

2 Ergebnisse

2.1 Nachweis der erfolgreichen Expression der intrazellulären Domäne

Da die intrazelluläre Domäne des nAChR keine enzymatische Aktivität und keine andere bekannte biologische Funktion besitzt, ist kein Aktivitäts-Test zum Nachweis des Proteins vorhanden. Daher ist es schwierig, die Expression des gewünschten Proteins nachzuweisen. Eine Detektion kann nur durch Auftrennung der erhaltenen Proteinfractionen über SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließenden Western-Blot erfolgen, bei dem das gesuchte Protein mit Antikörpern gegen einen vorhanden „Tag“ oder die intrazelluläre Schleife selbst nachgewiesen wird. Dabei wird allerdings keine Aussage darüber getroffen, ob das Protein im Expressionssystem im nativen Zustand vorlag.

2.2 Expression in Insektenzellen

2.2.1 Baculovirus-Expression (pFastBac-Vektor)

In Sf9-Insektenzellen kann fremde DNA mit Hilfe von Baculovirus-Partikeln eingeführt werden. Baculoviren sind Retroviren, die bestimmte Insektenarten befallen können. Durch genetische Veränderung dieser Viren kann DNA in das Virusgenom eingebracht werden, die nach Infektion der Zellen verstärkt abgelesen und in Proteine übersetzt wird.

In Abb. 16 ist die Vorgehensweise zur Herstellung der rekombinanten Baculoviren dargestellt. Zunächst wird in das sog. Donor-Plasmid die gewünschte DNA-Sequenz inseriert. Dieses Plasmid wird in kompetente *E. coli* eingebracht, die die Bacmid-DNA und notwendige Helferplasmide bereits enthalten. In diesen Bakterien erfolgt die Rekombination der DNA-Sequenzen und mit Hilfe von Antibiotika können Bakterien selektiert werden, die intakte Bacmid-DNA enthalten. Sobald einzelne Klone mit rekombinanter Baculovirus-DNA identifiziert werden können, werden diese Bakterien amplifiziert und die Virus-DNA aus ihnen isoliert. Mit der Bacmid-DNA werden anschließend die Sf9-Zellen transfiziert, die dann den Virus exprimieren. Der Virus muss über mehrere Stufen amplifiziert werden, auf jeder Stufe wird die Konzentration der Viruspartikel bestimmt. Bei einem genügend hohen Virustiter können die Insektenzellen zur Expression des gesuchten Proteins mit dem rekombinanten Virus infiziert werden.

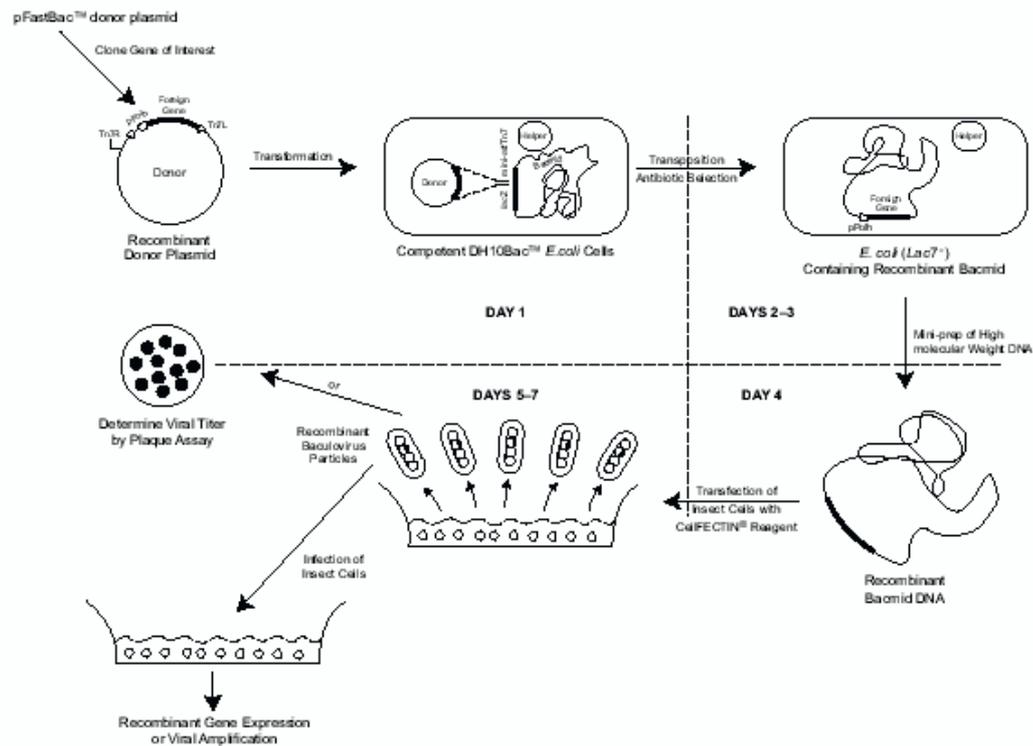


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Herstellung rekombinanter Baculoviren mit Hilfe des Bac-To-Bac-Systems. Das Schema wurde dem Handbuch der Firma Invitrogen entnommen.

Aus vorangegangenen Arbeiten in der Arbeitsgruppe waren Baculoviren für die Expression der intrazellulären Domäne der α - und der γ -Untereinheit des *Torpedo californica*-nAChR als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) bereits vorhanden.^[54] Diese Virenstämme mussten weiter amplifiziert werden, bevor eine erfolgreiche Infektion der Insektenzellen zur Expression der gewünschten Proteine erfolgen konnte. Durch die Fusion mit einem anderen Protein sollten die Detektion und vor allem die Reinigung des exprimierten Konstruktes erleichtert werden. Das Enzym GST bindet an sein natürliches Substrat Glutathion, wodurch man eine Reinigung mit einer Affinitätschromatographie über an einer Matrix gebundenes Glutathion durchführen kann.

In zahlreichen Expressionsversuchen wurden teilweise bis zu 50 $\mu\text{g/ml}$ (Abschätzung nach Coomassie-Färbungen von SDS-Gelen) des gesuchten Proteins gefunden. Das Protein war allerdings in Reinigungspuffer ohne Detergenz unlöslich und blieb nach der Zentrifugation im unlöslichen Teil des Zellhomogenats. Bei Verwendung von 1 % SDS im Homogenisierungspuffer wurde das Protein nicht an die Affinitätsmatrix gebunden. Ein Beispiel für dieses Ergebnis zeigt Abb. 17. Eine Reinigung über die Glutathion-Säule war aus diesen Gründen nicht möglich.

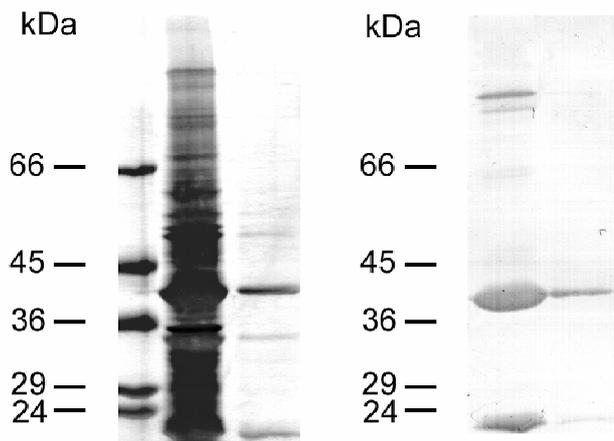


Abbildung 17: SDS-PAGE (links) und Western-Blot (rechts) eines Aufarbeitungs-Versuches des Fusionsproteins aus GST und der intrazellulären Schleife der α -Untereinheit (*Torpedo californica*) aus Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen. In Spur 1 ist jeweils das komplette Zellhomogenat aufgetragen, in Spur 2 die Waschlösung nach Durchlauf durch die Glutathion-Säulenmatrix. Das SDS-Gel ist mit Silber gefärbt worden, auf dem Western-Blot wurde mit Hilfe der Alkalischen-Phosphatase-Reaktion spezifisch die α -Schleife mit einem monoklonalen Antikörper (von S. Tzartos, Athen, Griechenland) angefärbt. M: Molekulargewichts-Standard

Das Protein aggregierte anscheinend in den Zellen, eventuell indem es an intrazellulären Membranen, z. B. im ER, hängen blieb oder aber von den Zellen in Kompartimente „eingepackt“ wurde. Diese Membranen sollten aus den Zellen isoliert und damit das gesuchte Protein auf einfachere Weise erhalten werden. Daher wurden Membranpräparationen mit verschiedenen Homogenisationspuffern durchgeführt (Details siehe Kapitel 5.9), um mit dieser Methode bestimmte Membranbereiche der Insektenzellen zu isolieren und dabei das Fusionsprotein in einer oder mehreren Fraktionen anzureichern. Das Protein wurde jedoch immer über alle Fraktionen verteilt gefunden (siehe Abb. 18). Da keine Anreicherung im Sucrosegradienten in einer Fraktion gezeigt werden konnte, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

In der Immunfluoreszenz von infizierten Zellen zeigte sich nach drei Tagen das exprimierte Protein innerhalb der Zellen mit deutlicher Fluoreszenz-Intensität, wahrscheinlich an intrazellulären Membranen aggregiert (siehe Abb. 19).

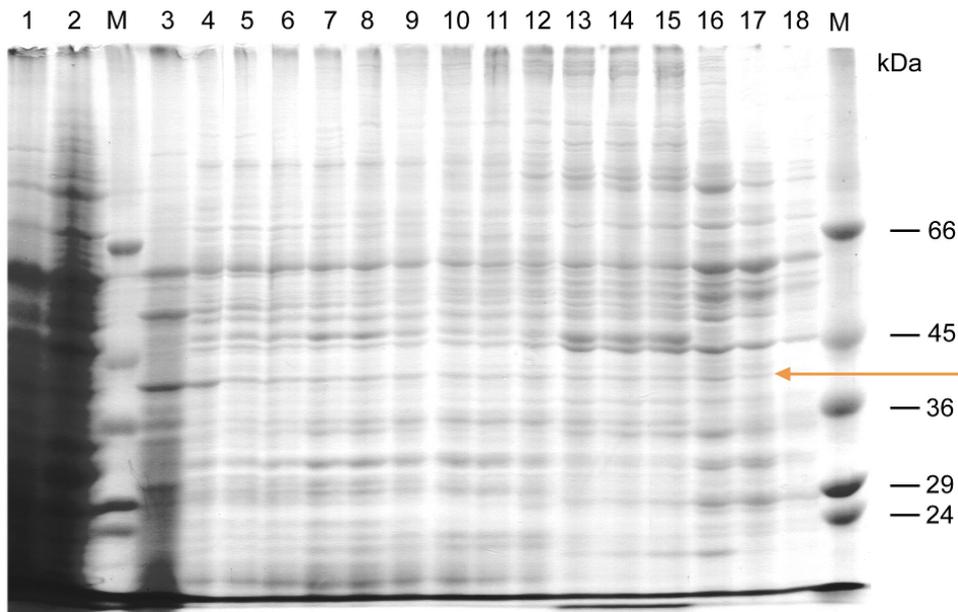


Abbildung 18: SDS-PAGE einer Membranpräparation von *Sf9*-Zellen nach Expression der intrazellulären Schleife der α -Untereinheit als Fusionsprotein mit GST. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Spur 1: komplettes Zellhomogenat, Spur 2: Pellet der Präparation, Spuren 3 - 18: Fraktionen des Sucrosegradienten, M: Molekulargewichts-Standard. Die Proteinbande, die in allen Fraktionen höchstwahrscheinlich das Fusionsprotein enthält, ist markiert.

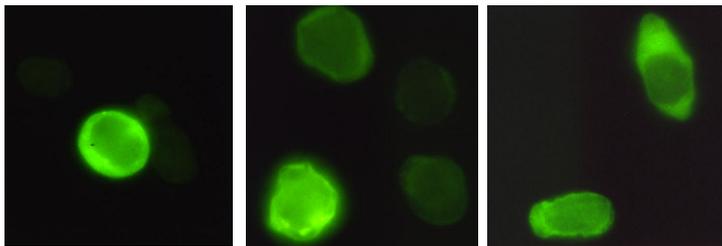


Abbildung 19: Indirekte Immunfluoreszenz von Baculovirus-infizierten *Sf9*-Zellen. Gezeigt sind Aufnahmen mit einem konfokalen Mikroskop. Die Fluoreszenz zeigt die intrazelluläre Schleife der α -Untereinheit.

Für die Expression der intrazellulären Schleifen der anderen beiden Untereinheiten musste die DNA erst in den Baculovirus eingebracht (β -Untereinheit) bzw. der Vektor kloniert und die DNA dann in den Virus überführt werden (δ -Untereinheit).

Um die DNA für die Schleife der δ -Untereinheit in den Vektor zu bringen, wurde sowohl der Vektor als auch die gewünschte DNA-Sequenz mit den Restriktionsenzymen EcoR V und Hind III geschnitten. Diese Sequenz wurde vorher mit entsprechenden Primern mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die Herstellung des richtigen Vektorkonstruktes wurde mittels Verdau in charakteristische Bruchstücke (siehe Abb. 20) und außerdem durch Sequenzierung überprüft.

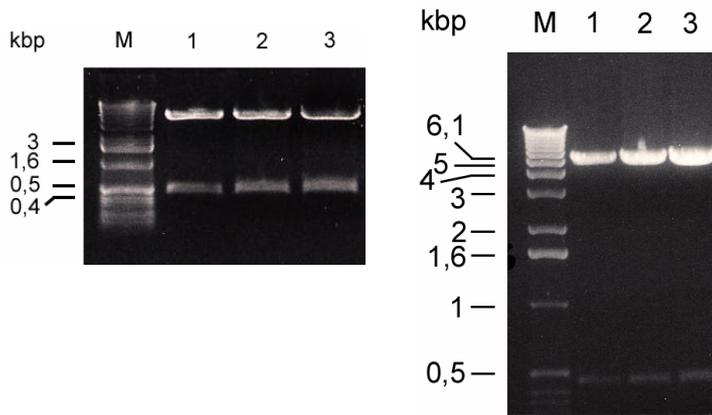


Abbildung 20: Agarosegele des Kontrollverdaus der neu hergestellten pFastBacGST-Plasmide mit der intrazellulären Schleife der δ -Untereinheit. Zu sehen ist ein 1 %iges Agarosegel zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Elektrophorese. Drei Klone des pFastBacGST-Plasmides mit der DNA für die intrazelluläre Schleife der δ -Untereinheit wurden parallel mit den Enzymen EcoR V und Hind III verdaut (Spuren 1 - 3). Zu sehen ist das herausgeschnittene Fragment bei knapp unter 500 bp und der linearisierte Vektor bei etwa 5,5 kb. M: Molekulargewichts-Standard.

Die Viruspartikel wurden über mehrere Stufen amplifiziert und der Virustiter mit Hilfe eines Tests der Firma Life Technologies zur einfacheren Bestimmung der Viruskonzentration auf jeder Stufe ermittelt. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte gesunde Insektenzellen ausgesät und mit Verdünnungen der Viruslösung inkubiert. Nach 45 h wurden die Zellen fixiert und die infizierten Zellen mit Hilfe eines Antikörpers gegen ein Virusprotein sichtbar gemacht. Anschließend erfolgte eine Auszählung der gefärbten Zellansammlungen unter dem Mikroskop. Dieser Vorgang wurde nach jedem Amplifikationsschritt wiederholt. Nach Erreichen einer ausreichenden Viruskonzentration wurden einige Expressionen durchgeführt. Dabei lag der Fokus auf der δ -Untereinheit, da dort insgesamt vier Phosphorylierungsstellen liegen.

Nach diesem Verfahren konnte auch mit genügend großer Virusmenge keine Expression des gewünschten δ -Loop-Proteins erreicht werden. Die Insektenzellen starben ab, bevor eine Expression des gesuchten Proteins nachweisbar war. Eventuell war das zu exprimierende Fusionsprotein unter den Bedingungen der Baculovirus-Infektion toxisch für die Zellen. Deshalb wurde ein neuer Ansatz verfolgt. Die Proteine sollten mit einem Signalpeptid versehen exprimiert werden. Dieses Signal sollte dafür sorgen, dass das Protein nach der erfolgreichen Expression aus der Zelle transportiert wird. Damit wäre eine Reinigung des Proteins aus der Lösung im Zellkulturmedium sehr viel einfacher, da außerdem ein „Tag“ zur Bindung des Proteins an eine Affinitätschromatographie-Säule eingebaut wird.

2.2.2 Baculovirus-Expression (pBSV-8His-Vektor)

Der hier verwendete Vektor enthält ein Sekretionssignal, welches den Export des exprimierten Proteins aus der Zelle veranlassen soll.^[55] Außerdem wird der His₈-Tag an das Protein synthetisiert, der am N-Terminus des Proteins eine Folge von acht Histidinresten beinhaltet, die einen stabilen Chelatkomplex mit zweiwertigen Metallionen bilden. Mit Hilfe einer Ni²⁺-Affinitäts-Säule können diese Proteine aus einer Lösung isoliert und anschließend mit Imidazol-enthaltendem Puffer von der Säule eluiert werden.

Als erstes Konstrukt wurde hier der Vektor mit der Sequenz für die intrazelluläre Schleife der δ -Untereinheit hergestellt. Dabei wurden die Restriktions-Schnittstellen der Enzyme Xma I und Pst I verwendet, um die gewünschte DNA-Sequenz an definierter Stelle in den Vektor einzusetzen. Das DNA-Stück wurde wiederum mit Hilfe der PCR hergestellt und die Richtigkeit des Konstruktes durch Kontrollverdau (siehe Abb. 21) und durch Sequenzierung nachgewiesen.

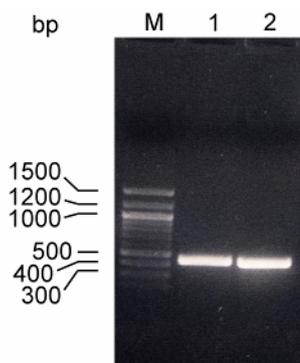


Abbildung 21: Herstellung des pBSV-8His-Plasmides mit der DNA für die intrazelluläre Schleife der δ -Untereinheit. Gezeigt werden die Ergebnisse der PCR zur Herstellung des DNA-Fragmentes für die intrazelluläre δ -Schleife (Spuren 1 und 2). M: Molekulargewichts-Standard.

Anschließend wurde die Baculovirus-DNA in linearisierter Form mit dem Vektor in Sf9-Insektenzellen co-transfiziert und durch mehrere Selektionsschritte der entsprechende Virus hergestellt und über mehrere Amplifikationen vermehrt. Es zeigte sich jedoch bei den Expressionsversuchen keinerlei Expression des gewünschten Proteins. Der rekombinante Virus war von Anfang an mit Wildtyp-Virus verunreinigt, der sich über die Amplifikationen deutlich besser vermehrt hatte und schließlich den rekombinanten Stamm völlig verdrängt hatte. Dadurch war in der verwendeten Baculovirus-Lösung keine DNA zur Expression des gesuchten Proteins vorhanden. Eine derartige Verunreinigung entsteht häufig durch Schwierigkeiten bei der ersten Selektionsstufe der Herstellung des rekombinanten Virus. Bei diesem Schritt werden einzelne Ansammlungen von Zellen aus der Monolayer entnommen und auf die Expression des gesuchten Proteins getestet. Dabei kann es leicht vorkommen, dass

man Zellen untersucht, von denen einige mit dem rekombinanten, andere mit dem Wildtyp-Virus infiziert sind.

2.2.3 Transfektion von Sf9-Zellen

Da das Baculovirus-System nach der Infektion zum schnellen Tod der Insektenzellen führte, wurde ein anderer Vektor getestet, der eine direkte Transfektion der Zellen ermöglicht. Die DNA sollte mit Hilfe des Vektors pMIB/V5-His unmittelbar in die Zellen gebracht werden, nicht über die Infektion mit einem Virus. Der Vektor erzeugt ein Fusionsprotein aus der eingesetzten DNA mit einem His₆-Tag und einem V5-Tag. Die Sequenz des V5-Tags dient dem besseren Nachweis des Proteins.

Hier wurde erneut die kodierende DNA für die intrazelluläre Schleife der δ -Untereinheit in den neuen Vektor eingebracht. Dazu wurden die im Vektor vorhandenen Schnittstellen der Restriktionsenzyme Sph I und Xba I verwendet. Das DNA-Stück wurde mit Hilfe der PCR mit Primern, die ebenfalls die Sequenzen für diese Schnittstellen enthielten, synthetisiert. Die erfolgreiche Klonierung wurde über Restriktionsverdau zu charakteristischen Bruchstücken (siehe Abb. 22) und durch Sequenzierung nachgewiesen.

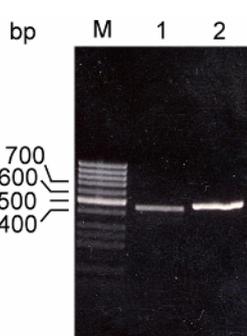


Abbildung 22: Herstellung der DNA-Fragmente für die intrazelluläre δ -Schleife. Gezeigt sind die durch PCR hergestellten DNA-Stücke mit knapp 500 bp (Spur 1 und 2). M: Molekulargewichts-Standard.

Zunächst wurden geringe Mengen von Insektenzellen in kleinen Petrischalen ausgesät und mit Hilfe des Lipid-Reagenzes SuperFect mit der DNA transfiziert. Drei Tage lang wurden diese Zellen mit dem normalen Medium gefüttert, bevor das selektierende Antibiotikum Blasticidin zugegeben wurde. Jetzt konnten nur Zellen, die das Vektorkonstrukt enthielten, weiter wachsen. Zunächst gediehen die Zellen in großer Zahl sehr gut, bis nach zwei Wochen plötzlich fast alle abstarben. Erst nach vier bis fünf Wochen hatten sich die wenigen überlebenden Zellen soweit erholt, dass sie sich entsprechend vermehrt hatten, um sie in größere Kulturflaschen subkultivieren zu können. Schließlich wurden von den Zellen sowohl Monolayer- als auch Schüttelkulturen angesetzt, die auf der Suche nach dem gewünschten Protein aufgearbeitet wurden. Auch das Zellkulturmedium wurde auf das Fusionsprotein hin ge-

testet. Hier wurde allerdings kein exprimiertes Schleifen-Protein gefunden. Aus den Zellen wurde Homogenat in einem Phosphatpuffer hergestellt, das über eine Ni^{2+} -Affinitäts-Säule gegeben wurde. In der Elutionsfraktion konnte das gesuchte Protein nachgewiesen werden, allerdings nicht in reiner Form. Da Insektenzellen viele endogene Histidin-reiche Proteine besitzen, wurden diese auch an die Säule gebunden und anschließend ebenfalls eluiert. Ein Beispiel für die Ergebnisse der Reinigungsversuche des rekombinanten Proteins über eine Ni^{2+} -Affinitäts-Säule aus den stabil transfizierten Zellen zeigt Abb. 23.

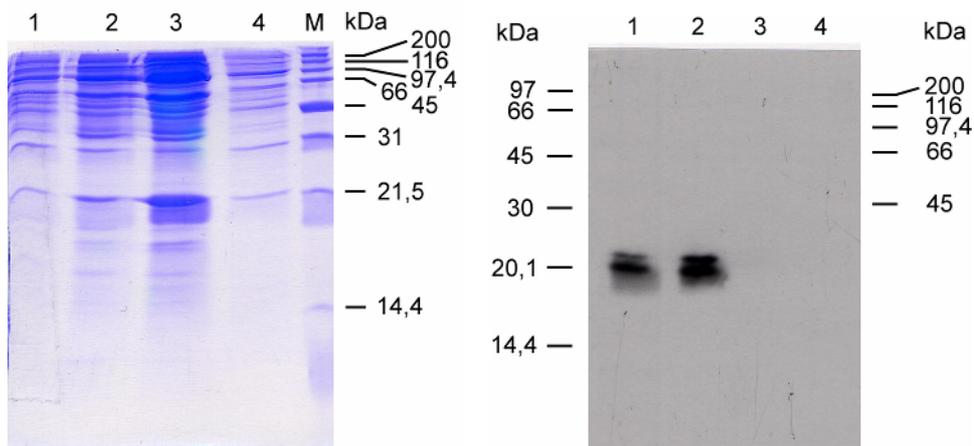


Abbildung 23: Versuch der Reinigung des exprimierten Proteins über Ni^{2+} -Affinitätschromatographie. Links: Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE der Elutionsfraktionen 1 bis 4 der Ni^{2+} -Affinitäts-säule (Spuren 1 bis 4). Rechts: ECL-Färbung des Western-Blots dieser Proteine. Verwendet wurde ein Antikörper gegen den V5-Tag des Fusionsproteins. M: Molekulargewichts-Standard.

Über Immunfluoreszenz-Aufnahmen der transfizierten Zellen konnte gezeigt werden, dass das Protein in den Zellen hergestellt wurde, aber in bestimmten Bereichen stark aufkonzentriert ist. In Abb. 24 sind Beispiele für die dicht zusammengelagerten und eventuell in Membranen gehüllten Proteine in den Sf9-Zellen zu sehen.

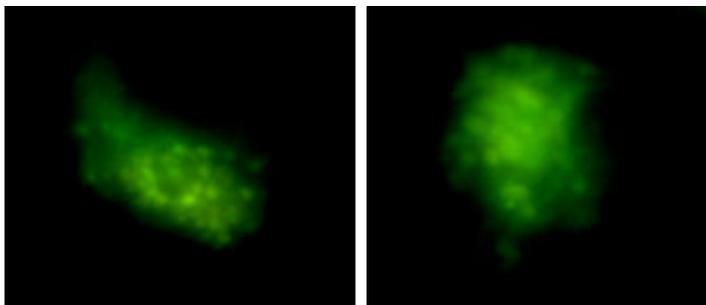


Abbildung 24: Indirekte Immunfluoreszenz von stabil transfizierten Sf9-Zellen. Die Abbildung zeigt Aufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop. Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen den V5-Tag des Fusionsproteins behandelt.

2.3 Expression in Escherichia coli

Da die Expression in Insektenzellen nicht die gewünschte Ausbeute des Proteins erbrachte, wurde die Herstellung des gesuchten Proteins in Bakterien begonnen.

Es wurden Vektoren zur Expression mit den Sequenzen für die intrazelluläre Schleife der δ -Untereinheit und der $\alpha 7$ -Untereinheit verwendet. Die Konstrukte für die δ -Schleife wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. V. Tsetlin (Shemyakin-Ovchinnikov-Institut für Bioorganische Chemie, Moskau, Russland) bereitgestellt, die Konstrukte für $\alpha 7$ wurden selbst hergestellt.

Basierend auf der Überlegung, dass eventuell an den kompletten Schleifen-Sequenzen die Enden Bereiche sind, die nicht mehr zu der autonom faltenden Domäne gehören oder aber normalerweise durch Membrannähe beeinflusst werden und ohne Membran zum Aggregieren neigen könnten, wurden neue DNA-Konstrukte hergestellt. Wenn man diese Stücke aus dem Expressionsprodukt entfernt, sollte das Protein eventuell besser löslich sein und weniger aggregieren. Da Bakterien eine bessere Expressionsausbeute bei löslichen - und damit den Stoffwechsel nicht so sehr störenden - Proteinen zeigen, sollte sich auch die Menge des exprimierten Proteins vergrößern. Daher wurden verkürzte Versionen der beiden Schleifen hergestellt, die bessere Ergebnisse zeigen könnten als die Konstrukte mit voller Länge. So wurden am C- und N- Terminus von $\alpha 7$ - und δ -Schleife zehn bzw. sieben Aminosäuren weggelassen. Bei der Sequenz der $\alpha 7$ -Untereinheit wurden am C-Terminus weitere Verkürzungen um 19 bzw. 29 Aminosäuren vorgenommen (siehe Abb. 25).

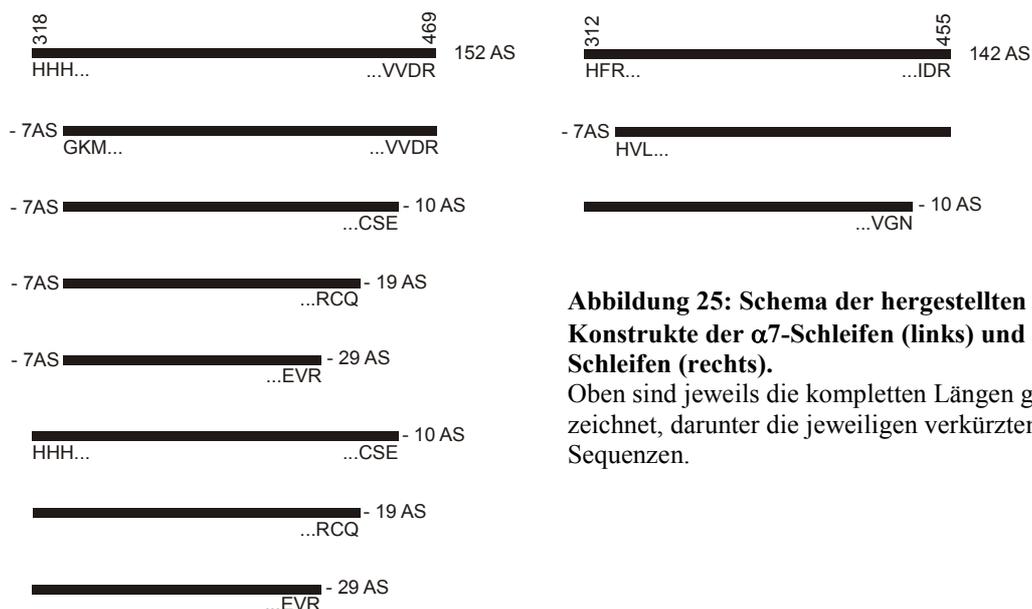


Abbildung 25: Schema der hergestellten Konstrukte der $\alpha 7$ -Schleifen (links) und δ -Schleifen (rechts).

Oben sind jeweils die kompletten Längen gezeichnet, darunter die jeweiligen verkürzten Sequenzen.

2.3.1 Expression der δ -Schleife

In zwei verschiedenen Vektoren der pET-Reihe (Firma Novagen) wurden die komplette intrazelluläre Schleife und zwei verkürzte Versionen eingesetzt. Das vollständige Konstrukt lag in pET-15b vor, wodurch ein Fusionsprotein mit einem His₆-Tag entstehen sollte. Die beiden um sieben (N-Terminus) und zehn Aminosäuren (C-Terminus) verkürzten Versionen lagen in pET-28a vor, ebenfalls mit einem N-terminalen His₆-Tag. Die Plasmide wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. V. Tsetlin (Shemyakin-Ovchinnikov-Institut für Bioorganische Chemie, Moskau, Russland) zur Verfügung gestellt und sequenziert.

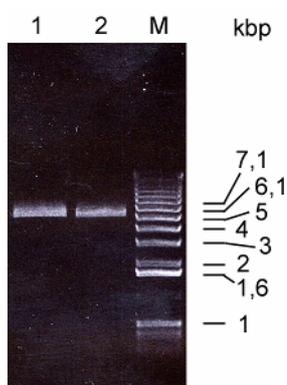


Abbildung 26: Agarose-Gelelektrophorese der gereinigten Plasmide pET-28a/δ-7N (Spur 1) und pET-28a/δ-10C (Spur 2).

Die Plasmide wurden mit dem Enzym Xho I verdaut, um die Größe der Konstrukte beurteilen zu können. M: Molekulargewichts-Standard.

Ausreichende Mengen der Plasmide wurden aus Bakterien isoliert, bevor die Expression gestartet wurde. Erste Expressionsversuche im kleinen Maßstab waren aber nicht erfolgreich. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass das Plasmid vor Beginn der Expression wieder aus den Bakterien ausgestoßen wurde. Wenn die eingebrachte DNA den Stoffwechsel der Bakterien irgendwie behindert, versuchen sie das Plasmid möglichst schnell wieder auszuschleusen.

2.3.2 Expression der α 7-Schleife

Die verschiedenen Konstrukte wurden in den Vektor pGEX-4T-1 (Firma Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Der Vektor enthält die DNA-Sequenz des Enzyms Glutathion-S-Transferase (GST), das als Fusionsprotein mit den entsprechenden inserierten Sequenzen exprimiert wird. Über dieses Protein kann sowohl der Nachweis mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen GST, als auch die Reinigung des Fusionsproteins erfolgen. Die Sequenzen mit kompletter Länge und insgesamt sieben gekürzte Versionen wurden durch die entsprechenden Primer mit Hilfe der PCR produziert. Zum Einsetzen der Sequenzen in den Vektor wurden die Restriktionsenzyme EcoR I und Xho I verwendet, mit denen sowohl die PCR-Produkte als auch der Vektor geschnitten wurde. Nach der Ligation, Transformation in die Bakterien und

Selektion der Kolonien mit der entsprechenden Antibiotikum-Resistenz wurde die aus den Bakterien isolierte DNA auf ihre Richtigkeit untersucht (siehe Abb. 27).

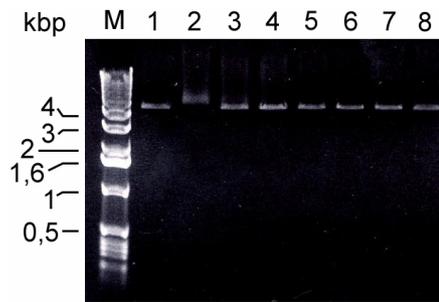


Abbildung 27: Herstellung der verschiedenen Konstrukte mit DNA der intrazellulären Schleife der $\alpha 7$ -Untereinheit. Gezeigt sind einige zur Kontrolle verdaute Plasmide für vier verschiedene Konstrukte auf einem 1 %igen Agarosegel (Spuren 1 - 8). M: Molekulargewichts-Standard.

Anschließend wurden Plasmide sequenziert. Die Sequenzen aller acht Plasmide waren korrekt. Es wurde mit kleinen Probeexpressionen begonnen. Die DNA wurde in den entsprechenden Bakterienstamm (BL21 (DE3)) zur Expression eingebracht. In Volumina von je 4 ml Medium wurde eine Expression der Konstrukte für 3,5 h durch Induktion mit IPTG gestartet. Über SDS-PAGE und Western-Blot wurde nach Aufschluss der Bakterien nach den gewünschten Expressionsprodukten gesucht. Durch Anfärben der Blotmembran mit Hilfe eines Antikörpers gegen die Glutathion-S-Transferase konnte gezeigt werden, dass die gesuchten Proteine tatsächlich synthetisiert worden waren (siehe Abb. 28). Unter denselben Bedingungen ohne Induktion der Expression mit IPTG wurde keine Expression des Fusionsproteins detektiert.

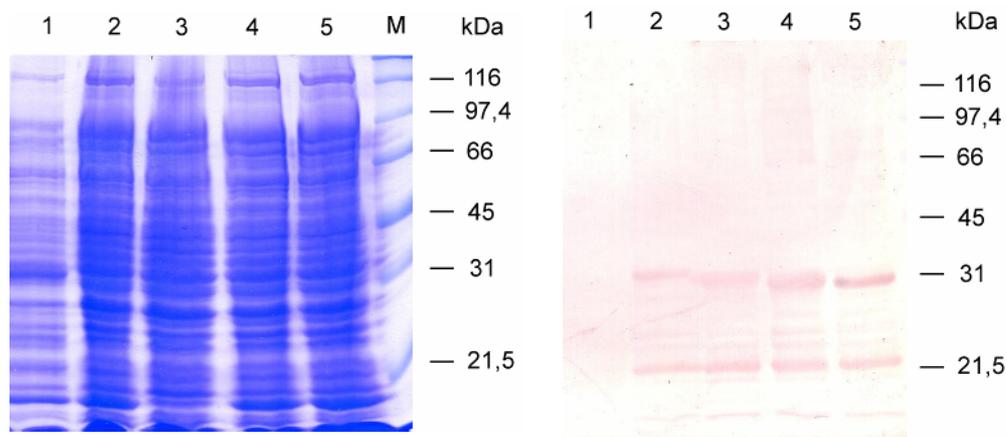


Abbildung 28: Probeexpression in E. coli.

SDS-PAGE (links) und Western-Blot (rechts) von Bakterienhomogenaten.

Spur 1: ohne Induktion mit IPTG, Spur 2: Expression der $\alpha 7$ -Schleife (komplett),

Spur 3: $\alpha 7$ -Schleife -10 AS am C-Terminus, Spur 4: $\alpha 7$ -Schleife -19 AS, Spur 5: $\alpha 7$ -Schleife -29 AS, M: Molekulargewichts-Standard.

Die Expression in einem größeren Volumen Medium und auch in anderen Medien erwies sich in mehreren Versuchen als nicht erfolgreich. Bei einigen Expressionen wurde zumindest eine kleine Menge des gesuchten Proteins gefunden. Es wurden dann verschiedene Methoden zur Aufreinigung der Proteine getestet, die aber auch keine akzeptable Ausbeute an Protein erbrachten. Ein Beispiel eines Reinigungsver-

suches über Glutathion-Sepharose zeigt Abb. 29. Die exprimierten Proteine wurden wahrscheinlich durch Proteasen verdaut.

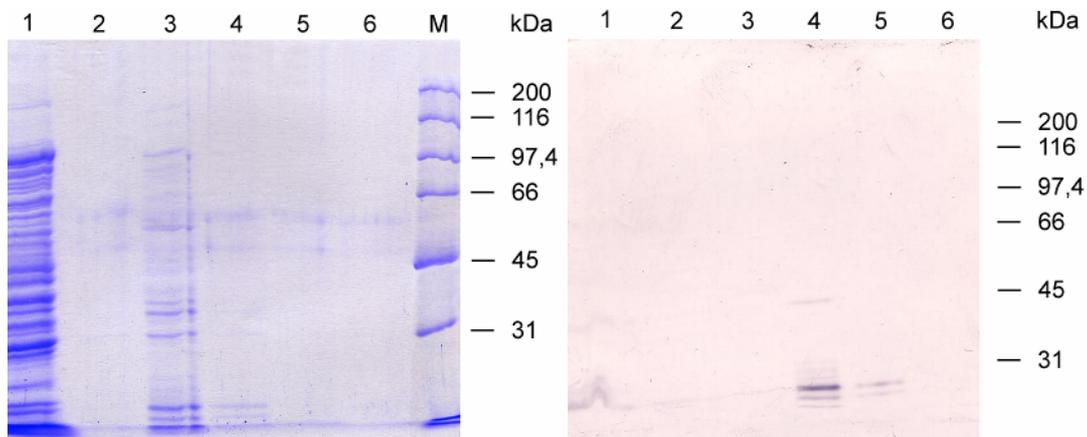


Abbildung 29: Versuch der Reinigung des GST-Fusionsproteins über eine Glutathion-Sepharose-Säule. SDS-PAGE (links) und Western-Blot (rechts) von Bakterienhomogenat (Spur 1) und Elutionsfraktionen 1 bis 5 von der Glutathion-Sepharose-Säule (Spuren 2 - 6). Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, der Blot mit Hilfe eines anti-GST-Antikörpers und der Alkalischen-Phosphatase-Reaktion. In Elutionsfraktion 2 und 3 (Spuren 4 und 5) wurden kleine Fragmente des gesuchten Proteins gefunden. Das komplette Fusionsprotein hat eine Größe von knapp 40 kDa. M: Molekulargewichts-Standard.

Als weitere Variante wurde ein von den bisher verwendeten stark abweichendes Expressionsprotokoll getestet. Die Bakterien (BL21 (DE3)) wurden frisch mit den Plasmiden für das komplette Konstrukt und die am stärksten verkürzte Version transformiert. Anschließend erfolgte eine sehr kurze Expressionszeit von nur 1,5 h bei sehr niedriger Temperatur (25 °C) und die Aufarbeitung der Bakterien mit einem Puffer, der einen hohen Anteil an Sucrose enthielt. Der Zuckergehalt des Puffers sollte die Proteine besser stabilisieren und vor dem Aggregieren bewahren. Nach Aufschluss der Bakterien entstand ein klares Homogenat, das über eine Glutathion-Sepharose-Säule gegeben wurde. An diese Säulenmatrix sollte nur das exprimierte Fusionsprotein binden. Nach der Elution und Analyse der Eluatfraktionen über ein SDS-PAGE-Gel und Western-Blot konnte die Expression der gewünschten Proteine nachgewiesen werden (siehe Abb. 30).

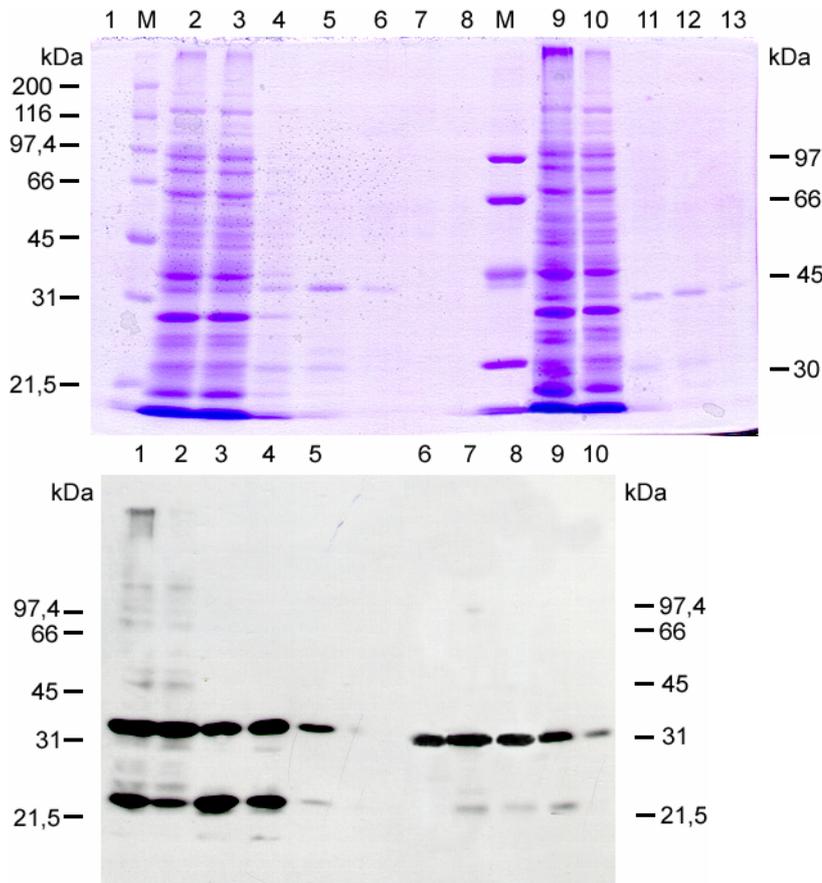


Abbildung 30: Expression in BL21 (DE3).

SDS-Page (oben) und Western-Blot (unten) von Bakterienhomogenat (Spuren 2(Gel) bzw. 1(Blot) und 9(Gel) bzw. 6(Blot)), Durchlauf der Säule (Spuren 3 bzw. 2 und 10 bzw. 7), Elutionsfraktionen 1 bis 3 (Spuren 4 - 6 bzw. 3 - 5 und 11 - 13 bzw. 8 - 10). Links ist jeweils das komplette $\alpha 7$ -Konstrukt zu sehen, rechts das um 7 AS am N-Terminus und 29 AS am C-Terminus verkürzte Konstrukt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, vom Blot ist die ECL-Färbung mit einem anti-GST-Antikörper abgebildet. M: Molekulargewichts-Standards.

Hier sind die Protein-Banden der Fusionsproteine gut in den Elutionsfraktionen (Spuren 4 - 6 und 11 - 13) im Gel und in allen Fraktionen im entsprechend Antikörper-gefärbten Western-Blot zu erkennen. Der Proteingehalt der Fraktion von Spur 5 betrug 30 μg . Allerdings ist auch zu sehen, dass eine größere Menge GST ohne das N-terminal angehängte Protein von der Säule eluiert wurde. In den Bakterien scheint durch Proteasen das frisch hergestellte Protein gespalten oder nicht vollständig exprimiert worden zu sein. Während der Reinigung waren ständig große Konzentrationen Protease-Inhibitoren vorhanden. Die Proteinbande mit dem höchsten Proteingehalt an Fusionsprotein (Spur 5 des in Abb. 30 gezeigten Gels) wurde aus dem Gel geschnitten. Das Protein wurde tryptisch verdaut und die entstandenen Peptide mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie analysiert (siehe Abb. 31). Durch Massenfingerprint und teilweise Sequenzierung eines C-terminalen Peptids konnte das Fusionsprotein eindeutig identifiziert werden.

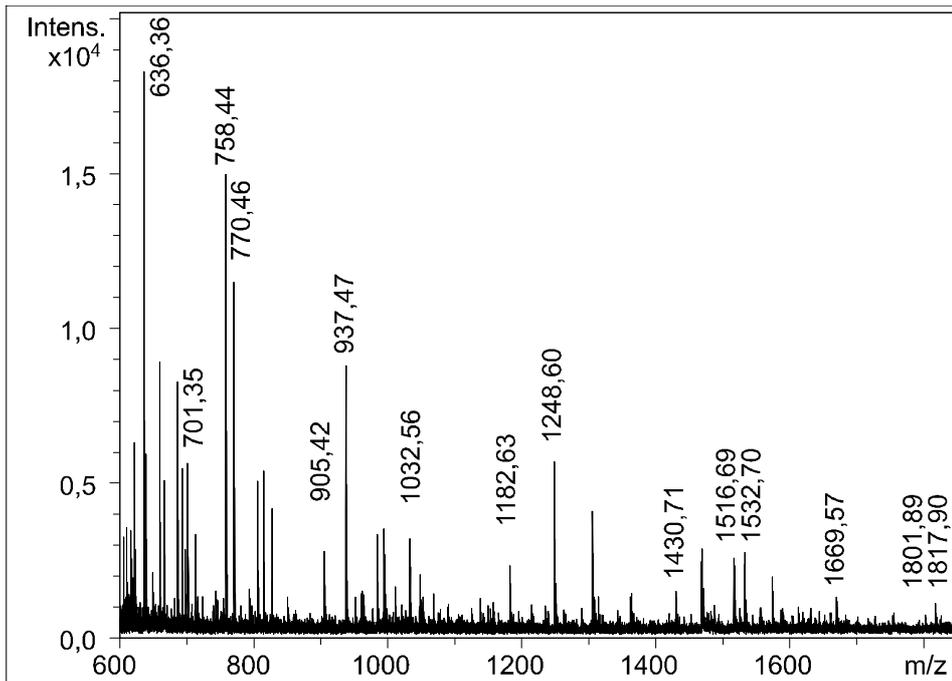


Abbildung 31: MALDI-TOF-Spektrum des gereinigten Fusionsproteins aus *E. coli*. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Gesamtspektrum, in dem die eindeutig identifizierten Peaks der Peptide mit ihren m/z -Verhältnissen markiert sind. Es wurden Peptide aus dem gesamten Bereich des Fusionsproteins gefunden. Das Peptid mit $m/z = 758,44$ wurde mittels Peptid-Mass-Fingerprint sequenziert. Es handelt sich hierbei um den C-Terminus des Proteins mit der Sequenz ILEEVV.

Auch die Experimente mit einem anderen Bakterienstamm (NM522) zeigten die Expression der Proteine, allerdings in viel kleinerer Menge als bei BL21 (DE3) (siehe Abb. 32). Dafür wurde aber das jeweilige Fusionsprotein in größerem Anteil „als Ganzes“ von der Säule eluiert, es ist kaum GST allein nachzuweisen. Eine mögliche Begründung dafür ist, dass in diesem Bakterienstamm die Proteasen nicht so aktiv wie in BL21 (DE3)-Zellen sind.

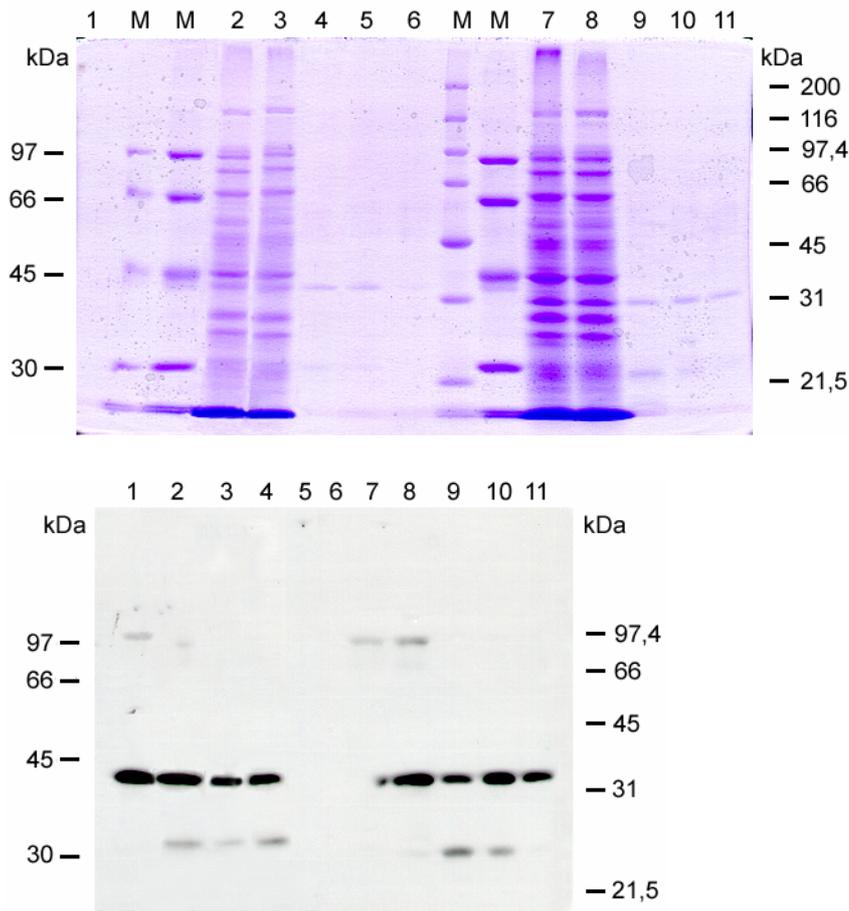


Abbildung 32: Expression in NM522.

SDS-Page (oben) und Western-Blot (unten) von Bakterienhomogenat (Spuren 2 und 7(Gel) bzw. 1 und 7(Blot)), Durchlauf der Säule (Spuren 3 bzw. 2 und 8), Elutionsfraktionen 1 bis 3 (Spuren 4 - 6 bzw. 3 - 5 und 9 - 11). Links ist jeweils das komplette $\alpha 7$ -Konstrukt zu sehen, rechts das um 7 AS am N-Terminus und 29 AS am C-Terminus verkürzte Konstrukt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, vom Blot ist die ECL-Färbung mit einem anti-GST-Antikörper abgebildet. M: Molekulargewichts-Standards.

Bei dem Versuch, die Expression nach derselben Vorschrift exakt zu wiederholen, zeigten sich die folgenden Probleme. Das Lysat der Bakterien wurde nicht als klare Lösung erhalten, wodurch sich die Reinigung über die Glutathion-Sepharose sehr schwierig gestaltete (siehe Abb. 33). Im Lysat waren noch viele Proteine aggregiert, weswegen keine Bindung an die Säulenmatrix stattfinden und damit auch keine Reinigung des gesuchten Proteins erfolgen konnte.

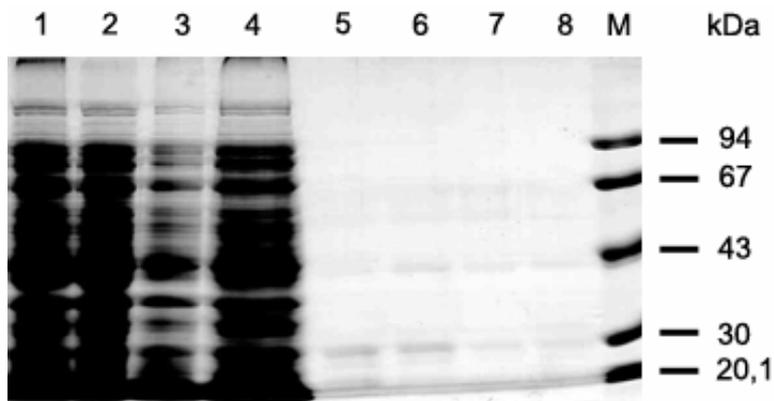


Abbildung 33: SDS-PAGE einer Aufarbeitung von Bakterien entsprechend dem vorher erfolgreichen Protokoll. Zu sehen sind die aufgetragenen Proteine des Überstands und des Pellets des Bakterienlysats (Spur 1 und 2), der Durchlauf und die Waschlösung der Glutathion-Sepharose-Säule (Spur 3 und 4) und die vier Elutionsfraktionen (Spuren 5 - 8). Es wurde kaum exprimiertes Fusions-protein in den Elutionsfraktionen gefunden. M: Molekulargewichts-Standard.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bedingungen für die Bakterienexpression weiter zu optimieren sind, bevor eine größere Menge des gesuchten Proteins auf einmal hergestellt werden kann. Schließlich wurde die Expression der GST-Fusionsproteine eingestellt, es sollen in Zukunft Fusionsproteine mit dem Maltose-Binding-Protein (MBP) hergestellt werden. Diese Konstrukte sollen bessere Löslichkeit und Renaturierung der Proteine zeigen.

2.4 Expression in zellfreien Systemen

Für problematisch zu exprimierende Proteine, die eventuell sogar toxisch auf die Wirtszelle wirken können, gibt es die Möglichkeit, die Expression im kleineren Maßstab im zellfreien System durchzuführen. Dabei wird ein Lysat von *E. coli* verwendet, das von den natürlichen Nuklein- und Aminosäuren befreit worden ist. Dieses Lysat enthält aber alle zur Transkription und Translation notwendigen Enzyme. Die benötigten Amino- und Nukleinsäuren sowie energieliefernde Substanzen werden vor Reaktionsbeginn zugegeben. Dieses System ermöglicht eine große Variabilität der Expressionsbedingungen und damit auch die Herstellung auf anderem Weg nur mit hohem Aufwand herzustellender Proteine. Allerdings schwankt die zu exprimierende Proteinmenge je nach verwendetem System zwischen wenigen $\mu\text{g/ml}$ und bis zu 5mg/ml .

2.4.1 Rapid Translation System™ (Roche)

Die Firma Roche vertreibt ein System, mit dessen Hilfe man in einfachen Schritten Proteine herstellen können sollte. Dabei wird ein optimiertes *E. coli*-Lysat eingesetzt, zu dem die verschiedenen Pufferlösungen mit den notwendigen Substanzen und die gewünschte DNA gegeben werden. Das zu exprimierende Gen sollte in einem Vektor unter Einfluss eines T7-Promotors und -Terminators stehen. Außerdem muss die Ribosomen-Bindungsstelle in der mRNA vorhanden sein. In einer gekoppelten *In vitro*-Reaktion wird zunächst das Gen von der T7-Polymerase in mRNA umgeschrieben, anschließend wird das Protein mit Hilfe der Ribosomen des Lysates nach der Sequenz der RNA synthetisiert. Das Protein sollte nach einigen Stunden Reaktion aus dem Lysat isoliert werden können.

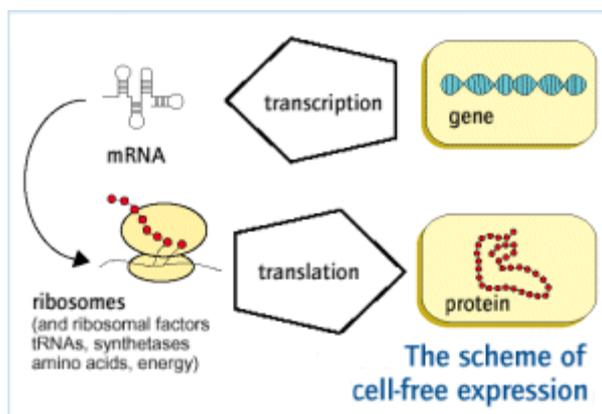


Abbildung 34: Schema der *In vitro*-Transkription und -Translation. Darstellung der Firma Roche zur Erläuterung des Systems der zellfreien Expression von Proteinen.

Laut Herstellerangaben können in diesem System auch herkömmliche Vektoren von der Expression in *E. coli* verwendet werden. Es ist jedoch vorteilhaft, das gewünschte Gen in die für die in vitro-Reaktion optimierten Vektoren umzuklonieren. Für die ersten Versuche wurden die bereits vorhandenen Plasmide mit den Genen für die intrazellulären Schleifen der δ - und der $\alpha 7$ -Untereinheit benutzt. Dazu wurden 50 μ l-Ansätze nach der Vorschrift der Firma Roche vorbereitet. Beim ersten Versuch wurden insgesamt acht Reaktionen gestartet:

- eine Positivkontrolle mit einem mitgelieferten GFP-Plasmid (zur Überprüfung der korrekten Vorbereitungen)
- drei Reaktionen mit den δ -Schleifen-Konstrukten und
- vier verschieden lange Konstrukte für die $\alpha 7$ -Schleife.

Es hat sich gezeigt, dass bei der Vorbereitung der Reaktionen besonders sauberes Arbeiten notwendig ist, da sonst RNAsen in die Lösungen gelangen können und dann während der Reaktion die gerade entstehende mRNA zerstören.

Die Reaktionsgefäße wurden nach 6 h bei 30 °C im Thermocycler bei -20 °C eingefroren und am nächsten Tag auf Eis aufgetaut. Zunächst wurde die erfolgreiche Expression des GFP durch Bestrahlung der Gefäße mit UV-Licht nachgewiesen (siehe Abb. 35).

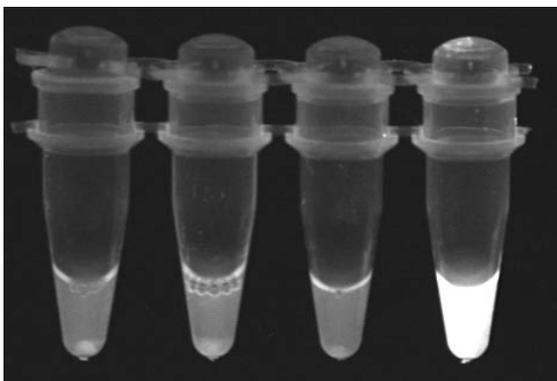


Abbildung 35: Versuchsansätze der zellfreien Expression. Abgebildet sind die Reaktionsgefäße der Positivkontrolle mit GFP (rechts) und drei der Reaktion mit eigenen Plasmiden (links). Die Lösungen wurden mit UV-Licht bestrahlt und damit das GFP zur Fluoreszenz angeregt.

Da die Kontrollreaktion erfolgreich abgelaufen war, wurden die Proteine der acht Ansätze mit Aceton gefällt und mit SDS-Probenpuffer zur Denaturierung versetzt. Über eine SDS-PAGE und anschließenden Western-Blot wurden die Reaktionsansätze auf erfolgreiche Expression der gesuchten Proteine getestet (siehe Abb. 36).

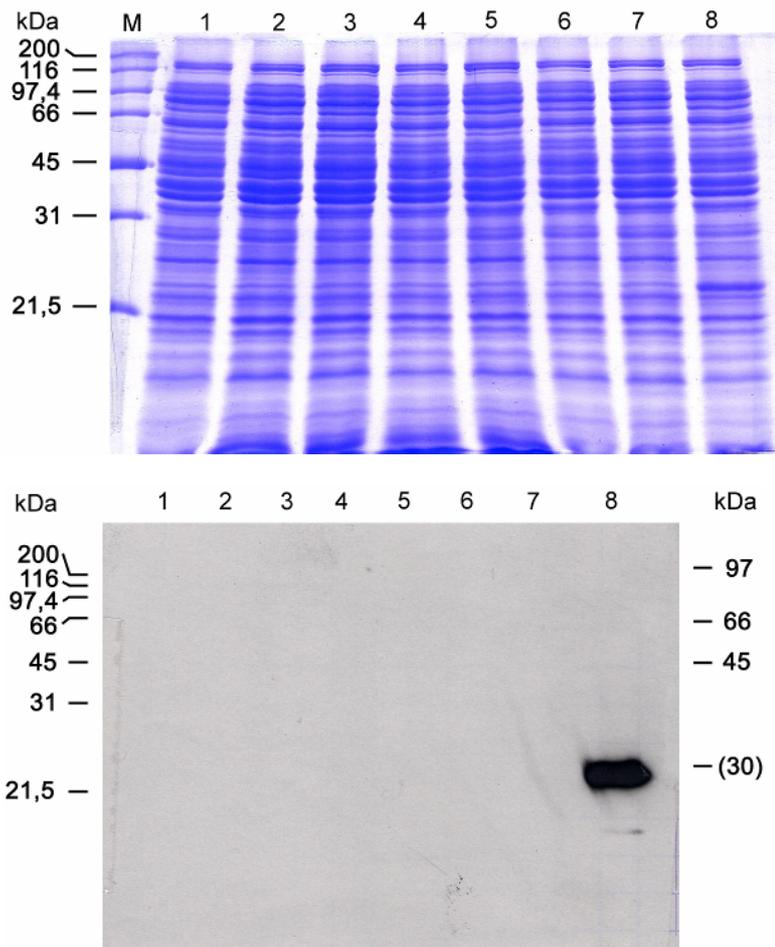


Abbildung 36: Expressionsversuche mit verschiedenen Konstrukten im RTS-System der Firma Roche. SDS-PAGE (oben) und Western-Blot (unten) der kompletten Versuchsansätze. Die Proteine wurden nach der Reaktion gefällt und auf das Gel aufgetragen. Die Spuren 1 - 7 zeigen Reaktionen mit DNA-Konstrukten für die δ - und die $\alpha 7$ -Schleifen. In Spur 8 ist die Positivkontrolle aufgetragen. Deutlich ist das exprimierte GFP sowohl im Gel als auch im Western-Blot erkennbar. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, vom Blot ist die ECL-Färbung mit einem anti-His₆-Tag-Antikörper zu sehen. M: Molekulargewichts-Standard.

Außer dem Kontrollprotein GFP wurde keines der gesuchten Proteine nachgewiesen. Deshalb wurde ein weiterer Versuch mit denselben Plasmiden für die δ -Schleife und den noch nicht getesteten Konstrukten für $\alpha 7$ unternommen. Auch hier wurde wieder die Positivkontrolle über GFP eingesetzt. Die Reaktion wurde erneut bei 30 °C für 6 h durchgeführt, allerdings unter leichtem Schütteln im Wasserbad. Nach Überprüfung der erfolgreichen Expression der Kontrolle (s. o.), wurden die Proteine über eine SDS-PAGE und Western-Blot untersucht (siehe Abb. 37). Auch hier zeigte sich keine Expression der gesuchten Proteine.

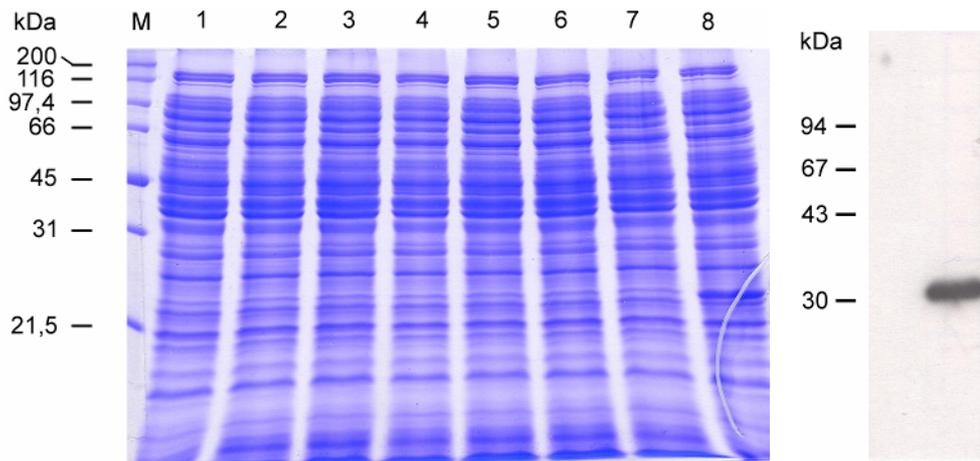


Abbildung 37: Expressionsversuch mit den $\alpha 7$ -Konstrukten unter veränderten Bedingungen. SDS-PAGE und ein Teil des Western-Blots der Proteine aus den Expressionsversuchen. In Spur 1 - 7 sind die Proteine der Ansätze mit $\alpha 7$ -Konstrukten aufgetragen, in Spur 8 ist als Positivkontrolle GFP zu erkennen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, vom Western-Blot ist die ECL-Färbung mit einem anti-His₆-Tag-Antikörper gezeigt.

Da die bisher beschriebenen Versuche mit den nicht dafür optimierten Plasmiden unternommen wurden, sollten jetzt die entsprechenden DNA-Sequenzen in die vom Hersteller für das System mitgelieferten Vektoren eingebaut werden. Dazu wurde aus dem Plasmid mit der kompletten δ -Schleife mit Hilfe der Restriktionsenzyme Nde I und Xho I die betreffende Sequenz herausgeschnitten. Der ausgewählte Vektor pIVEX2.3 MCS der Firma Roche enthält dieselben Schnittstellen in der Multiple Cloning Site, so dass der Vektor mit denselben Enzymen aufgeschnitten werden konnte. Nach der Ligation der DNA-Stücke wurden Bakterien mit dem Plasmid transformiert und über die Selektion mit dem Antibiotikum Ampicillin einige Klone mit dem richtigen Konstrukt ausgewählt. Eine ausreichende Menge der DNA wurde präpariert und durch Kontrollverdau auf die Richtigkeit der Plasmide überprüft (siehe Abb. 38).

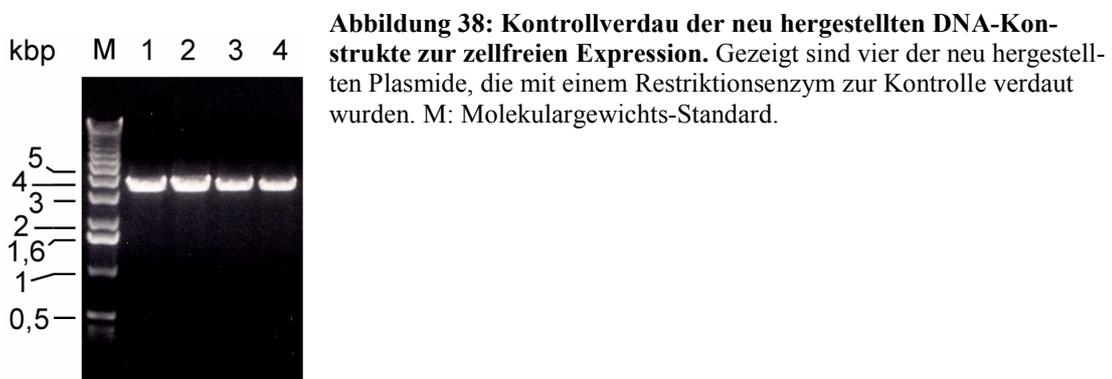


Abbildung 38: Kontrollverdau der neu hergestellten DNA-Konstrukte zur zellfreien Expression. Gezeigt sind vier der neu hergestellten Plasmide, die mit einem Restriktionsenzym zur Kontrolle verdaut wurden. M: Molekulargewichts-Standard.

Mit dem so hergestellten Plasmid wurde ein neuer Expressionsversuch unternommen. Um das gesuchte Protein besser herstellen zu können, wurden die Reaktionsbe-

dingungen etwas variiert. Zunächst wurde eine Reaktion bei 30 °C über 4 h durchgeführt, anschließend wurden wie vorher die Proteine analysiert (siehe Abb. 39).

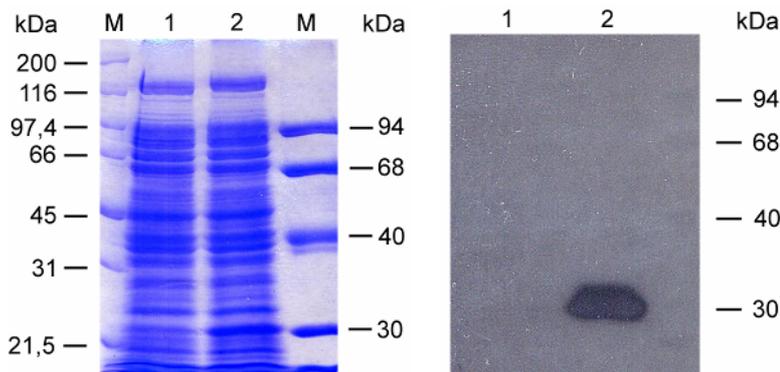


Abbildung 39: Expressionsversuch mit optimierten Plasmiden für zellfreie Expression.

SDS-PAGE und Western-Blot der gefällten Proteine der Reaktionen. In Spur 1 ist die Reaktion mit dem DNA-Konstrukt für die δ -Schleife zu sehen, in Spur 2 die Positivkontrolle mit GFP. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, vom Blot ist die ECL-Färbung mit einem anti-His₆-Tag-Antikörper zu sehen. M: Molekulargewichts-Standards.

Da auch auf diesem Weg das Protein nicht erfolgreich exprimiert wurde, wurden weitere Temperaturen getestet. Es wurden Reaktionen bei 28 °C und 25 °C mit zwei verschiedenen DNA-Präparationen des δ -Konstruktes durchgeführt, die aber auch keine Expression des gewünschten Proteins zeigten.

2.4.2 Cell-Free Protein Biosynthesis™ (RiNA GmbH)

Bei dem In vitro-System der RiNA GmbH wird dasselbe Prinzip wie bei der Firma Roche angewandt. In einem E. coli-Lysat werden die gewünschte DNA und die Ausgangssubstanzen für die Reaktion gemischt, danach lässt man mehrere Stunden bei einer für jedes Protein optimierten Temperatur die Reaktion ablaufen. Anschließend werden die Proteine analysiert oder können gereinigt werden. Mit Hilfe von Herrn Thorsten Lamla (Arbeitsgruppe Prof. V. Erdmann, Institut für Chemie - Biochemie, FU Berlin), konnte das System mit dem δ -Schleifen-Konstrukt (im Vektor pET-15b) getestet werden. Zum Nachweis der Expression eines Proteins wurde mit C¹⁴ radioaktiv markiertes Leucin verwendet, das in einem bestimmten Verhältnis zu den anderen Aminosäuren (inklusive Leucin) gemischt wurde. Nach der Reaktion über 90 min bei 37 °C wurden die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, um die nicht eingebauten Aminosäuren und alle Nukleotide zu entfernen. Die gefällten Proteine wurden auf ihre Radioaktivität untersucht, um festzustellen, wie viele markierte Aminosäuren eingebaut wurden. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, ob überhaupt Expression stattgefunden hatte. Nach dieser Radioaktivitätsmessung wurden in diesem ersten Versuch etwa 13 µg/ml des gewünschten Proteins in einem An-

satz von 50 μl hergestellt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über SDS-PAGE analysiert und von diesem Gel eine Autoradiographie angefertigt (siehe Abb. 40).

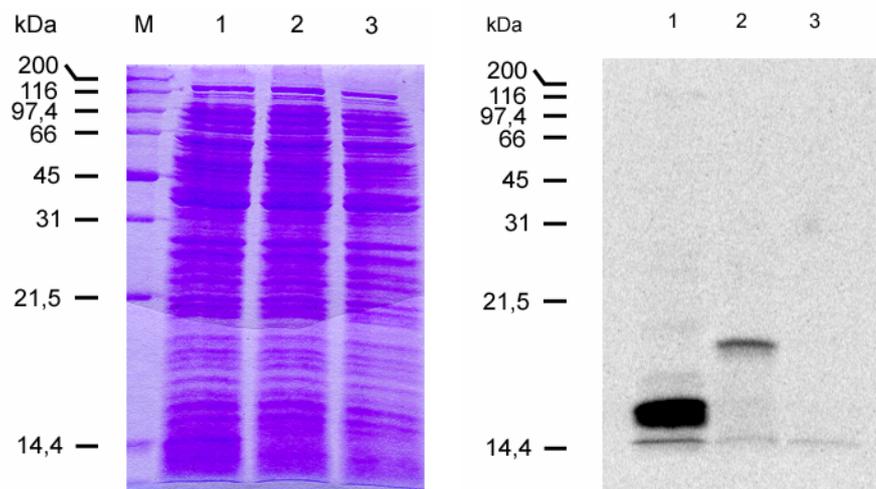


Abbildung 40: Expression von δ - und α 7-Schleife im zellfreien Expressionssystem der RiNA AG. SDS-PAGE und Autoradiographie der Proteine der Reaktionsansätze von FABP (Fatty Acid Binding Protein, Positivkontrolle, Spur 1), δ -Schleife (Spur 2) und α 7-Schleife (Spur 3). Eine geringe Expression der δ -Schleife ist zu erkennen, die Reaktion für die α 7-Schleife war nicht erfolgreich. M: Molekulargewichts-Standard.

Da in diesem kleinen Ansatz nur eine sehr kleine Menge Protein hergestellt wurde, wurde die Reaktion noch einmal mit einem Volumen von 250 μl wiederholt. Aus dieser Reaktionslösung wurde über eine kleine Ni^{2+} -Affinitätssäule eine Reinigung des exprimierten Proteins durchgeführt (vgl. Abb. 41).

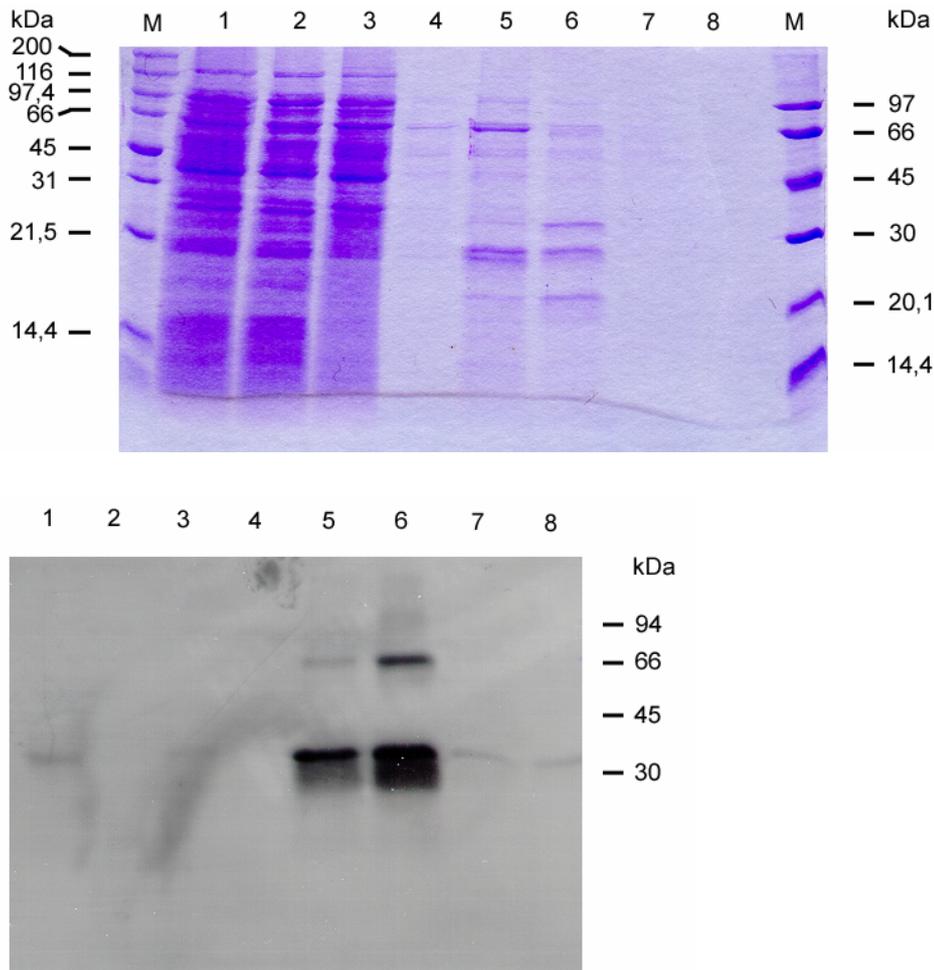


Abbildung 41: Expression und Reinigung der δ -Schleife über Ni^+ -Affinitätschromatographie. SDS-PAGE (oben) und Western-Blot (unten) der gefällten Proteine aus den verschiedenen Arbeitsschritten.

Spur 1: Gesamtprotein des Reaktionsansatzes, Spur 2: Durchlauf durch die Chromatographiesäule, Spuren 3 und 4: Waschfraktionen, Spuren 5 – 8: Elutionsfraktionen von der Säule. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt, vom Western-Blot ist die ECL-Färbung mit einem anti- His_6 -Tag-Antikörper gezeigt.

In den Elutionsfraktionen konnte das δ -Schleifen-Protein nachgewiesen werden, obwohl es nicht sauber von der Säule eluiert wurde. Es ist auch zu sehen, dass das Protein nicht in dem zu erwartenden Größenbereich von 18 kDa auf dem Gel erscheint, sondern bei etwa 40 kDa und eine Bande sogar beim vierfachen Molekulargewicht erscheint. Das Protein wurde also in kleinerer Menge exprimiert (ungefähr 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ entsprechend der Radioaktivitätsbestimmung). Außerdem scheint es auch in diesem System zur Aggregation zu neigen, und diese Aggregate werden im SDS-PAGE ebenfalls nicht getrennt.