarisch von 2-3 Wells die Ausgangsbedingungen in Form von Mikroskopiebildern dokumentiert. Weiterhin werden alle Wells nach Entfernung der Silikoninserts auf eventuelle Irregularitäten geprüft. Das nachfolgende Zellwachstum kann mit einem LumaScope 600 Mikroskop für ein Well live exemplarisch dokumentiert werden (A.2.6.4). Nach zwölf Stunden wird das Assay durch Fixierung der Zellen gestoppt (A.2.6.5). Diese können im Anschluss zur besseren Dokumentation auf Mikroskopiebildern angefärbt werden (A.2.6.5).

Wird anstatt einer Beschichtung mit *Inclusion Bodies* eine Zugabe von *Inclusion Bodies* nach dem Verwundungsprozess gewählt, wird der Beschichtungsschritt nicht durchgeführt und stattdessen nach der Verwundung das Hungermedium gegen Hungermedium mit *Inclusion Bodies* in der entsprechenden Konzentration ausgetauscht.

A.2.6.3. MRI Wound Healing Tool Macro

Bevor die Bilder mit dem MRI Wound Healing Tool Macro für ImageJ ausgewertet werden, werden die Bilder zunächst in 32-Bit Graustufenbilder umgewandelt. Als Parameter werden die entsprechenden Default Parameter verwendet (Method: Variance, Variance Filter Radius: 10, Threshold: 50, Radius open: 4, Min size: 10.000). Die entsprechenden Größenbestimmungen der Wundfläche in Pixeln werden in Microsoft® Excel und OriginPro® weiter prozessiert und ausgewertet.

A.2.6.4. Aufnahmen mit dem LumaScope 600 Mikroskop

Mit dem LumaScope 600 Mikroskop werden in einem bestimmten Zeitintervall Aufnahmen der Zellen im Inkubator gemacht. Diese können anschließend zu einem Zeitrafferfilm zusammengefasst werden. Zusätzlich ermöglicht die Live-Aufnahme-Funktion des Mikroskops auch, die Zellen zu beobachten (auch mittels verschiedener Remote-Software) ohne diese aus dem Inkubator zu nehmen. Somit ist ebenfalls sichergestellt, dass die Zellen unter kontinuierlichen Bedingungen kultiviert werden können.

A.3. Ergänzende Daten

Original ALOXe3 DNA-Sequenz (NP_067641):

ATGGCAGTGTACCGCCTGTGTGTGACCCTGGTCCCTACCTGAGGGCCGGCACACTGGACAACATCTCTGTACAC
 TGGTGGGCACGTGTGGTGAAGCCCAAGCAGCGGCTAGATCGAATGGGCAGGGACTTCGCCCTGGATCGGTACA
 GAAGTACAAGGTGCGTTGCACAGCGGAGCTGGGTGAGCTCTTGCTGCTGCGTGTACACAAGGAGCGCTACGCTTTC
 TTCCGCAAGGACTCTTGGTACTGTAGCCGCATCTGTGTACCGAACCGGATGGTAGTGTATCCCACTTCCCCTGCTA
 TCAGTGGATTGAAGGCTACTGCACCGTGGAGCTGAGGCCAGGAACAGCAAGAAGTATTTGTACAGGACTCTCTTCCC
 CTCTCTGGATCACAGGACACGGGAGCTCCGGGCCGACAAGAATGCTACCGCTGGAAGATCTATGCCCTGGCT
 TCCCCTGCATGGTAGACGTCAACAGCTTTCAGGAGATGGAGTCAGACAAGAAATTTGCCCTTGACAAAGACGACAAC
 TTGTGTAGACCAGGGTGACAGCAGTGGGAATCGGTACCTGCCCCGCTTCCCATGAAAATTGACATCCCATCCCTG
 ATGTACATGGAGCCCAATGTTTCGATACTCAGCCACCAAGACGATCTCGCTGCTCTTCAATGCCATCCCTGCGTCTT
 GGGATGAAGCTTCGAGGGCTGTGGATCGCAAGGGCTCCTGGAAGAAGCTGGATGACATGCAGAACATCTTCTG
 TGCCATAAGACCTTCACGACAAAGTATGTACAGACTGGTGTGAAGATCACTTCTTTGGGTACCAGTACCTGA
 ATGGTGTCAATCCCGTCACTGCTCCACTGCATCTTAGCTTGCCAGCAAGCTGCCTGTCAACAATGACATGGTGGCC
 CCCTTGCTGGGACAGGACACATGCCTGCAGACAGAGCTAGAGAGGGGGAACATCTTCTAGCGGACTACTGGATCC
 TGGCGGAGGCCCCACCCACTGCCTAAACGGCCGCCAGCAGTACGTGGCCGCCCCACTGTGCTGCTGTGGCTCAG
 CCCCCAGGGGGCGTGGTGCCTTGGCCATCCAGCTCAGCCAGACCCCCGGGCTGACAGCCCCATCTTCTGCC
 ACTGACTCCGAATGGGACTGGCTGCTGGCCAAGACGTGGGTGCGCAACTCTGAGTTCTGGTGCACGAAAAACA
 CGCACTTTCTGTGCACGCATTTGCTGTGCGAGGCCTTCGCCATGGCCACGCTGCGCCAGCTGCCGCTCTGCCACCC
 ATCTACAAGCTCCTACTCCCCACACTCGATACAGCTGCAGTGAACACCATCGCGAGGGCCACGCTGCTCAACC
 CCGAGGGCCTCGTGGACAGTCCACTGCCATCTAGCTTGCCAGCAAGCTCATCTACCTCATGACACGGGCTGGCCCA
 CTTACCTACACCAATTTCTGCCTTCCGGACAGCCTGCGGGCCCGGGCTCCTGGCTATCCCCAACTACCACTACC
 GAGACGACGGCCTGAAGATCTGGGCGGCCATTGAGAGCTTTGTCTCAGAAATCGTGGGCTACTATTATCCCAGTGA
 CGCATCTGTGCAGCAGGATTCGGAGCTGCAGGCCTGGACTGGCGAGATTTTGGCTCAGGCGTTCCTGGGCGGGAA
 AGCTCAGGTTTCCCAAGCCGGCTGTGCACCCAGGAGAGATGGTGAAGTTTCTCACTGCAATCATCTTCAATTGCTC
 TGCCAGCAGCTGTGTCAACAGTGGGCAGCATGACTTTGGGGCTGGATGCCCAATGCTCCATCATCCATGAGG
 CAGCCCCACCCAGACCAAGGGGACCACCCTGAAGACTTACCTAGACACCCTCCCTGAAGTGAACATCAGCT
 GTAACAACCTCCTCTCTTCTGGTTGGTTAGCCAAGAACCAAGGACCAGAGGCCCTGGGCACCTACCCAGATGA
 GCACTTACAGAGGAGGCCCGAGGCGGAGCATCGCCGCTTCCAGAGCCGCTGGCCAGATCTCAAGGGACATC
 CAGGAGCGGAACCAGGGTCTGGCACTGCCCTACACCTACCTGGACCCTCCCCTCATTGAGAACAGCGTCTCCATCT
 AA

Optimierter ALOXe3 DNA-Sequenz mit His-Tag, TEV-Proteasen Erkennungssequenz, Spacern, NcoI und XhoI Restriktionsschnittstelle:

ATGGGCAGCAGCCATCACCATCACCATCACGATTACGATATCCCGACGACCGAGAATCTGTATTTTCAGGGCGCAG
 TTTACCGCCTGTGTGTGACGACCGGCCCGTATCTGCGTGTGGCACCCCTGGACAACATTAGCGTGACCCGTTGGC
 ACCTGCGGCGAATCGCCGAAACAGCGTCTGGATCGCATGGGCCGTGACTTCGCTCCGGGTAGCGTCCAAAAATA
 AAGTGGTTGTACCGCAGAAGTGGGTGAAGTGTCTGCTGCGCGTGCACAAAGAACGTTACGCTTTTTCCGCAA
 AGATAGTTGGTATTGCTCCCGCATTGTGTGACGGAACCGGACGGCAGTGTTCCTTTCCGTTGCTACCAGTGGAA
 TTGAAGGCTATTGTACCGTTGAACTGCGTCCGGGTACCGCACGTACGATCTGCCAGGATTCTCTGCCGCTGTGCTG
 GACCACCGTACCCGCGAATCGGTGCACGCCAGGAATGCTACCGTTGGAAAATTTATGCACCGGGCTTCCGTTGA
 TGGTGGATGTTAACTCATTCCAGGAAATGGAATCGGACAAAAAATTTGCCCTGACCAAAACACGACCTGTGTTGA
 TCAGGGCGACAGCTCTGGTAATCGTTATCTGCCGGGTTTCCCGATGAAAATTGATATCCCGAGTCTGATGTACATGG
 AACCGAACGTCGCTATAGCGCGACCAAAACGATTTCTGCTGTTAATGCCATCCCGGCATCTCTGGGCATGAA
 ACTGCGTGGTCTGCTGGATCGCAAAGGCAGTTGGAAAAAAAGTGGATGACATGCAGAACATCTTTGGGTGCCAAAA
 ACCTTACGACCAAAATATGTGACGGAACATTGGTGTGAAGATCACTTTTTCCGGCTACCAGTATCTGAACGGTGTCA
 ATCCGGTGTGCTGCATTGCATCAGTTCCCTGCCGTCCAAACTGCCGGTTACCAATGATATGGTCGCACCGCTGCTG
 GGTACGACACCTGTCTGCAAACGGAACGGAACGTGGTAACATTTTCTGGCGGATTACTGGATCCTGGCGGAAG
 CCCCAGCCATTGCTGAATGGTCCGACGAATATGTGGCAGCACCCTGTGTCTGCTGTGGCTGAGCCCGCAGGG
 TGCTCTGGTTCCGCTGGCGATTACGCTGTGCAAACCCCGGTCGGATAGCCCGATCTTCTGCCGACGGATTCCG
 AATGGGACTGGTGTGCCCCAAAACCTGGTCCGTAACCTAGAATTCCTGGTGCATGAAAACAATACCCACTTTCT
 GTGACGCATCTGCTGTGTGAAGCATTGTGCTATGGCGACCCCTGCGTCAGCTGCCGCTGTGCCACCCGATTACAAA
 TGCTGCTGCCGATACCCGTTATACGCTGCAGGTTAACACCATCGCCCGCAACGCTGCTGAATCCGGAAGGCCCT
 GGTGATCAGGTCAGTCCATCGGCCGTCAAGGTCTGATCTACCTGATGTCAACCGGTCTGGCGCACTTTACCTATA
 CGAACTTCTGTCTGCCGACAGCCTGCGTGGCCGCGGCGTGTGGCAATTCCGAATTACCAATTATCGCGATGACGGT
 CTGAAAATTTGGGCAGCTATCGAATCATTTGTGTGCGAAATCGTTGGCTATTACTATCCGAGCGATGCTTCTGTTCA
 GCAAGACTCTGAACTGCAGGCGTGGACCGGTGAAATTTTTGTCTCAAGCGTTCCTGGGCCGTGAATCATCGGGTTTCC
 CGAGTCGCTGTGACCCCGGCGAAATGGTCAAATTTCTGACGGCCATTATCTTCAACTGTTCTGCACAGCAGCGG
 GCCGTGAATAGTGCCAAACATGATTTTGGTGTCTGGATGCCGAACGCACCGAGCTCTATGCGTCAGCCGCGCCG
 AAACCAAGGGTACGACCACGCTGAAAACCTACCTGGATACGCTGCCGGAAGTTAATATTTCTGTCACCAATCTGCT
 GCTGTTTTGGCTGGTCAGCCAGGAACCGAAAGATCAACGTCGCTGGGCACCTATCCGGACGAACATTTACGGAA

GAAGCGCCGCTCGCAGTATCGCAGCTTTTCAGTCCC GCCTGGCCCAAATTTACGTGATATCCAGGAACGCAATC
AAGGTCTGGCTCTGCCGTACACCTATCTGGACCCGCCGCTGATTGAAAACCTCTGTTAGTATTGA

Original AmbLOXe DNA-Sequenz (ACF33515):

ATGGTGGATGAGTACCGCATCAAAGAGGACCGTGATCTGGGGGAAATCCTGCTCATCCGTCTCCACAAGGGGCCCT
TCTCCATCTTCCCAGAGGACAACCTGGTACTGCATGTATGTAAGTGTGACGTCCTCCCTGGCGGAGTGATCTACCACTTC
CCCTGTTACCGCTGGATCGAAGGCTACCCAACAGTGGAGCTCGCAGAAGGGACAGCTATGCTGAGTTCTGCAAGCA
ATCTTCACGTGACACTAAAAAACAGCGAGAGAGTGATCTGGAACAGAGAAGAAAGGTCTACAGGTGGAAAAGTCT
ACCACCCAGTTTTCCCAAGTGCATTGATGTGGCCAACAACGATGAGCTGGACAAAAGACGCCAAGTACTCCATCAC
GAAAACAGTCCACTTTGTTATCAACAAGAATGTTTCAAACATCGCATGATAAACTGAAAGGCTTTGACGGACGACAG
GAATCCTGGAAATCCTTTGATGAACTCAAGAGGGTTTATTGGACCCTAAAAACTGCGAAATCAGAGTATGTCTCTC
ACCACTGGAAAAGAAGATGCATTTTTTTGGGTACCAGTACCTGAATGGCCCTGACCCACACTGATCAAGAGGTGTAA
CAAAATCTCGCAACTTCCCAGTACAGATGAGATGGTGTCTACAGTCTGGGAGCTTCGACAAGCCTTGAGAAG
GAGCTGCAGAAAGGAAACATTTACATTTGTGGATCACAAAGATGATGGAAGGACTTCGTGCAAATGTGCTAAATGGCA
AGCAGCAGTACATGGCTGCTCCTTTGTGTCTTCTACCGCACACCTAAGGATGAGGTTATCCCATTGGCTATCCAG
TTAAATCAGACTCCGGTTCAGAGACTCCCCTTCTCCGCAAGCACAATGAGTGGGATTGGATACTCGCTAAGA
TTTGGGTACGGTACCTTTGCTTCCACCCTGCTGCTACTTCTGCGGACGCACGCTTTTGGCAGAGTGT
TTTGTCTGGCCACCTTGCAGCAGCTACCAATGGCTACCCACTATAACAAGCTTCTGGTTCCCCACCTACGCTACT
TTACAGATCAATGTGCTTGGCAGAGAGCGTCTAATTGGACCGGGAGGAGCCTTCGATAAAGAACCAGCAGTTGGAA
TCGCCGATTGCTGAACTGATAAAGAGAGACATGGAAACTCTGAAATACTCTACTCTCTGTTTGCCTGAAAATCTC
CAGTCCCCTGAGGTGCGAGTGCCTCATTTTTACTACCGAGATGATGGAATGAAAATTTGGTTGGCCATCGAGA
GTTATGTGTCAGGCATTGTTGACTATTACTATAAGAGTGAGGAGAGCATCCAGAAGGACCCTGAGCTGCAGGCCTG
GGTGGCCGAGATCTTCAAAGAAGGTTTCTTGGAGAGAAAACTCTCAGGCATCCCTTCTTCTGAGACCCCGCTG
GAGCTCATTAAGTATCTGACCATGGTGATCTTACATGCTCAGCCGAGCATGCTGTGCAACAGTGGGCAGTTTGA
TTTTCTCTCCTGGATGCCAACGGTCCCAGCACAATGCGACAGCCTCCTCCCAAGACCAAGGGCTTGGCAACAATG
GAAAGCGTCTGGAAGCCCTACCTGAGGTGGGCATCACCAACAATAATGACGACTGTCTGGACCCTGAGTAAAG
AGCCTGGGGACATGAGACCTCTGGGCACCTACCCTGATGAACATTTACGGAGGAGGGACCCAAACAGTGCATCCG
GGCATTCCAGGAACGCTGTCTGAGATATCCAGAGAGATTGAGCACAGAAAACGCATCCCTACCCATCAAGTACAAC
TACATGAACCCCAAAGTGATAGAGAACAGTGTGTCATATAA

Optimierter AmbLOXe DNA-Sequenz mit His-Tag, TEV-Proteasen Erkennungssequenz, Spacern, NcoI und XhoI Restriktionsschnittstelle:

ATGGGCAGCAGCCATCACCATCACCATCACGATTACGATATCCCGACGACCGAGAATCTGTATTTTCAGGGCGTTG
ACGAATACCGCATTAAAGAAGACCGTGACCTGGGTGAAATCCTGCTGATCCGCTGCACAAAGGCCCGTTTTCCAT
TTTTCCGGAAGATAACTGGTACTGCATGTATGTGACCGTTACGAGCCCGGGCGGTGTGATTTACCACTTCCCGTGT
ATCGTTGGATCGAAGGCTACCCGACCGTTGAACTGGCGGAGGGTACGGCCATGCTGAGCTCTGCGTCAATCTGCA
CGTGACCCTGAAAAACAGCGTAAAGCGATCTGGAACAACGTCGCAAAGTCTACCGCTGGAAAGTGTATCATCC
GTCTTTCCGAAATGCATTGATGTGCGAAACAATGACGAACTGGATAAAGACGCTAAATACTCTATCACCAAAACG
GTCCATTTTCGTGATCAACAAAAACGTTAGTAACATCGCCATCAAACCTGAAAGGCTTTGATGGTTCGTCAGGAAAGCT
GAAATCTTTGACGAACTGAAACCGGTCTACTGGACCCTGAAACCGGCGAAAAGTGAATATGTGCCATCACTG
GAAAGAAGATGCCTTTTTCCGCTACCAGTATCTGAACGGTCCGGACCCGACCCTGATTAACGTTGCAACAAAAATC
CCGGGCAATTTTTCCGTTACCGATGAAATGGTCAGTACTCTTGGGCGCAAGTACGTCCTGGAAAAAGAAGTGC
AGAAGGGTAACATCTACATCGTTGATCATAAAATGATGGAAGGCCTGCGTGCTAACGTCCTGAATGGTAAACAGCA
ATACATGGCGGCCCGCTGTGTCTGTTTTATCGCACCCCGAAAGATGAAGTATTCCGCTGGCCATCCAGCTGAACC
AAACCCCGGTTCCGAAACGCCGCTGTTCCTGCCGTACGATAATGAATGGGACTGGATTCTGGCAAAAATCTGGGT
TCGCTCAACCTCGTTTGCATTCCATCAGGCTGTCAGCCACTTCTGCGTACCCATGTTTTTGGCGAAGTCTTCTGCCT
GGCCACCCTGCGTCAGTGCAGTGGCGCACCCGCTGTACAAACTGCTGGTGGCCGATCTGCGTTATACCCTGCAA
ATTAACGTTCTGGCCCGTGAACGCTGATTGGTCCGGGCGGTGCAATTTGATAAAAATACGGCTGTGGGCATTGCGG
GTATCGCCGAACTGATTAACCGCAGATGGAAACCTGAAATACAGTACGCTGTGTCTGCCGAAAAATCTGCAGTC
ACGTGAAGTTGAATCGCTGCCGCACTTCTATTACCGCGATGACGGCATGAAAATTTGGCTGGCGATCGAAAGTTAT
GTGTCCGGTATCGTTGATTACTACTACAAATCAGAAGAATCGATCCAGAAAGACCCGGAAGTCAAGCATGGGTGG
CTGAAATTTTTAAAGAAGGCTTCCCTGGAACGTA AAAAGTTCCGGTATCCCGTCATCGCTGGAACCCCGCTCGAACT
GATTAATATCTGACGATGGTGTATCTTTACGTGCAGCGCGGAACATGCAGCTGTAAACAGCGGCCAGTTTGAATTTCC
TGTCTTGGATGCCGAATGGTCCGAGTACCATGCGTCAGCCGCCCGGAAAAACCAAGGCTGGCGACGATGGAATC
CGTGTGGAAGCCCTGCCGGAAGTTGGTATTACCACGAACATCATGACCACGGTGTGGACCCTGTCAAAGAAGCCG
GGCGATATGCGCCCGCTGGGTACCTATCCGGACGAACACTTTACGGAAGAAGGTCCGAAACAGTGTATTCTGTGCAT
TCCAAGAACGCTGAGCGAAATTTCTCGTGAATCGAACATCGCAATGCTAGCCTGCCGATTAAATACAACATACAT
GAACCCGAAAGTATTGAAAACAGCGTGAGCATCTGA

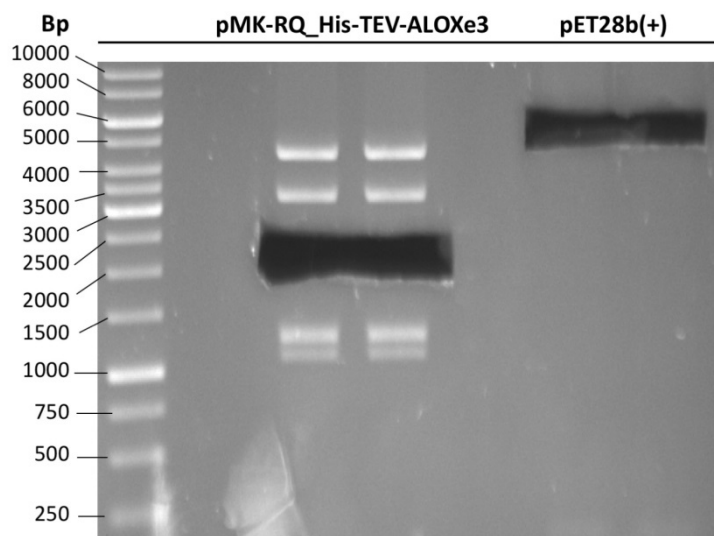


Abbildung A.2: Agarosegel der elektrophoretischen Auftrennung der mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *XhoI* geschnittenen Plasmide pMK-RQ_His-TEV-ALOXe3 und pET28b(+); die Abschnitte mit His-TEV-ALOXe3 (2210 bp) und dem pET28b(+) Plasmidrückgrat (5231 bp) sind bereits für die weitere Verarbeitung aus dem Gel herausgetrennt

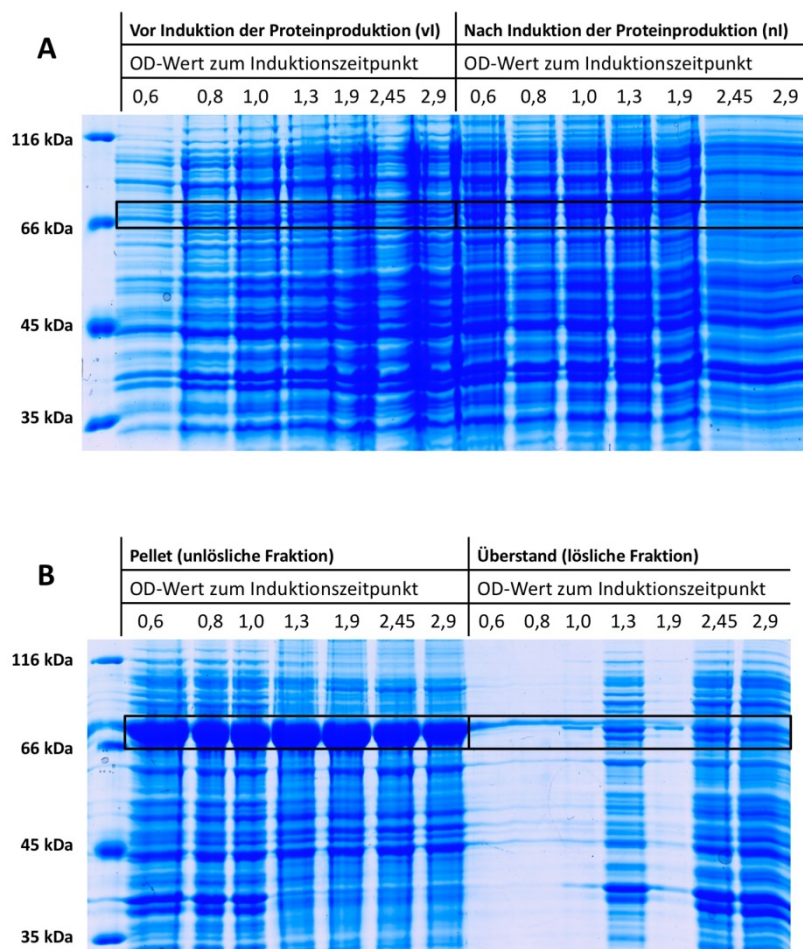


Abbildung A.3: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; heterologe Expression von ALOXe3 in LB-Medium; die Induktion erfolgte bei unterschiedlichen OD_{600} Werten; Probennahme 24 Stunden nach Induktion (Proben normiert); aufgetragen sind jeweils: (A) die Fraktionen direkt vor Induktion (vI), 24 Stunden nach Induktion (nI) (Zellen aufgeschlossen), sowie (B) die Pellet- (P) und Überstandfraktion (ÜS) nach Zellaufschluss

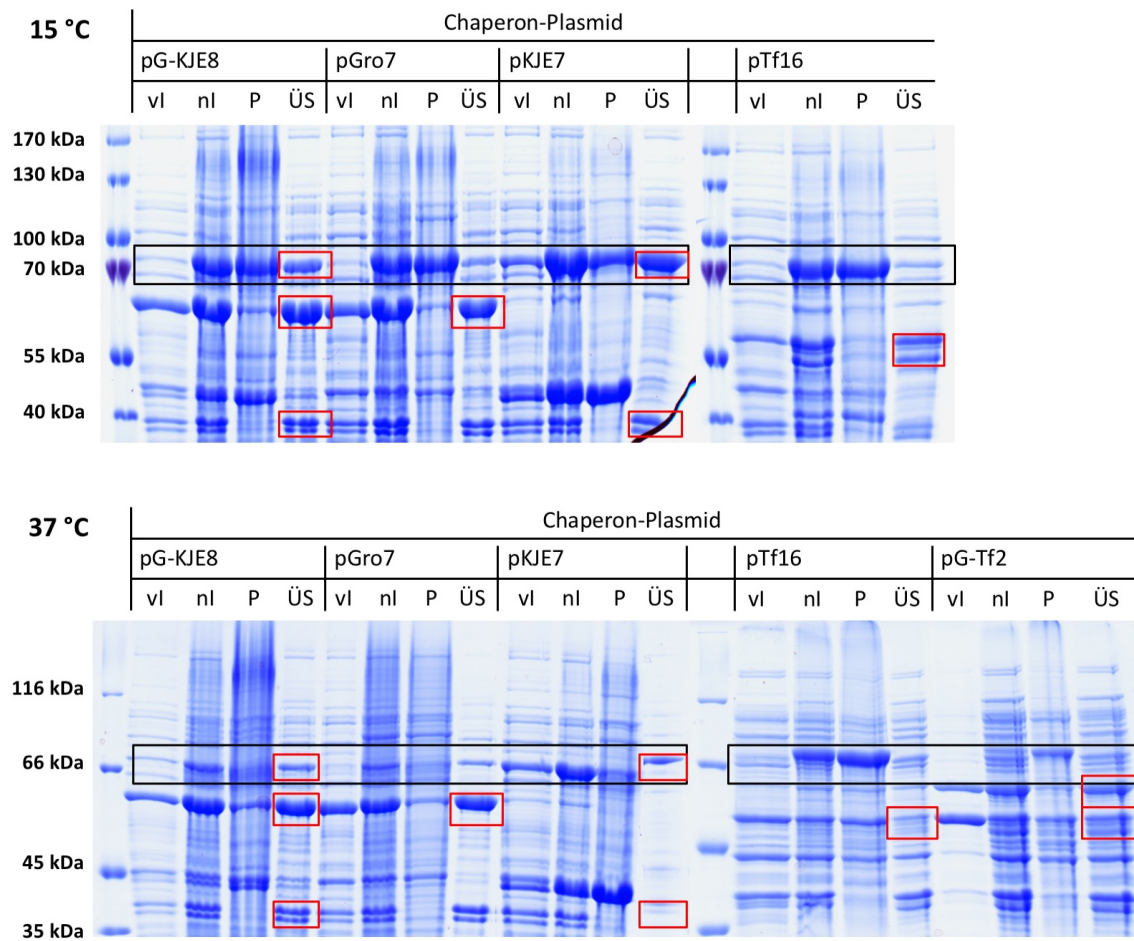


Abbildung A.4: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Coexpression von ALOXe3 (schwarz markiert) und unterschiedlichen Chaperon-Kombinationen (rot markiert) bei 15 und 37 °C; aufgetragen sind jeweils die Fraktionen direkt vor Induktion (vl), 20 Stunden nach Induktion (nl) (Zellen aufgeschlossen), sowie die Pellet- (P) und Überstandfraktion (ÜS) nach Zellaufschluss

Tabelle A.21: Übersicht über die zum Zellaufschluss der Proben (Coexpression von ALOXe3 mit pKJE7) genutzten Puffer und die genaue Zusammensetzung der Puffer

Aufschlusspuffer	Zusammensetzung	
Puffer 1	Tris HCl, pH 7,5 Natriumchlorid DTT	50 mM 100 mM 1 mM
Puffer 2	Tris HCl, pH 7,5 Natriumchlorid Glycerin	50 mM 100 mM 5 %
Puffer 3	MOPS, pH 7,5 Magnesiumchlorid DTT Glycerin	50 mM 10 mM 1 mM 10 mL/L
Puffer 4	Tris HCl, pH 8,0 Natriumchlorid Magnesiumchlorid	50 mM 500 mM 5 mM
Puffer 5	Tris HCl, pH 7,5 Natriumchlorid Triton X-100	20 mM 50 mM 0,2 %
Puffer 6 (BugBuster)	Nicht-ionische Detergenzien Genauere Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben	

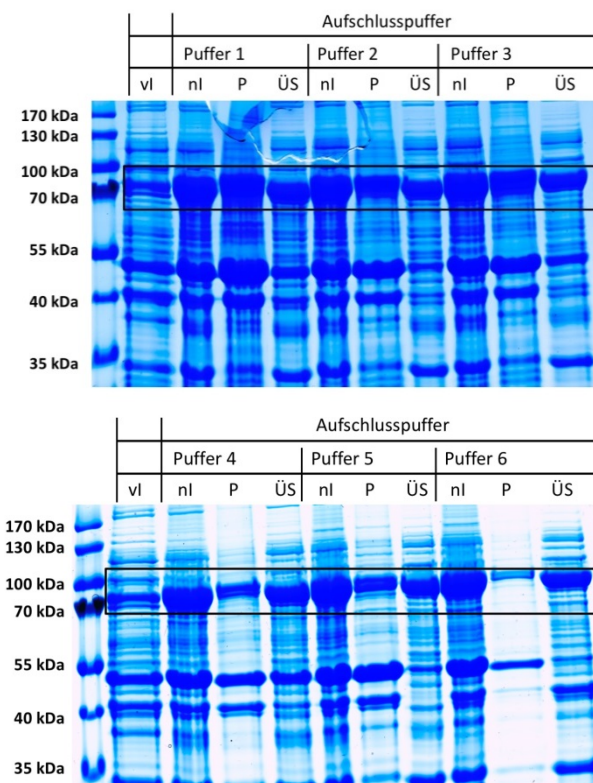


Abbildung A.5: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Zellaufschluss der Proben der Coexpression von ALOXe3 mit pKJE7; zum Aufschluss wurden sechs unterschiedliche Puffer getestet; aufgetragen sind jeweils die Proben direkt vor Induktion (vl), 20 Stunden nach Induktion (nl) (Zellen aufgeschlossen), sowie die Pellet- (P) und Überstandfraktion (ÜS) nach Zellaufschluss

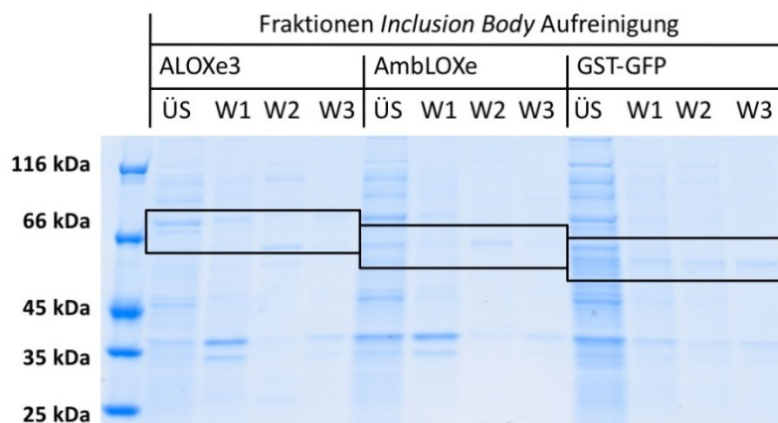


Abbildung A.6: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Produktion und Aufreinigung von *Inclusion Bodies*; aufgetragen sind jeweils der Überstand der Kulturbrühe nach Einsatz von Lysozym, Detergenzien und DNase (ÜS); Fraktion nach Waschschrift mit Lysispuffer (W1), nach Waschschrift mit PBS (W2) und nach Waschschrift mit endotoxin-freiem Wasser

B. VERZEICHNISSE

B.1. Abkürzungsverzeichnis

<i>IBs</i>	<i>Inclusion Bodies</i> , Proteinaggregate
<i>AEC</i>	<i>Apical Epithelial Cap</i>
<i>ALOXe3</i>	menschliche epidermale Lipoxygenase 3
<i>AmbLOXe</i>	<i>Axolotl homologue of epidermis-type amphibian epidermal lipoxygenase</i>
<i>APS</i>	Ammoniumperoxidsulfat
<i>BSA</i>	Bovines Serumalbumin
<i>DF</i>	Durchfluss
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<i>DMSO</i>	Dimethylsulfoxid
<i>DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure
<i>DNase</i>	Desoxyribonuklease
<i>DTT</i>	Dithiothreitol
<i>E</i>	Elutionsfraktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ECIS</i>	<i>Electric Cell-Substrate Impedance Sensing</i>
<i>EDTA</i>	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EZM</i>	extrazelluläre Matrix
<i>FBS</i>	Fötale Bovines Serum
<i>FGF-2</i>	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
<i>GFP</i>	grün fluoreszierendes Protein
<i>GST</i>	Glutathion-S-Transferase
<i>HRP</i>	<i>Horseradish Peroxidase</i>
<i>IGF</i>	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
<i>IPTG</i>	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
<i>LB</i>	Lysogeny broth
<i>LC/MS</i>	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
<i>LOX</i>	Lipoxygenase
<i>MES</i>	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
<i>MOPS</i>	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
<i>nI</i>	nach Induktion

Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
P	Pellet
PLAT	Polycystein-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TB	Terrific broth
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
Tf	Triggerfaktor
<i>TGF-β</i>	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TSA	<i>Thermal Shift Assay</i>
U	Elutionsfraktion mit Urea
ÜS	Überstand
vI	vor Induktion
W	Waschfraktion
WE	Wundepithel

B.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Wundheilung.....	6
Abbildung 2.2: <i>Ambystoma mexicanum</i> in der Laborhaltung.....	9
Abbildung 2.3: Regeneration einer Gliedmaße beim Axolotl.....	12
Abbildung 2.4: Von Lipoxygenasen katalysierte Oxidation von Acylceramind.....	15
Abbildung 2.5: <i>Scratch Assay</i>	18
Abbildung 2.6: Weitere mechanische Verwundungsmethoden.....	18
Abbildung 2.7: <i>Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)</i>	20
Abbildung 2.8: <i>Culture-Insert</i> Wundheilungssassay.....	21
Abbildung 2.9: <i>Inclusion Body</i> Bildung.....	23
Abbildung 3.1: T-Coffee-Alignment der Proteinsequenzen der Lipoxygenasen AmbLOXe (ACF33515), ALOXe3 (NP_067641), 15-LOX (NP_001131) und 12-LOX (NP_000688).....	26
Abbildung 3.2: Screenshot des „Codon Optimizer“ VBA Tools zum Austausch der codierenden Triplets.....	28
Abbildung 3.3: Dreidimensionale Struktur einer Retikulozyten 15S-Lipoxygenase (PDB ID: 2P0M)..	29
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der designten Gensequenzen.....	30
Abbildung 3.5: Agarosegel der elektrophoretischen Auftrennung der mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI geschnittenen Plasmide pMK-RQ_His-TEV-AmbLOXe und pET28b(+).....	31
Abbildung 3.6: Vektorkarten der hergestellten Plasmide pET28_His-TEV-ALOXe3 und pET28_His-TEV-AmbLOXe.....	32
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung des Experiments zur Ermittlung des Einflusses der Expressionstemperatur.....	35
Abbildung 3.8: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; heterologe Expression von AmbLOXe in LB-Medium; nach Induktion wurde die Expression des Proteins bei unterschiedlichen Temperaturen fortgeführt.....	36
Abbildung 3.9: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung und Western Blot; heterologe Expression von AmbLOXe in LB-Medium; nach Induktion wurde die Expression des Proteins bei unterschiedlichen Temperaturen fortgeführt.....	37
Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des Experiments zur Ermittlung des Einflusses des Mediums und des Induktionszeitpunktes.....	38

Abbildung 3.11: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; heterologe Expression von ALOXe3 in TB-Medium; die Induktion erfolgte bei unterschiedlichen OD ₆₀₀ -Werten	39
Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Experiments zur Ermittlung des Einflusses der Induktorkonzentration	41
Abbildung 3.13: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; heterologe Expression von ALOXe3 in TB-Medium; die Induktion erfolgte mit unterschiedlichen Induktorkonzentrationen.....	41
Abbildung 3.14: Modell für die Chaperon-unterstützte Faltung <i>in E. coli</i>	44
Abbildung 3.15: Schematische Darstellung des Experiments zur Coexpression von Chaperonen.....	45
Abbildung 3.16: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Coexpression von ALOXe3 und unterschiedlichen Chaperon-Kombinationen bei 20, 25 und 30 °C	46
Abbildung 3.17: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Aufreinigung der Proben der Coexpression von ALOXe3 mit pKJE7 über Ni-NTA Spin Columns.....	49
Abbildung 3.18: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Aufreinigung der Proben des heterolog exprimierten AmbLOXe Proteins über Ni-NTA Spin Columns	49
Abbildung 3.19: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Aufreinigung der Proben des heterolog exprimierten (3 h, 30 °C) AmbLOXe Proteins über Ni-NTA Spin Columns	51
Abbildung 3.20: Western Blot der Aufreinigung der Proben des heterolog exprimierten (3 h, 30 °C) AmbLOXe Proteins über Ni-NTA Spin Columns.....	51
Abbildung 3.21: Fließdiagramm der einzelnen Schritte zur Produktion, Isolation und Aufreinigung von <i>Inclusion Bodies</i>	55
Abbildung 3.22: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Produktion von <i>Inclusion Bodies</i> und densitometrische Konzentrationsbestimmung	56
Abbildung 3.23: Schematische Darstellung der Solubilisierungs- und Rückfaltungsprotokolle mittels schrittweiser Dialyse und mittels der Verdünnungsmethode in Kombination mit Dialyse	59
Abbildung 3.24: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; densitometrische Konzentrationsbestimmung der löslichen Proteinen (ALOXe3 und AmbLOXe) nach Solubilisierung und Rückfaltung (schrittweise Dialyse)	60
Abbildung 3.25: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; densitometrische Konzentrationsbestimmung der löslichen Proteine (ALOXe3 und AmbLOXe) nach Solubilisierung und Rückfaltung (Verdünnungsmethode und Dialyse).....	61
Abbildung 3.26: Thermal Shift Assay für die Rückfaltung mittels Dialyse (A) und für die Rückfaltungskombination aus Verdünnungsmethode und Dialyse (B).....	63

Abbildung 3.27: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; densitometrische Konzentrationsbestimmung der löslichen Proteine (AmbLOXe, ALOXe3 und GST-GFP) nicht-denaturierender Solubilisierung mit N-Lauroylsacrosin.....	66
Abbildung 3.28: Lipoxygenase Assay der Extraktion mit N-Lauroylsacrosin; Gesamtfractionen (<i>IBs</i> gesamt) und mittels N-Lauroylsacrosin extrahiertes Proteine (Extrakt.).....	67
Abbildung 3.29: Übersicht über den allgemeinen Ablauf von Wundheilungsassays und Beispiele für die in dieser Arbeit genutzten Methoden	69
Abbildung 3.30: Beispiele für die Erfassung der Wundränder mit dem <i>MRI Wound Healing Tool Macro</i> in ImageJ.....	70
Abbildung 3.31: 8W2LE PET <i>ECIS</i> Array mit einer linearen Messelektrode.....	72
Abbildung 3.32: <i>ECIS</i> Assay mit <i>Inclusion Bodies</i> ; Beschichtung der Zellkulturoberfläche mit <i>IBs</i>	74
Abbildung 3.33: <i>ECIS</i> Assay mit <i>Inclusion Bodies</i> ; Zugabe von <i>IBs</i>	75
Abbildung 3.34: <i>Scratch Assay</i> mit <i>Inclusion Bodies</i>	78
Abbildung 3.35: QR Code (YouTube) mit Videos zum Wachstum von HaCaT Zellen und zum Heilungsprozess nach der Entfernung eines <i>Culture-Inserts</i>	80
Abbildung 3.36: Vergleich der Wundränder nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten von HaCaT Keratinocyten	81
Abbildung 3.37: Bestimmung der Wundgröße mit dem <i>MRI Wound Healing Tool Macro</i> für ImageJ..	81
Abbildung 3.38: <i>Culture-Insert</i> Assay mit <i>Inclusion Bodies</i>	83
Abbildung A.1: Proteinmarker Pierce™ Unstained Protein MW Marker, Proteinmarker PageRuler™ Unstained Protein Ladder und PageRuler™ Prestained Protein Ladder.....	111
Abbildung A.2: Agarosegel der elektrophoretischen Auftrennung der mit den Restriktionsenzymen NcoI und XhoI geschnittenen Plasmide pMK-RQ_His-TEV-ALOXe3 und pET28b(+)	128
Abbildung A.3: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; heterologe Expression von ALOXe3 in LB-Medium	129
Abbildung A.4: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Coexpression von ALOXe3 und unterschiedlichen Chaperon-Kombinationen bei 15 und 37 °C.....	130
Abbildung A.5: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Zellaufschluss der Proben der Coexpression von ALOXe3 mit pKJE7s	132
Abbildung A.6: SDS-PAGE mit Coomassiefärbung; Produktion und Aufreinigung von <i>Inclusion Bodies</i>	133

B.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Übersicht der Kultivierungsparameter und ihr erwarteter Einfluss auf die heterologe Proteinproduktion	34
Tabelle 3.2: Übersicht über die auf den Plasmiden enthaltenen Gene für die unterschiedlichen Chaperone sowie Angabe über deren Größe in kDa	43
Tabelle 3.3: Ergebnisse der densitometrischen Konzentrationsbestimmung bei Nutzung von schrittweiser Dialyse zur Rückfaltung	60
Tabelle 3.4: Ergebnisse der densitometrischen Konzentrationsbestimmung bei Nutzung von Verdünnungsmethode und Dialyse zur Rückfaltung.....	61
Tabelle A.1: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	89
Tabelle A.2: Auflistung der verwendeten Laborgeräte.....	91
Tabelle A.3: Auflistung der verwendeten Chemikalien	92
Tabelle A.4: Auflistung der verwendeten Antibiotika.....	94
Tabelle A.5: Auflistung der verwendeten Reagenzien.....	95
Tabelle A.6: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	95
Tabelle A.7: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Medien.....	98
Tabelle A.8: Auflistung der verwendeten Zellen	99
Tabelle A.9: Auflistung der verwendeten und hergestellten Plasmide.....	99
Tabelle A.10: Auflistung der hergestellten Stämme (Glycerin-Gefrierkulturen)	100
Tabelle A.11: Auflistung der verwendeten Primer	100
Tabelle A.12: Auflistung der verwendeten Enzyme und Antikörper.....	100
Tabelle A.13: Auflistung der verwendeten Reaktionskits.....	101
Tabelle A.14: Auflistung der für die experimentellen Arbeiten verwendeten Software	101
Tabelle A.15: Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes mit <i>FastDigest</i> Enzymen.....	105
Tabelle A.16: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes mit T4 DNA Ligase.....	105
Tabelle A.17: Zusammensetzung eines 12 %igen SDS-Trenngels	110
Tabelle A.18: Zusammensetzung eines 8 %igen SDS-Sammelgels.....	110

Tabelle A.19: Übersicht der eingesetzten Puffer für die Solubilisierung und Rückfaltung mittels einer dreistufigen Dialyse	117
Tabelle A.20: Übersicht der eingesetzten Puffer für die Solubilisierung und Rückfaltung mittels Verdünnungsmethode/Dialyse.....	118
Tabelle A.21: Übersicht über die zum Zellaufschluss der Proben (Coexpression von ALOXe3 mit pKJE7) genutzten Puffer und die genaue Zusammensetzung der Puffer	131

B.4. Literaturverzeichnis

1. Gould L *et al.* 2015 Chronic Wound Repair and Healing in Older Adults: Current Status and Future Research. *J. Am. Geriatr. Soc.* **63**, 427–438. (doi:10.1111/jgs.13332)
2. Stuppardt R. 2015 Moderne Wundversorgung wird Gesamtkosten verringern. *Welt Krankenversicher.* **4**, 15–20.
3. Kujath P, Michelsen A. 2008 Wunden - von der Physiologie zum Verband. *Dtsch Arztebl Int.* **105**, 239–48. (doi:10.3238/arztebl.2008.0239)
4. Barrientos S, Brem H, Stojadinovic O, Tomic-Canic M. 2014 Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* **22**, 569–578. (doi:10.1111/wrr.12205)
5. Boateng J, Catanzano O. 2015 Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing-A Review. *J. Pharm. Sci.* **104**, 3653–3680. (doi:10.1002/jps.24610)
6. Menger B, Allmeling C, Radtke C, Kuhbier JW, Reimers K. 2011 AmbLOXe—An Epidermal Lipoxygenase of the Mexican Axolotl in the Context of Amphibian Regeneration and Its Impact on Human Wound Closure In Vitro. *Ann. Surg.* **253**, 410–418. (doi:10.1097/SLA.0b013e318207f39c)
7. Enoch S, Leaper DJ. 2008 Basic science of wound healing. *Surg. Oxf.* **26**, 31–37. (doi:10.1016/j.mpsur.2007.11.005)
8. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. 2008 Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314–321. (doi:10.1038/nature07039)
9. Reinke JM, Sorg H. 2012 Wound Repair and Regeneration. *Eur. Surg. Res.* **49**, 35–43. (doi:10.1159/000339613)
10. Reimers K, Aust M, Sorg H. 2011 Biologische Grundlagen der Wundheilung. In *Praxis der Plastischen Chirurgie*, pp. 3–11. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. (doi:10.1007/978-3-540-37573-9_1)
11. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. 2007 Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 514–525. (doi:10.1038/sj.jid.5700701)
12. Ud-Din S, Volk SW, Bayat A. 2014 Regenerative healing, scar-free healing and scar formation across the species: current concepts and future perspectives. *Exp. Dermatol.* **23**, 615–619. (doi:10.1111/exd.12457)
13. Murawala P, Tanaka EM, Currie JD. 2012 Regeneration: The ultimate example of wound healing. *Semin. Cell Dev. Biol.* **23**, 954–962. (doi:10.1016/j.semcdb.2012.09.013)
14. Godwin J. 2014 The promise of perfect adult tissue repair and regeneration in mammals: Learning from regenerative amphibians and fish. *BioEssays* **36**, 861–871. (doi:10.1002/bies.201300144)
15. Reiß C, Olsson L, Hoßfeld U. 2015 The history of the oldest self-sustaining laboratory animal: 150 years of axolotl research. *J. Exp. Zoolog. B Mol. Dev. Evol.* **324**, 393–404. (doi:10.1002/jez.b.22617)
16. Lévesque M, Villiard É, Roy S. 2010 Skin wound healing in axolotls: a scarless process. *J. Exp. Zoolog. B Mol. Dev. Evol.* **314B**, 684–697. (doi:10.1002/jez.b.21371)
17. Endo T, Bryant SV, Gardiner DM. 2004 A stepwise model system for limb regeneration.

- Dev. Biol.* **270**, 135–145. (doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.016)
18. McCusker C, Bryant SV, Gardiner DM. 2015 The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods. *Regeneration* **2**, 54–71. (doi:10.1002/reg2.32)
 19. Yokoyama H. 2007 Initiation of limb regeneration: The critical steps for regenerative capacity. *Dev. Growth Differ.* **50**, 13–22. (doi:10.1111/j.1440-169X.2007.00973.x)
 20. Alibardi L. 2014 Histochemical, Biochemical and Cell Biological aspects of tail regeneration in lizard, an amniote model for studies on tissue regeneration. *Prog. Histochem. Cytochem.* **48**, 143–244. (doi:10.1016/j.proghi.2013.12.001)
 21. Satoh A, Bryant SV, Gardiner DM. 2012 Nerve signaling regulates basal keratinocyte proliferation in the blastema apical epithelial cap in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev. Biol.* **366**, 374–381. (doi:10.1016/j.ydbio.2012.03.022)
 22. Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA. 2013 Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 9415–9420. (doi:10.1073/pnas.1300290110)
 23. Metcalfe AD, Ferguson MWJ. 2007 Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J. R. Soc. Interface* **4**, 413–437. (doi:10.1098/rsif.2006.0179)
 24. Young HE, Bailey CF, Dalley BK. 1983 Gross morphological analysis of limb regeneration in postmetamorphic adult *Ambystoma*. *Anat. Rec.* **206**, 295–306. (doi:10.1002/ar.1092060308)
 25. Seifert AW, Monaghan JR, Voss SR, Maden M. 2012 Skin Regeneration in Adult Axolotls: A Blueprint for Scar-Free Healing in Vertebrates. *PLoS ONE* **7**, e32875. (doi:10.1371/journal.pone.0032875)
 26. Kuhn H, Saam J, Eibach S, Holzhütter H-G, Ivanov I, Walther M. 2005 Structural biology of mammalian lipoxygenases: Enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 93–101. (doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.238)
 27. Ivanov I, Heydeck D, Hofheinz K, Roffeis J, O'Donnell VB, Kuhn H, Walther M. 2010 Molecular enzymology of lipoxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* **503**, 161–174. (doi:10.1016/j.abb.2010.08.016)
 28. Hansen J, Garreta A, Benincasa M, Fusté MC, Busquets M, Manresa A. 2013 Bacterial lipoxygenases, a new subfamily of enzymes? A phylogenetic approach. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 4737–4747. (doi:10.1007/s00253-013-4887-9)
 29. Brash AR. 1999 Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *J. Biol. Chem.* **274**, 23679–23682. (doi:10.1074/jbc.274.34.23679)
 30. Gillmor SA, Villaseñor A, Fletterick R, Sigal E, Browner MF. 1997 The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 1003–1009. (doi:10.1038/nsb1297-1003)
 31. Choi J, Chon JK, Kim S, Shin W. 2007 Conformational flexibility in mammalian 15S-lipoxygenase: Reinterpretation of the crystallographic data. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **70**, 1023–1032. (doi:10.1002/prot.21590)
 32. Krieg P, Fürstenberger G. 2013 The role of lipoxygenases in epidermis. *Biochim.*

- Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* (doi:10.1016/j.bbalip.2013.08.005)
33. Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K. 2015 Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 308–330. (doi:10.1016/j.bbalip.2014.10.002)
 34. Haeggström JZ, Funk CD. 2011 Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease. *Chem. Rev.* **111**, 5866–5898. (doi:10.1021/cr200246d)
 35. Gronert K, Maheshwari N, Khan N, Hassan IR, Dunn M, Laniado Schwartzman M. 2005 A Role for the Mouse 12/15-Lipoxygenase Pathway in Promoting Epithelial Wound Healing and Host Defense. *J. Biol. Chem.* **280**, 15267–15278. (doi:10.1074/jbc.M410638200)
 36. Biteman B, Hassan IR, Walker E, Leedom AJ, Dunn M, Seta F, Laniado-Schwartzman M, Gronert K. 2007 Interdependence of lipoxin A₄ and heme-oxygenase in counter-regulating inflammation during corneal wound healing. *FASEB J.* **21**, 2257–2266. (doi:10.1096/fj.06-7918com)
 37. Kenchegowda S, Bazan HEP. 2010 Significance of lipid mediators in corneal injury and repair. *J. Lipid Res.* **51**, 879–891. (doi:10.1194/jlr.R001347)
 38. Candi E, Schmidt R, Melino G. 2005 The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 328–340. (doi:10.1038/nrm1619)
 39. Jobard F *et al.* 2002 Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12(R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13.1. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 107–113. (doi:10.1093/hmg/11.1.107)
 40. Zheng Y, Yin H, Boeglin WE, Elias PM, Crumrine D, Beier DR, Brash AR. 2011 Lipoxygenases mediate the effect of essential fatty acid in skin barrier formation: a proposed role in releasing omega-hydroxyceramide for construction of the corneocyte lipid envelope. *J. Biol. Chem.* **286**, 24046–24056. (doi:10.1074/jbc.M111.251496)
 41. Yu Z, Schneider C, Boeglin WE, Marnett LJ, Brash AR. 2003 The lipoxygenase gene ALOXE3 implicated in skin differentiation encodes a hydroperoxide isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 9162–9167. (doi:10.1073/pnas.1633612100)
 42. Yu Z, Schneider C, Boeglin WE, Brash AR. 2006 Human and mouse eLOX3 have distinct substrate specificities: Implications for their linkage with lipoxygenases in skin. *Arch. Biochem. Biophys.* **455**, 188–196. (doi:10.1016/j.abb.2006.09.002)
 43. Zheng Y, Brash AR. 2010 Dioxygenase activity of epidermal lipoxygenase-3 unveiled: typical and atypical features of its catalytic activity with natural and synthetic polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **285**, 39866–39875. (doi:10.1074/jbc.M110.155374)
 44. Menger B, Vogt PM, Radtke C, Kuhbier JW, Killat J, Reimers K. 2010 Lp34: Amphibian epidermal lipoxygenase AmbLOXe enhances mammalian wound healing *in vivo*. *Plast. Reconstr. Surg.* **126**, 726. (doi:10.1097/01.prs.0000387229.83647.ac)
 45. Vogt P, Menger B, Reimers K. 2015 Lipoxygenase and its use in wound healing.
 46. Hulkower KI, Herber RL. 2011 Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics* **3**, 107–124. (doi:10.3390/pharmaceutics3010107)
 47. Kramer N, Walzl A, Unger C, Rosner M, Krupitza G, Hengstschläger M, Dolznig H.

- 2013 *In vitro* cell migration and invasion assays. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **752**, 10–24. (doi:10.1016/j.mrrev.2012.08.001)
48. Stamm A, Reimers K, Strauß S, Vogt P, Scheper T, Pepelanova I. 2016 *In vitro* wound healing assays – state of the art. *BioNanoMaterials* **0**. (doi:10.1515/bnm-2016-0002)
49. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. 2007 *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat. Protoc.* **2**, 329–333. (doi:10.1038/nprot.2007.30)
50. Klettner A, Tahmaz N, Dithmer M, Richert E, Roider J. 2014 Effects of aflibercept on primary RPE cells: toxicity, wound healing, uptake and phagocytosis. *Br. J. Ophthalmol.* **98**, 1448–1452. (doi:10.1136/bjophthalmol-2014-305105)
51. Doyle W, Shide E, Thapa S, Chandrasekaran V. 2012 The effects of energy beverages on cultured cells. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 3759–3768. (doi:10.1016/j.fct.2012.07.008)
52. Zhang M, Li H, Ma H, Qin J. 2013 A simple microfluidic strategy for cell migration assay in an *in vitro* wound-healing model: Microfluidic approach for cell migration. *Wound Repair Regen.* **21**, 897–903. (doi:10.1111/wrr.12106)
53. Liu M *et al.* 2014 12-hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via the BLT2 receptor. *J. Exp. Med.* **211**, 1063–1078. (doi:10.1084/jem.20132063)
54. Brönneke S *et al.* 2015 Genome-wide expression analysis of wounded skin reveals novel genes involved in angiogenesis. *Angiogenesis* **18**, 361–371. (doi:10.1007/s10456-015-9472-7)
55. Yue PYK, Leung EPY, Mak NK, Wong RNS. 2010 A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. *J. Biomol. Screen.* **15**, 427–433. (doi:10.1177/1087057110361772)
56. Goetsch KP, Niesler CU. 2011 Optimization of the scratch assay for *in vitro* skeletal muscle wound healing analysis. *Anal. Biochem.* **411**, 158–160. (doi:10.1016/j.ab.2010.12.012)
57. Ashby WJ, Zijlstra A. 2012 Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. *Integr. Biol.* **4**, 1338. (doi:10.1039/c2ib20154b)
58. Lan R, Geng H, Hwang Y, Mishra P, Skloss WL, Sprague EA, Saikumar P, Venkatachalam M. 2010 A novel wounding device suitable for quantitative biochemical analysis of wound healing and regeneration of cultured epithelium. *Wound Repair Regen.* **18**, 159–167. (doi:10.1111/j.1524-475X.2010.00576.x)
59. Lee J, Wang Y-L, Ren F, Lele TP. 2010 Stamp Wound Assay for Studying Coupled Cell Migration and Cell Debris Clearance. *Langmuir* **26**, 16672–16676. (doi:10.1021/la103542y)
60. Hettler A, Werner S, Eick S, Laufer S, Weise F. 2013 A New *In Vitro* Model to Study Cellular Responses after Thermomechanical Damage in Monolayer Cultures. *PLoS ONE* **8**, e82635. (doi:10.1371/journal.pone.0082635)
61. Giaever I, Keese CR. 1984 Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 3761–3764. (doi:10.1073/pnas.81.12.3761)
62. Lo C. 1993 Monitoring Motion of Confluent Cells in Tissue Culture. *Exp. Cell Res.* **204**,

- 102–109. (doi:10.1006/excr.1993.1014)
63. Ghosh PM, Keese CR, Giaever I. 1993 Monitoring electropermeabilization in the plasma membrane of adherent mammalian cells. *Biophys. J.* **64**, 1602–1609. (doi:10.1016/S0006-3495(93)81531-5)
 64. Keese CR, Wegener J, Walker SR, Giaever I. 2004 Electrical wound-healing assay for cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1554–1559. (doi:10.1073/pnas.0307588100)
 65. Giaever I, Keese CR. 1991 Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7896–7900. (doi:10.1073/pnas.88.17.7896)
 66. Lo C-M, Ferrier J. 1999 Electrically measuring viscoelastic parameters of adherent cell layers under controlled magnetic forces. *Eur. Biophys. J.* **28**, 112–118. (doi:10.1007/s002490050190)
 67. Burns AR, Bowden RA, MacDonell SD, Walker DC, Odebunmi TO, Donnachie EM, Simon SI, Entman ML, Smith CW. 2000 Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J. Cell Sci.* **113**, 45–57.
 68. Szulcek R, Bogaard HJ, van Nieuw Amerongen GP. 2014 Electric Cell-substrate Impedance Sensing for the Quantification of Endothelial Proliferation, Barrier Function, and Motility. *J. Vis. Exp.* (doi:10.3791/51300)
 69. Pratt BM, Harris AS, Morrow JS, Madri JA. 1984 Mechanisms of cytoskeletal regulation: Modulation of aortic endothelial cell spectrin by the extracellular matrix. *Am. J. Pathol.* **117**, 349–354. (doi:10.1002/jcp.1041270311)
 70. Ohtaka K, Watanabe S, Iwazaki R, Hirose M, Sato N. 1996 Role of Extracellular Matrix on Colonic Cancer Cell Migration and Proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 346–352. (doi:10.1006/bbrc.1996.0408)
 71. Poujade M, Grasland-Mongrain E, Hertzog A, Jouanneau J, Chavrier P, Ladoux B, Buguin A, Silberzan P. 2007 Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 15988–15993. (doi:10.1073/pnas.0705062104)
 72. van Horssen R, Galjart N, Rens JAP, Eggermont AMM, ten Hagen TLM. 2006 Differential effects of matrix and growth factors on endothelial and fibroblast motility: Application of a modified cell migration assay. *J. Cell. Biochem.* **99**, 1536–1552. (doi:10.1002/jcb.20994)
 73. Kroening S, Goppelt-Struebe M. 2010 Analysis of Matrix-Dependent Cell Migration with a Barrier Migration Assay. *Sci. Signal.* **3**, pl1. (doi:10.1126/scisignal.3126pl1)
 74. García-Fruitós E, González-Montalbán N, Morell M, Vera A, Ferraz RM, Arís A, Ventura S, Villaverde A. 2005 Aggregation as bacterial inclusion bodies does not imply inactivation of enzymes and fluorescent proteins. *Microb. Cell Factories* **4**, 27. (doi:10.1186/1475-2859-4-27)
 75. Kopito RR. 2000 Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* **10**, 524–530. (doi:10.1016/S0962-8924(00)01852-3)
 76. Rokney A, Shagan M, Kessel M, Smith Y, Rosenshine I, Oppenheim AB. 2009 *E. coli* Transports Aggregated Proteins to the Poles by a Specific and Energy-Dependent Process. *J. Mol. Biol.* **392**, 589–601. (doi:10.1016/j.jmb.2009.07.009)

77. Govers SK, Dutre P, Aertsen A. 2014 *In Vivo* Disassembly and Reassembly of Protein Aggregates in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **196**, 2325–2332. (doi:10.1128/JB.01549-14)
78. Peternel Š, Komel R. 2010 Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. *Microb. Cell Factories* **9**, 66–66. (doi:10.1186/1475-2859-9-66)
79. García-Fruitós E, Sabate R, de Groot NS, Villaverde A, Ventura S. 2011 Biological role of bacterial inclusion bodies: a model for amyloid aggregation. *FEBS J.* **278**, 2419–2427. (doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08165.x)
80. Cano-Garrido O *et al.* 2013 Supramolecular organization of protein-releasing functional amyloids solved in bacterial inclusion bodies. *Acta Biomater.* **9**, 6134–6142. (doi:10.1016/j.actbio.2012.11.033)
81. de Groot NS, Sabate R, Ventura S. 2009 Amyloids in bacterial inclusion bodies. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 408–416. (doi:10.1016/j.tibs.2009.03.009)
82. Vázquez E *et al.* 2012 Functional Inclusion Bodies Produced in Bacteria as Naturally Occurring Nanopills for Advanced Cell Therapies. *Adv. Mater.* **24**, 1742–1747. (doi:10.1002/adma.201104330)
83. Seras-Franzoso J, Peebo K, García-Fruitós E, Vázquez E, Rinas U, Villaverde A. 2014 Improving protein delivery of fibroblast growth factor-2 from bacterial inclusion bodies used as cell culture substrates. *Acta Biomater.* **10**, 1354–1359. (doi:10.1016/j.actbio.2013.12.021)
84. Seras-Franzoso J, Sánchez-Chardi A, Garcia-Fruitós E, Vázquez E, Villaverde A. 2016 Cellular uptake and intracellular fate of protein releasing bacterial amyloids in mammalian cells. *Soft Matter* **12**, 3451–3460. (doi:10.1039/C5SM02930A)
85. Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobitg M, Montanyola A, Chang J-M, Taly J-F, Notredame C. 2011 T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic Acids Res.* **39**, W13–W17. (doi:10.1093/nar/gkr245)
86. Kaur J, Kumar A, Kaur J. 2017 Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *Int. J. Biol. Macromol.* (doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080)
87. Angov E, Legler PM, Mease RM. 2011 Adjustment of Codon Usage Frequencies by Codon Harmonization Improves Protein Expression and Folding. In *Heterologous Gene Expression in E. coli* (eds TC Evans, M-Q Xu), pp. 1–13. Totowa, NJ: Humana Press. (doi:10.1007/978-1-61737-967-3_1)
88. Menzella HG. 2011 Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Factories* **10**, 15. (doi:10.1186/1475-2859-10-15)
89. Waugh DS. 2011 An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr. Purif.* **80**, 283–293. (doi:10.1016/j.pep.2011.08.005)
90. Sahdev S, Khattar SK, Saini KS. 2007 Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* **307**, 249–264. (doi:10.1007/s11010-007-9603-6)
91. Brondyk WH. 2009 Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. *Methods Enzymol.* **463**, 131–147. (doi:10.1016/S0076-6879(09)63011-1)

92. Rosano GL, Ceccarelli EA. 2014 Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**. (doi:10.3389/fmicb.2014.00172)
93. Sørensen HP, Mortensen KK. 2005 Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Factories* **4**, 1. (doi:10.1186/1475-2859-4-1)
94. Voulgaridou G-P, Mantso T, Chlichlia K, Panayiotidis MI, Pappa A. 2013 Efficient *E. coli* Expression Strategies for Production of Soluble Human Crystallin ALDH3A1. *PLoS ONE* **8**, e56582. (doi:10.1371/journal.pone.0056582)
95. Prasad S, Khadatare PB, Roy I. 2011 Effect of Chemical Chaperones in Improving the Solubility of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4603–4609. (doi:10.1128/AEM.05259-11)
96. San-Miguel T, Pérez-Bermúdez P, Gavidia I. 2013 Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *SpringerPlus* **2**, 89. (doi:10.1186/2193-1801-2-89)
97. Steczko J, Donoho GA, Dixon JE, Sugimoto T, Axelrod B. 1991 Effect of ethanol and low-temperature culture on expression of soybean lipoxygenase L-1 in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **2**, 221–227. (doi:10.1016/1046-5928(91)90075-T)
98. Vera A, González-Montalbán N, Arís A, Villaverde A. 2007 The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* **96**, 1101–1106. (doi:10.1002/bit.21218)
99. Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler H-H, Buchner J. 1991 Protein Aggregation *in vitro* and *in vivo*: A Quantitative Model of the Kinetic Competition between Folding and Aggregation. *Nat. Biotechnol.* **9**, 825–829. (doi:10.1038/nbt0991-825)
100. Bertani G. 1951 Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**, 293–300.
101. Tartof KD, Hobbs CA. 1987 Improved Media for Growing Plasmid and Cosmid Clones. *Bethesda Res. Labs. Focus* **9**, 12–17.
102. Galloway CA, Sowden MP, Smith HC. 2003 Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase. *BioTechniques* **34**, 524–526, 528, 530.
103. Olaofe OA, Burton SG, Cowan DA, Harrison STL. 2010 Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. J.* **52**, 19–24. (doi:10.1016/j.bej.2010.06.013)
104. García-Fraga B, da Silva AF, López-Seijas J, Sieiro C. 2015 Optimized expression conditions for enhancing production of two recombinant chitinolytic enzymes from different prokaryote domains. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **38**, 2477–2486. (doi:10.1007/s00449-015-1485-5)
105. Miao F, Kompala DS. 1992 Overexpression of cloned genes using recombinant *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter: I. Batch cultures and kinetic modeling. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 787–796. (doi:10.1002/bit.260400706)
106. Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU. 1992 Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**, 683–689. (doi:10.1038/356683a0)
107. Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. 1997 Molecular chaperones, folding catalysts, and the

- recovery of active recombinant proteins from *E. coli*: To fold or to refold. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 197–238.
108. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T. 1998 Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1694–1699.
 109. Nishihara K, Kanemori M, Yanagi H, Yura T. 2000 Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 884–889.
 110. Singh SM, Panda AK. 2005 Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 303–310. (doi:10.1263/jbb.99.303)
 111. Rodríguez-Carmona E, Cano-Garrido O, Seras-Franzoso J, Villaverde A, García-Fruitós E. 2010 Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. *Microb. Cell Factories* **9**. (doi:10.1186/1475-2859-9-71)
 112. Li Z, Kessler W, van den Heuvel J, Rinas U. 2011 Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 1203–1213. (doi:10.1007/s00253-011-3407-z)
 113. Singh SM, Upadhyay AK, Panda AK. 2008 Solubilization at high pH results in improved recovery of proteins from inclusion bodies of *E. coli*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **83**, 1126–1134. (doi:10.1002/jctb.1945)
 114. Yamaguchi H, Miyazaki M. 2014 Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules* **4**, 235–251. (doi:10.3390/biom4010235)
 115. Przybycien TM, Dunn JP, Valax P, Georgiou G. 1994 Secondary structure characterization of β -lactamase inclusion bodies. *Protein Eng. Des. Sel.* **7**, 131–136. (doi:10.1093/protein/7.1.131)
 116. Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg L., Panda AK. 2000 Optimization of Inclusion Body Solubilization and Renaturation of Recombinant Human Growth Hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **18**, 182–192. (doi:10.1006/prev.1999.1179)
 117. Ho JGS. 2003 The likelihood of aggregation during protein renaturation can be assessed using the second virial coefficient. *Protein Sci.* **12**, 708–716. (doi:10.1110/ps.0233703)
 118. Boivin S, Kozak S, Meijers R. 2013 Optimization of protein purification and characterization using Thermofluor screens. *Protein Expr. Purif.* **91**, 192–206. (doi:10.1016/j.pep.2013.08.002)
 119. Peternel Š, Grdadolnik J, Gaberc-Porekar V, Komel R. 2008 Engineering inclusion bodies for non denaturing extraction of functional proteins. *Microb. Cell Factories* **7**, 34. (doi:10.1186/1475-2859-7-34)
 120. Francis VG, Majeed MA, Gummadi SN. 2012 Recovery of functionally active recombinant human phospholipid scramblase 1 from inclusion bodies using N-lauroyl sarcosine. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 1041–1048. (doi:10.1007/s10295-012-1105-1)

121. Park J, Kim D-H, Kim H-N, Wang CJ, Kwak MK, Hur E, Suh K-Y, An SS, Levchenko A. 2016 Directed migration of cancer cells guided by the graded texture of the underlying matrix. *Nat. Mater.* **15**, 792–801. (doi:10.1038/nmat4586)
122. Rose MT. 2012 Effect of growth factors on the migration of equine oral and limb fibroblasts using an *in vitro* scratch assay. *Vet. J.* **193**, 539–544. (doi:10.1016/j.tvjl.2012.01.010)
123. García-Fruitós E *et al.* 2009 Surface Cell Growth Engineering Assisted by a Novel Bacterial Nanomaterial. *Adv. Mater.* **21**, 4249–4253. (doi:10.1002/adma.200900283)
124. Nowoshilow S *et al.* 2018 The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature* **554**, 50–55. (doi:10.1038/nature25458)
125. Bimboim HC, Doly J. 1979 A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513–1523. (doi:10.1093/nar/7.6.1513)

C. ABSCHLUSSARBEITEN UND KOOPERATIONEN

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine Bachelorarbeit angefertigt, deren experimentelle Durchführung von der Autorin betreut wurde. Die im Folgenden kenntlich gemachten Abschnitte basieren auf den Ergebnissen dieser Abschlussarbeit:

Lale Zerdali: „Erprobung eines Lipoxygenase-Assays zur Bestimmung der Aktivität der epidermalen Lipoxygenase aus dem Axolotl“ (Bachelorarbeit, November 2016 – Januar 2017);

3.3.3 Lipoxygenase Assay; Abbildung 3.27 und Abbildung 3.28

An einigen der im experimentellen Teil dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse waren neben der Autorin weitere Personen beteiligt, die an dieser Stelle aufgeführt werden:

Daniel Marquard: 3.1 Molekularbiologische Arbeiten;

Programmierung des „Codon Optimizer“ VBA Tools

Dr. Antonina Lavrentieva: 3.3.4.3 Scratch Assay mit NiH-3T3 Fibroblasten;

gemeinsame experimentelle Durchführung des *Scratch Assays*

Prof. Dr. Andreas Pich (MHH): 3.3.1 Aufreinigung von Lipoxygenase *Inclusion*

Bodies; Durchführung und Auswertung der Massenspektrometriemessungen

D. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Anne Stamm
Geburtsdatum: 16.05.1988
Geburtsort: Mühlhausen

Ausbildung:

2014 – 2018 Promotion Chemie,
Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover,
Thema: „Rekombinante Produktion und Charakterisierung der
epidermalen Lipoxygenase AmbLOXe (*Ambystoma mexicanum*) und
der homologen Lipoxygenase ALOXe3 (*Homo sapiens*)“

2011 – 2013 Masterstudiengang Life Science, Leibniz Universität Hannover,
Abschluss: Master of Science (M. Sc.)
Masterarbeit: „Verschiebung des Substratspektrums einer O-
Methyltransferase durch wissenschaftsbasierte Enzymoptimierung“

2008 – 2011 Bachelorstudiengang Life Science, Leibniz Universität Hannover,
Abschluss: Bachelor of Science (B. Sc.)
Bachelorarbeit: „Grundlagen und Gesetzgebung für *Advanced Therapy
Medicinal Products (ATMPs)*“

2007 Abitur an der Albert-Schweitzer-Schule, Kassel

E. PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE

*Erstautor/Vortragender

Journal Publikationen

Stamm, A.* (90 %), Reimers, K., Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., & Pepelanova, I. (2016).
In vitro wound healing assays – state of the art.
BioNanoMaterials. 17(1-2): 79-87. <https://doi.org/10.1515/bnm-2016-0002>

Stamm, A.* (90 %), Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., & Pepelanova, I. (2018).
Positive *in vitro* wound healing effects of functional inclusion bodies of a lipoxygenase from the Mexican axolotl
Microbial Cell Factories. 17(57). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0904-0>

Internationale Konferenzvorträge

Stamm, A.* (90 %), Scheper, T., & Pepelanova, I. (2016).
Production and analysis of epidermal lipoxygenases
Konferenzvortrag auf dem 17th European Congress on Biotechnology in Krakau, Polen (03.06.-06.06.2016)

Strauß, S.*, **Stamm, A.** (30 %), Liebsch, C., Pepelanova, I., Scheper, T. & Vogt, P.M. (2017)
Vom Axolotl zur AmbLOXe – Anwendbarkeit der amphibischen Regeneration auf die Wundheilung der Säugetiere
Konferenzvortrag auf dem Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie in München (21.03.-24.03.2017)

Stamm, A.* (90 %), Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., & Pepelanova, I. (2017).
Development of a wound healing assay using inclusion bodies
Kurzvortrag auf dem 25th ESACT (European Society for Animal Cell Technology) Meeting in Lausanne, Schweiz (14.05.-17.05.2017)

Poster Präsentationen

Schneider-Barthold, C.*, **Stamm, A.***, Baganz, S., Pepelanova, I., & Scheper, T. (2015)
Biomaterials for Regenerative Medicine Applications
Poster auf der Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel in Hannover (10.-11.03.2015)

Stamm, A.*, Pepelanova, I., Reimers, K., & Scheper, T. (2015)
Epidermal lipoxygenases as a new approach in wound healing: Heterologous production of human ALOXE3 in *E. coli*
Poster auf dem internationalen Symposium von Biofabrication in Hannover (25.-26.06.2015)

Stamm, A.*, Reimers, K., Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., & Pepelanova, I. (2016).

Produktion und Analyse epidermaler Lipoxygenasen mittels biotechnologischer Methoden
Poster auf der ProcessNet Jahrestagung und 32. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen in
Aachen (12.-15.09.2016)

Stamm, A.*, Strauß, S., Vogt, P., Scheper, T., & Pepelanova, I. (2017).

Development of a wound healing assay using inclusion bodies
Poster auf dem 25th ESACT (European Society for Animal Cell Technology) Meeting in Lausanne,
Schweiz (14.05.-17.05.2017)