

Max Planck Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik
Dresden

Expression und Reinigung des Apolipoproteins E3 in *Escherichia coli* und Insektenzellen

zur

Erlangung des Bachelor-Grades
der Mathematischen/Naturwissenschaftlichen/ Informatischen Fakultät
der Hochschule Mittweida/Sachsen

Vorgelegt im Jahr 2010

von **Eric Thieme**

Dekan:	Prof. Uwe Schneider
Betreuer der Hochschule:	Prof. Dr. Röbbbe Wünschiers
Betreuer am Max Planck Institut:	Dr. David Drechsel

Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Parkinson treten durch die steigende Alterserwartung immer häufiger auf. Um diese medikamentös behandeln zu können, müssen Pharmaka die Blut-Hirn-Barriere überwinden, die das Gehirn vor im Blut befindlichen Krankheitserregern und Toxinen schützt. Eine Möglichkeit stellt die Kopplung des Medikaments an ein Nanopartikel dar. Diese sind mit dem rezeptorspezifischen Apolipoprotein E (ApoE) ummandelt und ermöglichen so die Überwindung der Blut-Hirn-Barriere.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Expression und Aufreinigung des humanen Apolipoproteins E3 (hsApoE3) in *Escherichia coli* und die Untersuchung der Expressionsfähigkeit in SFplus-Insektenzellen.

Dazu wurde die cDNA Sequenz des hsApoE3 mit der Gensequenz der TEV-Proteasen-Schnittstelle sowie des Polyhistidin-Tags synthetisiert und in unterschiedliche pET Vektoren mit verschiedenen Fusionsproteinen kloniert, welche für die Expression Verwendung fanden. Als Fusionsproteine wurde entweder His6-Tag alleine oder der His6-Tag in Kombination mit einem GST, NusA, ZZ oder MBP-Tag verwendet. Das Fusionsprotein MBP-hsApoE3 wurde am stärksten exprimiert und konnte über den His6-Tag und einer anschließenden MBP-Affinitätschromatographie erfolgreich aufgereinigt werden.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Dresden, 10.09.2010

Unterschrift

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ApoE	Apolipoprotein E
Bac	Bakterielles artifizielles Chromosom
bp	Basenpaare
bidestH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
CV	Säulenvolumen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GST	Glutathion S-Transferase
HEK 293	Human Embryonic Kidney, Zelllinie 293
hsApoE3	Humanes Apolipoprotein E3
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
MBP	Maltose Binding Protein
NUSA	N-utilization substance A
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
pET	Plasmid Expression of T7 RNA Polymerase
SDS-Page	Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
TB	Terrific Broth
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEV	Tobacco Etch Virus
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
X-Gal	Brom-Chlor-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Selbständigkeitserklärung	3
Abkürzungsverzeichnis	4
Inhaltsverzeichnis	5
1 Einleitung.....	8
1.1 Zielsetzung und Fragestellung.....	13
2 Materialien	14
2.1 Chemikalien.....	14
2.2 Geräte	14
2.3 Enzyme und Antikörper	15
2.4 Puffer und Lösungen	16
2.5 Vektoren	17
2.6 Zellen.....	21
2.7 Medien.....	21
2.8 Selektionsplatten	22
2.9 Kitsysteme.....	22
2.10 Primer	22
2.11 Affinitätssäulen	23
2.12 Sonstiges.....	23
3 Methoden	24
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	24
3.1.1 Synthese des hsApoE3 Genkonstruktes	24
3.1.2 Restriktionsverdau der Vektoren.....	24
3.1.3 Ligation	24

3.1.4 Transformation und Selektion.....	25
3.1.4.1 Der DH5 α -Zellen	25
3.1.4.2 Der DH10bac-Zellen.....	26
3.1.4.3 Der BL21(DE3)-Zellen	26
3.1.5 Transfektion und Infektion der SFplus-Insektenzellen zur Virusproduktion.....	26
3.1.6 Polymerasekettenreaktion	27
3.1.7 Auftrennen der DNA im Agarosegel	28
3.1.8 Präparation von Plasmid-DNA.....	29
3.1.9 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	29
3.1.10 Sequenzierung	29
3.2 Überexpression und Reinigung von hsApoE3	30
3.2.1 Überexpression in <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	30
3.2.2 Extraktion und Aufbereitung des Überstandes.....	30
3.2.3 Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus den pET-Plasmidkonstrukten	31
3.2.3.1 Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus den pET-Plasmidkonstrukten über den His6-Tag.....	31
3.2.3.2 Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus dem pET MBP-hsApoE3 Plasmidkonstrukt über His6- und MBP-Tag.....	32
3.2.3.3 Zweifache Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus dem pET MBP-hsApoE3 Plasmidkonstrukt nach TEV- und 3C-Protease Behandlung	33
3.2.4 Expression des hsApoE3 in SFplus-Insektenzellen	33
3.3 Proteinnachweis und Messung	33
3.3.1 Probenvorbereitung	34
3.3.2 Natrium Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese	34
3.3.3 Coomassie-Färbung.....	35
3.3.4 Western Blot.....	35
3.3.5 Bradford-Test	36

3.3.6 Bestimmung der Konzentration von Proteinen	36
4 Ergebnisse.....	37
4.1 Expression in <i>Escherichia coli</i>	37
4.1.1 Induktion des pET 24d-hsApoE3 Plasmidkonstrukt.....	37
4.1.2 Klonierung von hsApoE3 in die Plasmidkonstrukte zur Expression im bakteriellen System	38
4.1.3 Induktionsverhalten von hsApoE3 in den verschiedenen pET Plasmidkonstrukten.....	39
4.1.4 Einfache His6-Tag Affinitätschromatographie	41
4.1.5 Löslichkeit der Zellpellets	46
4.1.6 Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus dem pET MBP-hsApoE3 Plasmidkonstrukt über His6- und MBP-Tag	47
4.1.7 Zweifache Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus dem pET MBP-hsApoE3 Plasmidkonstrukt mit TEV- und 3C-Protease Behandlung.....	49
4.2 Expression des hsApoE3 in dem Baculovirus-System.....	52
4.2.1 Klonierung des rekombinanten Baculovirengenoms	52
4.2.2 Expressionskinetik	54
5 Diskussion und Ausblick	55
5.1 Expression im bakteriellen System	55
5.2 Expression über den Baculovirus	58
6 Abbildungsverzeichnis	59
7 Tabellenverzeichnis	61
8 Literaturverzeichnis	62
9 Danksagung	65

1 Einleitung

Die Zahl der neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson, Alzheimer oder Multiple Sklerose ist in den letzten Jahren auf Grund der höheren Lebenserwartung drastisch angestiegen und stellt die Altersmedizin vor neue Herausforderungen. Gelingt kein Durchbruch in der Prävention und Therapie dieser Erkrankungen, wird diese Negativentwicklung in den nächsten Jahren weiter fortschreiten [1]. Ein Problem dem die Wissenschaftler gegenüberstehen, ist die Blut-Hirn-Barriere, die den „Zugang“ zum Gehirn für beispielsweise Rauschgifte stark beschränkt. Dies gilt aber nicht nur für Gifte, sondern auch für die Mehrheit therapeutisch wichtiger Pharmaka wie Antikrebsmedikamente, Antibiotika und eine Vielzahl von Medikamenten, die das zentrale Nervensystem schützen sollen. Um diese Barriere zu überwinden werden Medikamente an apolipoprotein-modifizierte Nanopartikel gebunden. Diese Partikel können dann mit Apolipoproteinrezeptoren an der Blut-Hirn Barriere wechselwirken, was in der endozytotischen Aufnahme ins Endothel und schließlich im Transport ins Gehirn resultiert [2].

Apolipoprotein E3

Humanes Apolipoprotein E ist ein 34 kDa großes Protein, das hauptsächlich in den Geweben der Leber und des Gehirns synthetisiert wird [3]. Es ist auf dem Chromosom 19 lokalisiert und liegt beim Menschen in drei unterschiedlich häufigen Allelen vor (E2, E3, E4). hsApoE3 ist die am häufigsten vorkommende Isoform [4]. Im menschlichen Organismus spielen die ApoE eine zentrale Rolle im Lipidstoffwechsel. Das hsApoE dient als hochaffiner Ligand für die zelluläre Aufnahme von Lipoproteinen über Low-Density-Lipoprotein- und Remnant-Rezeptoren [5]. Dazu bildet hsApoE mit Lipiden sogenannte Nanopartikel und schleust diese über die Membran in das Gewebe ein. Diese Eigenschaft soll in der gezielten Pharmakotherapie genutzt werden, um Wirkstoffe gegen degenerative Erkrankungen über die Blut-Hirn-Barriere zu transportieren, so dass diese im Gehirn ihre Wirkung entfalten können.

Proteinexpression und Proteinaufreinigung

Proteine bilden die Grundbausteine des Lebens. Sie treten in den vielfältigsten und komplexesten Formen auf und sind die essentiellen Träger der Lebensfunktionen in Zellen und damit in Organismen. Heutzutage finden Proteine in den verschiedensten Feldern der Wissenschaft und Industrie große Anwendung. Dafür müssen die Proteine überexprimiert und anschließend so isoliert werden, dass sie hochrein, aktiv und in hoher Konzentration vorliegen.

Die Separation der Proteine kann über konventionelle Methoden, wie beispielsweise der Extraktion, Filtration oder Zentrifugation erfolgen. Darüber hinaus werden zum Beispiel Verfahren des Ionenaustauschs oder der Affinitätschromatographie eingesetzt. Die Affinitätschromatographie ist eine der wirkungsvollsten Trennverfahren, um Proteine aufzureinigen. Dabei wird das Produkt basierend auf seiner Affinität zu einem bestimmten Liganden gereinigt. Da den meisten Proteinen eine solche Affinität fehlt, werden sie mit so genannten Tags fusioniert. Diese besitzen meist eine hohe Affinität zu einem Liganden. So kann das Protein mit Hilfe des gebundenen Tags separiert werden. Es gibt eine Reihe von Affinitätstags, von denen manche aus kurzen Peptidketten z.B. Polyhistidin-Tag und andere aus Proteinen z.B. Maltose Binding Protein-Tag (MBP-Tag) bestehen. Die Wahl des verwendeten Tags hängt vom Expressionssystem und nicht zuletzt vom zu exprimierenden Protein ab [6].

Der Polyhistidin-Tag besteht meistens aus sechs aufeinander folgenden Histidin-Aminosäuren (His6-Tag) und ist damit einer der kürzesten Tags. Er kann am N- oder C-Terminus eines Proteins fusioniert werden und behindert auf Grund seiner geringen Größe selten die korrekte Faltung und damit die Funktionsfähigkeit des Proteins. Seine Affinität zu einem Metallion-Chelatkomplex (beispielsweise ein Nickel-Nitrilotriessigsäure-Komplex) ermöglicht die Immobilisierung des mit dem His6-Tag markierten Proteins [7].

Das Maltose Binding Protein (MBP) ist ein in *E. coli* synthetisiertes Transportprotein, das spezifisch an Maltose oder Maltodextrin bindet und diese Zucker durch die Zytoplasmamembran befördert [8]. MBP bindet an immobilisierte Amylose und kann somit chromatographisch aufgereinigt werden [9].

Glutathion S-Transferase (GST) ist eine Enzymfamilie, die an der Entgiftung von Nitro- und Halogenverbindungen beteiligt ist. Durch den in einer Affinitätssäule immobilisierten Cofaktor Glutathion, kann ein GST-Fusionsprotein über den GST-Tag gereinigt werden [10].

Der ZZ-Tag besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Z-Domänen des Proteins A. Diese binden mit einer hohen Affinität an Immunglobulin G [11].

N-utilization substance A (NusA) ist wie das MBP ein *E coli* Protein. Es besitzt jedoch keine bekannte Affinität zu einem Liganden und dient daher hauptsächlich zur Solubilisierung von Proteinen. Für die Aufreinigung eines NusA-fusionierten Proteins muss deshalb oft ein weiterer Tag benutzt (z.B. His6-Tag) werden [12].

Das pET Escherichia coli Expressionssystem

Das bakterielle Expressionssystem ist bedingt durch den geringen Kostenaufwand, seine hohe Produktivität und seine schnelle Produktion rekombinanter Proteine eines der meisteingesetzten und bestuntersuchtesten Systeme. Es gibt eine Vielzahl an Vektoren und Wirtstämmen, die der Proteinexpression in bakteriellen Systemen dienen [13]. Dazu wird die cDNA eines Proteins in einen bakteriellen Vektor kloniert. Reguliert wird die Expression des Gens über einen Bakterienpromotor, der sich am Anfang der Expressionskassette befindet [14]. Es ist schwierig vorherzusagen, welcher Wirt und Promotor geeignet für die Produktion eines Zielproteins sind. Einer der am häufigsten eingesetzten Stämme ist *E. coli*.

Das gram negative Bakterium ist ein etablierter Wirtsorganismus für die industrielle und pharmazeutische Produktion rekombinanter Proteine. Es finden aber auch andere Stämme wie z.B. *Bacillus*, *Caulobacter*, *Pseudomonas* oder *Streptomyces* Anwendung [15].

In der vorliegenden Arbeit wird das pET Vektorsystem genutzt. Es ist eines der leistungsfähigsten Systeme für die Klonierung und Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*. Die in den pET Vektor klonierten Zielgene stehen unter der Kontrolle der sehr stabilen bakteriophagen T7 Transkription. Die Expression findet durch die in der Wirtszelle befindlichen T7 RNA Polymerasen statt. Die T7 RNA Polymerase ist promotorspezifisch und transkribiert nur DNA, die hinter einem T7 Promotor kloniert wurde [16]. Ein weiterer Vorteil der T7 RNA Polymerase ist die Elongationsgeschwindigkeit der entste-

henden Peptidketten, die bei dieser etwa fünf mal höher als die einer *E. coli* RNA Polymerase ist [13]. Um die Expression zu regulieren, besitzen die pET Vektorsysteme den sogenannten T7lac Promotor. Ein *lac* Operator, welcher die Transkription blockiert, ist dem T7 Promotor nachgeschaltet. Des Weiteren befindet sich auf dem pET Vektor das *lacI*-Gen, welches für das *lacI* Repressorprotein kodiert. Dieses bindet in Abwesenheit von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) oder Laktose an den *lacI* Operator, hemmt den T7 Promotor und damit die Expression des Zielproteins. Die Expression wird durch die Zugabe von IPTG induziert. Dieses lagert sich an den *lacI* Repressor an und führt zu einer Konformationsänderung, so dass sich dieser nicht mehr an den *lacI* Operator anlagern und den T7 Promotor nicht mehr hemmen kann [16].

Plasmid-DNA wird in Bakterienstämmen synthetisiert denen das T7 RNA Polymerase-Gen fehlt. Somit wird eine Proteinexpression ausgeschlossen. Weiterhin wird eine mögliche Plasmidinstabilität eliminiert, die bedingt durch die Produktion von für den Wirtsorganismus toxischen Proteine zustande kommen kann. Als Expressionssystem wird der *E. coli* Stamm BL21(DE3) verwendet [16].

Das Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionssystem

Das Baculovirussystem ist ein weit verbreitetes System, um Gene in kultivierten Insektenzellen und Insektenlarven zu exprimieren [17]. Im Gegensatz zu bakteriellen System ist das Baculovirus-Expressionssystem ein eukaryotisches System, welches viele der Proteinmodifikationen, Prozesse und Transportsysteme besitzt, wie sie auch in höheren eukaryotischen Zellen zu finden sind. Zusätzlich sind die meisten der überexprimierten rekombinanten Proteine löslich und können leicht aufgereinigt werden [18]. Außerdem ist das Arbeiten mit den Baculoviren sicherer als mit den meisten Säugetierviren, da die Baculoviren ein sehr enges Wirtsspektrum besitzen, das auf spezifische Invertebratenspezies begrenzt ist [17]. Mit steigender Nachfrage und immer größer werdenden Anwendungsfeldern des Systems in der molekularen Biologie, wurden neue Systeme, Transfektionsreagenzien, spezielle Medien und Vektoren entwickelt [19].

Eines dieser Systeme stellt das Bac-to-Bac Baculovirus-Expressionssystem dar (Bac = bakterielles, artifizielles Chromosom). Dieses basiert auf der seitenspezifischen Transposition bestimmter Gensequenzen in einem von Baculovirus abgeleiteten Vektor

[19]. Der Vektor wird als Bacmid bezeichnet und enthält eine geringe Anzahl an Kopien des mini-F Replikons, ein Resistenzgen gegen Kanamycin und ein DNA-Segment, das das lacZ α -Peptid kodiert. In das lacZ α -Gen wurde ein kurzes Segment integriert, das den Leserahmen des lacZ α -Peptids nicht unterbricht und eine Bindungsstelle für die bakterielle Transposase Tn7 einschließt. Das Bacmid-Plasmid wird in DH10bac *E. coli* repliziert und vervollständigt somit die lacZ-Deletion des Bakterienchromosoms. Dadurch kommt es in Gegenwart von Brom-Chlor-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) und IPTG zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonien, welche das Bacmid-Plasmid enthalten [17].

Die Erzeugung eines rekombinanten Bacmid-Plasmids erfolgt durch die Transposition eines Tn7-Elements, das von einem pFastBac Spenderplasmid stammt, in die Tn7-Bindungsstelle des Bacmids. Dafür muss die Gensequenz des rekombinant herzustellenden Proteins in das pFastBac Spenderplasmid kloniert werden [19]. Das Tn7-Segment auf dem pFastBac Plasmid beinhaltet eine Expressionskassette, die aus einem baculovirus-spezifischen Promotor zur Proteinexpression in Insektenzellen, der multiplen Klonierungsstelle, der Gensequenz für die Gentamicin Acetyltransferase und einem SV40 Polyadenylierungs-Signal besteht. Die Gentamicin Acetyltransferase macht den Wirt gegenüber Gentamicin resistent.

Die für die Transposition notwendige Transposase wird durch ein in den DH10bac *E. coli* Zellen vorliegendes Helferplasmid kodiert, welches zusätzlich das Resistenzgen gegen Tetracyclin besitzt. Die Transposition des Tn7-Segments von dem pFastBac Plasmid in die Tn7-Bindungsstelle des Bacmids unterbricht die Expression des lacZ α -Gens. Kolonien die rekombinante Bacmid-Plasmide enthalten, sind gegenüber Gentamicin, Tetracyclin und Kanamycin resistent und können über die Blau-Weiß-Selektion identifiziert werden. Die weißen Kolonien werden für die Transfektion der Insektenzellen verwendet [17].

1.1 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Bachelorarbeit war die Etablierung einer Methode zur Expression und Reinigung des humanen Apolipoproteins E3 in dem Expressionssystem *Escherichia coli* und die Untersuchung der Expressionsfähigkeit in SFplus-Insektenzellen. Zur Realisierung der Expression in *E. coli* wurde eine modifizierte hsApoE3-Gensequenz in folgende Vektoren kloniert; pET MBP, pET GST, pET NusA und pET Z. Diese Vektoren kodieren die Gensequenzen unterschiedliche Protein-Tags, die durch die Fusion mit dem hsApoE3 eine verbesserte Expression und Aufreinigung dessen ermöglicht..

Für die Analyse der Expressionsfähigkeit in SFplus-Insektenzellen wird ein Baculovirus Expressionssystem genutzt. Dafür wird die genetisch modifizierte Gensequenz des hsApoE3 in die Vektoren pFastBac M10 und pFastBac Mellitin kloniert. Anschließend wird durch eine seitenspezifische Transposition ein DNA-Fragment mit der hsApoE3 Gensequenz in das Baculovirusgenom (Bacmid) transponiert. Diese Viren-DNA wird zur Transfektion der SFplus-Insektenzellen genutzt.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Ampicillin	Sigma
Boratsäure	Merck
Bromphenolblau	Sigma
Chloramphenicol	Sigma
Coomassie-Brillant-Blau R250	Sigma
Dimethylsulfoxid	Roth
Dinatrium EDTA Dihydrat	Merck
DTT	Fermentas
Ethanol	VWR
EDTA	Invitrogen
Ethidiumbromid	Novagen
Glycerol	VWR
Glycerin	Merck
Guanidin	AppliChem
Harnstoff	Merck
Kanamycin	Sigma
Imidazol	AppliChem
Methanol	VWR
Sarkosyl	Sigma
Tris-Base	Roth
Triton X-100	Fluka
Xylen Cyanol	Fluka

2.2 Geräte

CASY Counter, CASY DT	Roche Innovatis
Coulter Avanti Zentrifuge, J-20	Beckman

Coulter Avanti Zentrifuge, J-25	Beckman
Coulter Ultrazentrifuge, Optima LE-80K	Beckman
Gelelektrophoresesystem, miniVE	Hoefler
Homogenisator, Emulsiflex	Avestin
Lichtmikroskop, CKX41	Olympus
Peristaltische Pumpe Reglo Digital	Ismatec
Röntgenfilm, Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare
SemiDry Transfer Unit für Western Blot	Hoefler
Spektrophotometer, ND 1000	NanoDrop
Thermocycler, DYAD™	DNA Engine
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf
Transilluminator, Quantum ST4	Vilber Lourmat
Zelldicht Messgerät, CO8000	WPA biowave

2.3 Enzyme und Antikörper

Enzyme

GST-3C-Protease	Protein Expression Facility, MPI-CBG
Benzonase (25U/μl)	Novagen
<i>EcoR</i> I (20000 Units/ml)	New England Biolabs
His6-TEV Protease	Protein Expression Facility, MPI-CBG
Lysozym (3mg/ml)	Sigma
<i>Nco</i> I (10000 Units/ml)	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	Protein Expression Facility, MPI-CBG

Antikörper

Primärantikörper	Anti-hsApoE3 107, MPI-CBG
Sekundärantikörper	Konjugierte Meerrettichperoxidase-Esel Anti-Maus, MPI-CBG

2.4 Puffer und Lösungen

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

1x TBE-Puffer	89 mM Boratsäure
	89 mM Tris-Base (pH 8.3)
	20 mM Dinatrium EDTA Dihydrat
6x Ladepuffer	0,2% (w/v) Bromphenolblau,
	0,2% (w/v) Xylen Cyanol
	60% (w/v) Glycerol
	60 mM EDTA

Puffer für die Affinitätschromatographie

Bradford-Test-Lösung	BioRad
Eluierungspuffer 1	2x PBS;
	0,5 M Imidazol
Eluierungspuffer 2	2x PBS;
	10 mM Maltose
Equilibrierungspuffer 1	2x PBS
	15 mM Imidazol
Equilibrierungspuffer 2	2x PBS
Resuspendierungspuffer A	1x PBS
Resuspendierungspuffer B	1x PBS, 1% TritonX100, 1 mM DTT
Waschpuffer	2x PBS
	50 mM Imidazol

Puffer für PCR, Ligation und Restriktionsverdau

Quick-Ligations-Puffer	New England Biolabs
Restriktionspuffer	New England Biolabs

Puffer und Lösungen für die SDS-Page

2x Ladepuffer	126 mM Tris-Base (pH 6.8) 4% (v/v) SDS 20% (v/v) Glycerol 72 mM Bromphenolblau 100 mM DTT
Coomassie Brilliant Blau-Lösung	3 mM Coomassie-Brillant-Blau R250 45% (v/v) Methanol 10% (v/v) Azetatsäure
SDS-Gelelektrophorese Laufpuffer	144 g/l Glycin 30 g/l Trisbase
Entfärbelösung	25% (v/v) Methanol 10% (v/v) Azetatsäure

Puffer und Lösungen für den Western Blot

Block Puffer	1x PBS 0.1% Tween20 5% Bio-Magermilchpulver (Heirler)
Blotting Puffer	144 g/l Glycin 30 g/l Trisbase 20% Methanol
ECL(+) Reagenz	Ge Healthcare

2.5 Vektoren

Die für die Expression in *E. coli* und SFplus-Insektenzellen verwendeten Vektoren sind in Abbildung 1 bis Abbildung 7 schematisch dargestellt. Da das Bacmid-Plasmid 150000 bp groß ist, wurde nur ein Ausschnitt gezeigt.

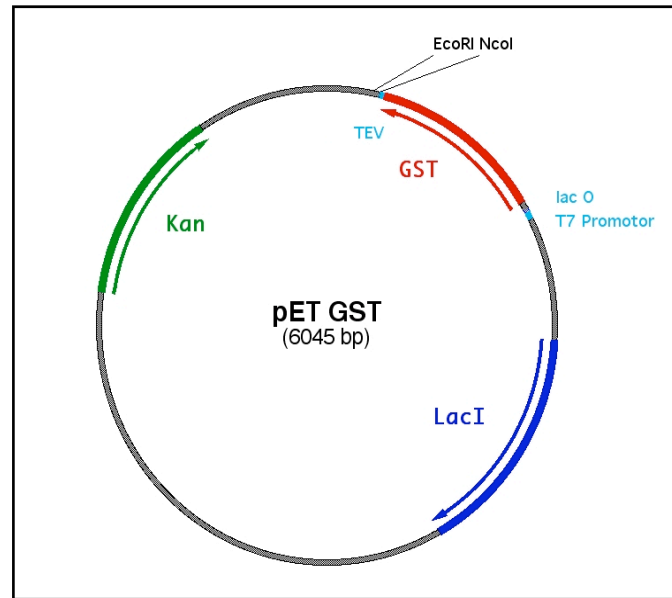


Abbildung 1: pET GST

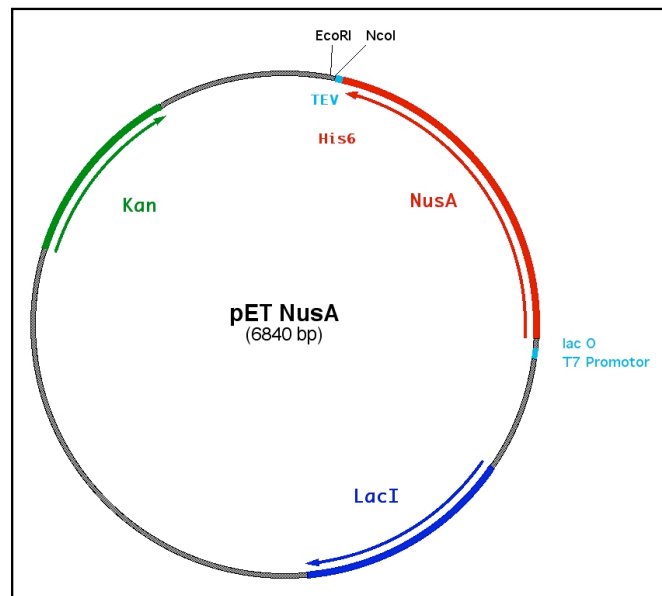


Abbildung 2: pET NusA

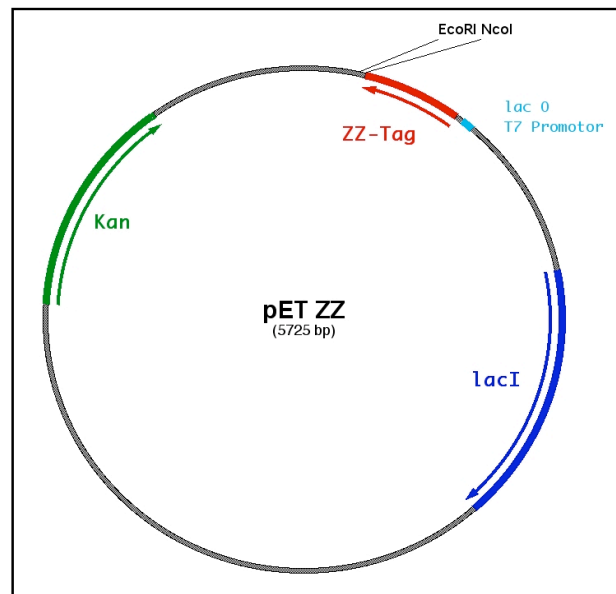


Abbildung 3: pET ZZ

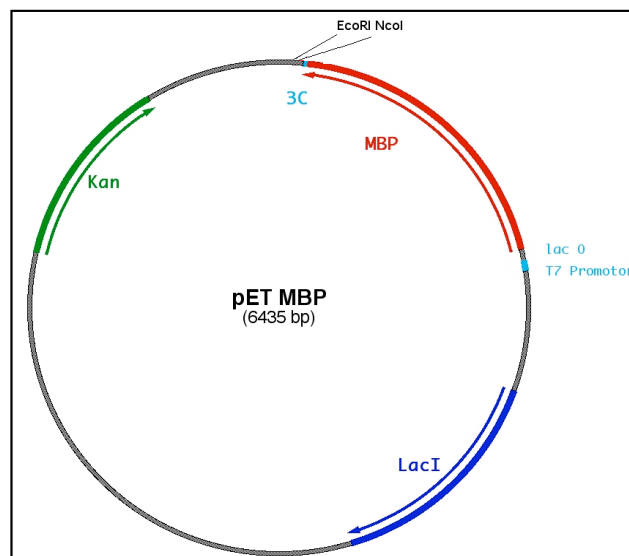


Abbildung 4: pET MBP

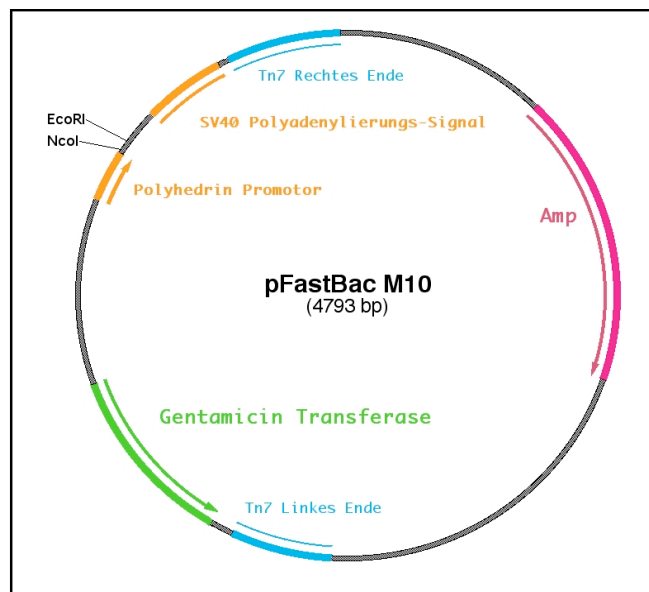


Abbildung 5: pFastBac Mellitin

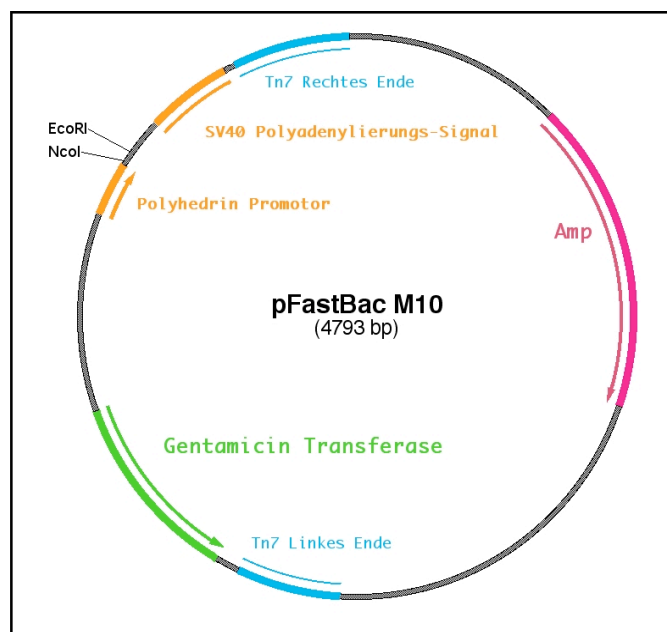


Abbildung 6: pFastBac M10

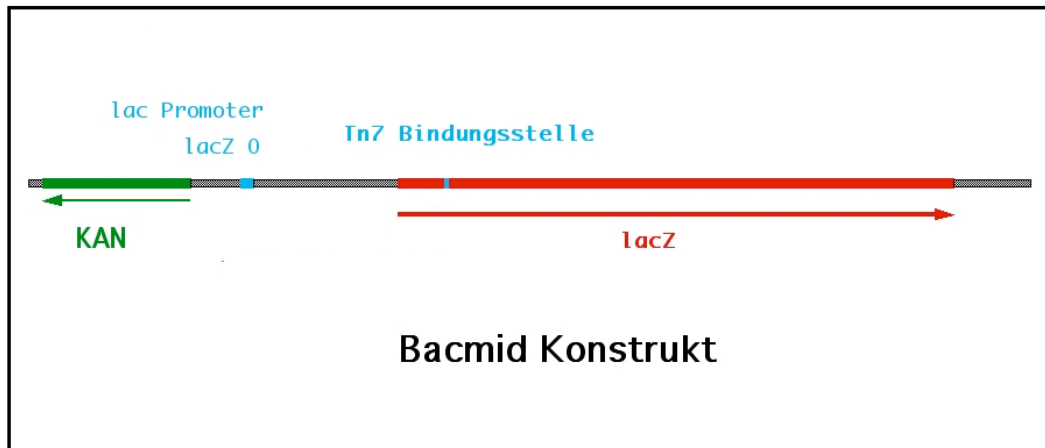


Abbildung 7: Ausschnitt des Bacmids

2.6 Zellen

BL21(DE3) *E. coli* Zellen

Protein Expression Facility, MPI-CBG

DH5 α *E. coli* Zellen

Protein Expression Facility, MPI-CBG

DH10bac *E. coli* Zellen

Protein Expression Facility, MPI-CBG

SFplus-Insektenzellen

Protein Sciences

2.7 Medien

Agarose

Mediumküche, MPI-CBG

MDAG-135

Mediumküche, MPI-CBG

SF900

Invitrogen

LB-Agar

Mediumküche, MPI-CBG

LB-Medium

Mediumküche, MPI-CBG

SOC-Medium

Mediumküche, MPI-CBG

Terrific Broth

Mediumküche, MPI-CBG

2.8 Selektionsplatten

LB-Platten B (für BL21(DE3))	30 µg/ml Kanamycin 15 µg/ml Chloramphenicol
LB-Amp	100 µg/ml Ampicillin
LB-Kan	30 µg/ml Kanamycin
LB-Platten A (für DH10bac)	40 µg/ml 1 M IPTG 100 µg/ml X-Gal 10 µg/ml Tetracyclin 7 µg/ml Gentamicin 1 mM Kanamycin

2.9 Kitsysteme

illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
Nucleo Spin® Plasmid	Macherey-Nagel
Perfectprep BAC 96 Kit	5 Prime

2.10 Primer

Die Konzentration der verwendeten Primer war 100 pmol/µl.

Tabelle 1: Verwendete Primer und Sequenzen

Primer	Primersequenz
pFastBac vorwärts	TTT TAC TGT TTT CGT AAC AGT TTT GT
pFastBac rückwärts	CAA ATG TGG TAT GGC TGA TTA TG
pET vorwärts	GCTGATAACAATTCCCCTCT
pET rückwärts	ACCCCTCAAGACCCGTTTAG
M13	GGAAACAGCTATGATGACCATG

2.11 Affinitätssäulen

MBP-Affinitätssäule	HiTrap Amylose
Ni-Affinitätssäule	HiTrap Ni ²⁺

2.12 Sonstiges

1x Proteasen Hemm Cocktail	Protein Expression Facility, MPI-CBG
1 kb Standardmarker	Fermentas
10x ThermoPol Puffer	New England Biolabs
Acrylamidgele für SDS-Page	Anamed
Chromatographiepapier	Whatman
Gefrierschutzmittel	10% (v/v) DMSO
	90% (v/v) SF900 Medium
Nitrozellulosemembran	Whatman
No Primer Master Mix	2,5 ml 10x ThermoPol Puffer
	500 µl dNTPs (je 10 mM)
	500 µl enzyme Big TaqIPFU
PD 10 Entsalzungssäule	Pharmacia Biotech
Transfektionsreagenz	Sigma

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Synthese des hsApoE3 Genkonstruktes

Um das hsApoE3 in *E. coli* oder durch Baculovirus zu exprimieren, musste die Gensequenz des humanen hsApoE3 zunächst in die verschiedenen Expressionsvektoren kloniert werden. Dazu wurde eine synthetische Gensequenz des hsApoE3 erstellt, welche zusätzlich eine Schnittstelle für die Tobacco Etch Virus Protease (TEV-Protease) und ein Histidin-Tag (His-Tag), bestehend aus sechs aufeinander folgenden Histidin-Aminosäuren für spätere Reinigungsverfahren, aufweist. Die Sequenz wurde am N-Terminus mit einer *Nco* I sowie am C-Terminus mit einer *EcoR* I Schnittstelle versehen, die für die spätere Klonierung erforderlich sind. Diese Sequenz wurde von der Firma Genart synthetisiert. Die dabei modifizierte Gensequenz bildet das Insert für alle folgenden Klonierungen.

3.1.2 Restriktionsverdau der Vektoren

Die verwendeten Vektoren (siehe 2.5) wurden in einem Doppelrestriktionsverdau in der multiplen Klonierungsstelle linearisiert. In jedem Restriktionsansatz wurden 1 µg Vektor mit 1 µl der Restriktionsenzyme *EcoR* I und *Nco* I unter Zugabe von 3 µl Restriktionspuffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl geschnitten. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde der Verdau mit Hilfe des illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kits gereinigt.

3.1.3 Ligation

Zur Herstellung der rekombinanten Plasmide wurden 50 ng des linearisierten und aufgereinigten Vektors und die hsApoE3-DNA im molaren Verhältnis Vektor zu Insert 1:3 eingesetzt. Die Ligation (30 µl Ansatz) wurde durch 1 µl T4 DNA-Ligase in Gegen-

wart von Quick-Ligations-Puffer katalysiert. Der Ansatz wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Um die den Restriktionsverdau des Vektors zu überprüfen, wurde parallel zu jedem Ligationsansatz ein Kontrollansatz ohne Insert angefertigt. Dabei wurde das Volumen des Inserts durch bidestilliertes Wasser (bidestH₂O) ersetzt.

3.1.4 Transformation und Selektion

3.1.4.1 Der DH5 α -Zellen

Die Ligationsansätze wurden zur Vervielfältigung in chemisch kompetente DH5 α -Zellen transformiert. Dafür wurden 10 μ l der Ligationsreaktion mit Insert bzw. des Kontrollansatzes zu jeweils 50 μ l aufgetauten DH5 α -Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation durch einen 45 sekündigen Hitzeschock in einem 42°C temperierten Wasserbad und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 Minuten. Die transformierten Zellen wurden in 500 μ L SOC-Medium für eine Stunde bei 37°C und 180 U/min kultiviert. Danach wurden die Zellen im Volumen 1/10 und 9/10 auf entsprechenden LB-Selektionsplatten (Tabelle 2) ausgestrichen und übernacht bei 37°C inkubiert. Wenn die Kontrollplatten weniger Transformanten als die Ligationsansätze aufwiesen, wurden eine Kolonie-PCR, eine Master-Platte sowie eine Flüssigkultur für eine Plasmid-DNA-Präparation mit einer Einzelkolonie angelegt.

Tabelle 2: Vektorabhängige LB-Selektionsplatten

Plasmid	LB-Selektionsplatte
pET GST-hsApoE3	LB-Kan
pET MBP-hsApoE3	LB-Kan
pET NUSA-hsApoE3	LB-Kan
pET ZZ-hsApoE3	LB-Kan
pFastBac Mellitin hsApoE3	LB-Amp
pFastBac M10 hsApoE3	LB-Amp

3.1.4.2 Der DH10bac-Zellen

Nach der DNA-Extraktion (siehe 3.1.8) der beiden pFastBac hsApoE3 Plasmidkonstrukte aus den DH5 α -Zellen und der Überprüfung der Nukleotidsequenz durch Sequenzierung wurden diese in chemisch kompeteten DH10bac-Zellen transformiert. Die Transformation wurde wie unter 3.1.4.1 beschrieben durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Platten A ausgestrichen und für zwei Tage bei 37°C inkubiert. Danach wurde eine weiße Einzelkolonie gewählt, mit der eine Kolonie-PCR sowie eine Masterplatte und eine Flüssigkultur für eine Plasmid-DNA-Präparation inokuliert wurde.

3.1.4.3 Der BL21(DE3)-Zellen

Die vier präparierten und mittels Sequenzierung überprüften pET-hsApoE3 Plasmidkonstrukte wurden in chemisch kompetente BL21(DE3) *E. coli*-Zellen, wie unter 3.1.4.1 beschrieben, transformiert. Der Hitzeschock wurde jedoch auf 19 Sekunden reduziert. Die transformierten Bakterien wurden übernacht bei 37°C auf LB-Platten B inkubiert und für die spätere Proteinexpression genutzt.

3.1.5 Transfektion und Infektion der SFplus-Insektenzellen zur Virusproduktion

Nachdem die Bacmid Plasmid-DNA mit Hilfe des Perfectprep BAC 96 Kit gereinigt und die Konzentration bestimmt wurde, wurden 750 ng dieser DNA zu 400 μ l SF900 Medium gegeben. Des Weiteren wurde eine Positiv- (Bacmid-Konstrukt welches EGFP kodiert) sowie eine Negativkontrolle (keine DNA) angelegt. Jedem Ansatz wurden 400 μ l Transfektionsreagenz hinzugefügt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zu allen Ansätzen jeweils 1 Mio SFplus-Insektenzellen transferiert, mit einer semipermeablen Membran verschlossen und bei 100 U/min und 27°C für einen Tag inkubiert. Danach wurde den Zellen 1 ml SF900 Medium zugesetzt, die Platte mit der semipermeablen Membran verschlossen und bei 100 U/min und 27°C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurden die Proben mit der Positiv- und Negativkontrolle unter dem Lichtmikroskop verglichen, um festzustellen, ob die SFplus-

Zellen erfolgreich mit dem Virus infiziert wurden. Schließlich wurden die Proben durch einen 0.45 µm Filter gefiltert. Mit 30 µl des aufgefangenen Filtrats in dem sich der Virus befanden, wurden 30 ml SFplus-Insektzellen mit einer Zelldichte von 0.5 Mio Zellen/ml Medium erneut infiziert. Diese Zellen wurden bei 100 U/min und 27°C für weitere 5 Tage kultiviert und anschließend wurde mittels des CASY-Counters die durchschnittliche Zellvolumen der infizierten Zellen gemessen. Lag dieses über einen Wert von 0.25 µm, konnte davon ausgegangen werden, dass die Infektion erfolgreich war und Viruspartikel in den Zellen gebildet wurden. Die Zellen wurden für 5 min bei 100 U/min pelletiert, in Gefrierschutzmittel resuspendiert und bei -80°C geleagert. Sie dienen anschließend der Infektion frischer Insektzellen zur Proteinexpression, Reinigung und Analyse.

3.1.6 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifikation definierter DNA-Abschnitte mit Hilfe dafür geeigneter Primer. Um die Klonierungen aus 3.1.4.1 zu überprüfen, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurde dem PCR-Ansatz eine Einzelkolonie von der Selektionsplatte direkt zugesetzt. Der PCR-Ansatz enthielt 1 µl reaktionsspezifischen Vorwärtsprimer, 1 µl reaktionsspezifischen Rückwärtsprimer (Tabelle 3) und 28 µl No Primer PCR Master Mix. Die PCR wurde mit einem Thermocycler durchgeführt. Die Programme sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 beschrieben.

Tabelle 3: Primer für die PCR

Plasmidkonstrukt	Verwendete Primer
pET-hsApoE3 Plasmide	pET vorwärts pET rückwärts
pFastBac hsApoE3 Plasmide	pFastBac vorwärts pFastBac rückwärts
Bacmid-hsApoE3 Plasmide	pFastBac M13

Tabelle 4: PCR Programm für die Amplifikation der pET-hsApoE3 Plasmidkonstrukte

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	240	
Denaturierung	94	30	35
Annealing	55	30	
Elongation	72	75	
Finale Elongation	72	120	
Lagerung	∞		

Tabelle 5: PCR-Programm für die Ampifikation der pFastBac hsApoE3 Plasmidkonstrukte

	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	240	
Denaturierung	94	30	35
Annealing	60	30	
Elongation	72	90	
Finale Elongation	72	120	
Lagerung	∞		

3.1.7 Auftrennen der DNA im Agarosegel

Zur Kontrolle eines Restriktionsverdaus, einer Ligation sowie einer PCR wurde die DNA im Agarosegel mittels einer Elektrophorese aufgetrennt. Dabei wird die DNA im elektrischen Feld proportional zu ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und lässt sich mit Hilfe eines 1kb Standardmarkers charakterisieren. Hierzu wurden 0,7%-ige (w/v) Agarosegele in 1x TBE-Puffer hergestellt. Zu diesem Ansatz wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Die DNA wurde mit 6x Ladepuffer im Volumenverhältnis 5:1 versetzt und 3 µl der Mischung auf das Gel aufgetragen. Um die Fragmentgröße der zu analysierenden DNA zu bestimmen, wurde zusätzlich in eine Geltasche ein 1 kb Standardmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 60 Minuten durch-

geführt. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert zwischen Guanin-Cytosin Basenpaare der DNA-Doppelhelix. Wird der so entstandene Komplex im UV-Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm angeregt, sendet er ein Licht im sichtbaren Bereich aus. Das Gel wurde in einem Transilluminator unter UV-Licht fotografiert.

3.1.8 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation dient dem Gewinn von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien. Dazu wurden die DH5 α und DH10bac transformierten Bakterien in LB-Medium, welches mit einem oder mehreren Antibiotika versetzt worden war, übernacht bei 37°C und 180 U/min kultiviert. In Abhängigkeit vom Plasmidkonstrukt (pET- bzw. pFastBac-hsApoE3 oder Bacmid) wurde für die Extraktion der Plasmid-DNA das NucleoSpin® Plasmid Kit bzw. das Perfectprep BAC 96 Kit verwendet. Die DNA wurde in 50 μ l Tris-EDTA-Puffer (pH 8,5) eluiert.

3.1.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm gegen Tris-EDTA-Puffer gemessen. Als Maß der Reinheit der DNA wurde der Quotient aus den Extinktionen der Wellenlängen bei 260 und 280 nm gewertet. Dieser liegt für reine DNA bei 1,8. Ein nach unten abweichender Wert deutet eine Verunreinigung mit Proteinen an und ein nach oben abweichender Wert stellt eine Kontamination mit RNA, Salzen oder Zucker dar.

3.1.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung zur Kontrolle der klonierten Plasmidkonstrukte erfolgte durch die Kettenabbruchmethode nach Sanger unter Benutzung der in Tab... dargestellten Primer und wurde von der Abteilung Sequencing des Max Planck Institutes für Molekulare Zellbiologie und Genetik durchgeführt. Die Daten wurden mit der Sequencher Software ausgewertet.

3.2 Überexpression und Reinigung von hsApoE3

3.2.1 Überexpression in *E. coli* BL21(DE3)

MDAG-135 Medium (20 ml) wurde mit einer Einzelkolonie des transformierten Expressionsstammes BL21(DE3) aus 3.1.4.3 mit dem jeweiligen hsApoE3-Expressionskonstrukt inokuliert und bei 37°C und 180 U/min über Nacht kultiviert. Diese wurden bei 4°C bis zu einem Monat gelagert und dienten als Startmaterial für die Expressionskultur.

Zur Expression des rekombinanten hsApoE3 Proteins wurde zu 1 l TB Medium 1 ml Startkultur transferiert. Zusätzlich wurde jeweils 1 ml der Antibiotika Kanamycin und Chloramphenicol hinzugegeben. Diese Kulturen wurden bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,5 bei 37°C und 180 U/min inkubiert. Danach wurden sie für 1 Stunde bei 18°C und 180 U/min abgekühlt und eine Probe für die Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) entnommen („Nicht induziert“). Anschließend wurde die Expression mit 200 µl 1 M IPTG induziert und übernacht bei 18°C und 180 U/min kultiviert. Eine weitere Probe für die SDS-Page wurde entnommen („Induziert“) und die Kultur bei 5000 g für 15 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 50 ml Resuspendierungspuffer A oder B resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2 Extraktion und Aufbereitung des Überstandes

Für die spätere SDS-Page wurden Proben an verschiedenen Schritten der Aufbereitung genommen. Diese sind durch Anführungsstriche im nachfolgenden Text gekennzeichnet.

Die schockgefrosteten Zellen einer 1 l bzw. 2 l Kultur wurden im Wasserbad bei Raumtemperatur aufgetaut. Je 50 ml Pellet wurden 500 µg Lysozym und 1x Proteasen Hemm Cocktail zugesetzt. Die Zellen wurden mit einem Homogenisator bei 1172.109 bar aufgeschlossen („grober Überstand“). Das Lysat wurde für 30 Minuten bei 12000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde bei

39000 U/min und 4°C erneut zentrifugiert, was das Ausgangsmaterial für die folgende Affinitätschromatographie bildete. Der Überstand wurde mit einem 0.22 µm Filter gefiltert („Filtrat“). Die bei den Zentrifugationen entstandenen Zellpellets wurden in verschiedenen Resuspendierungspuffern (Resuspendierungspuffer A - E) resuspendiert („Pellet 1“ entstanden bei 12000 U/min, „Pellet 2“ entstanden bei 39000 U/min).

3.2.3 Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus den pET-Plasmidkonstrukten

Die folgenden Methoden wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei 4°C durchgeführt. Dabei wurden alle mobilen Phasen aufgefangen und diesen Proben für SDS-Page entnommen. Die Probennamen sind durch Anführungsstriche im nachfolgenden Text gekennzeichnet.

3.2.3.1 Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus den pET-Plasmidkonstrukten über den His6-Tag

Der Überstand wurde auf eine equilibrierte (10 Säulenvolumen (CV) mit Equilibrierungspuffer 1) mit immobilisierten Nickel-Ionen beladene Affinitätssäule (Ni-Affinitätssäule) geladen („Ni-Durchfluss 1“). Das gebundene Protein wurde durch das Waschen mit 10 CV Equilibrierungspuffer 1 und 5 CV Waschpuffer von den Kontaminanten befreit („Ni-Waschung 1“). Das His6-Tag markierte hsApoE3-Fusionsprotein wurde mit 5 CV des Elutionspuffers 1 eluiert und jeweils in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde mittels des Bradford-Testes nachgewiesen und alle proteinhaltigen Fraktionen wurden gemischt („Ni-Elution 1“). Das Protein wurden über eine PD10 Säule entsalzt („Entsalzt“). Um das Protein von seinem Tag zu trennen, wurde dem entsalzten Protein 300 µl TEV-Protease zugesetzt und über Nacht bei 18°C inkubiert („TEV-Schnitt“). Dem Protein wurde 1/10 des Volumens 10x PBS und 3% des Eluierungspuffers 1 hinzugegeben und erneut über eine equilibrierte (10 CV, Equilibrationspuffer 1) mit Nickel-Ionen beladene Affinitätssäule aufgereinigt. Sowohl der His6-Tag als auch die TEV-Protease, welche selbst mit einem His6-Tag versehen ist, kann an die immobilisierten Nickel-Ionen binden. Das hsApoE3 Protein

wurde in 1 ml Fraktionen des Durchflusses gesammelt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Testes nachgewiesen. Die proteinhaltigen Proben wurden gemischt („Protein“). Danach wurde die Säule mit 10 CV Equilibrierungspuffer 1 und 5 CV Waschpuffer gewaschen („Ni-Waschung 2“). An die Säule gebundene Proteine wurden mit 5 CV Eluierungspuffer 1 eluiert, in 2 ml Fraktionen gesammelt und in einem Bradford-Test auf Protein untersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden wiederum gemischt („Ni-Elution 2“).

3.2.3.2 Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus dem pET MBP-hsApoE3 Plasmidkonstrukt über His6- und MBP-Tag

Der Überstand aus den Zentrifugationen wurde auf eine equilibrierte (10 CV Equilibrierungspuffer 1, 10 CV Equilibrierungspuffer 1 inklusive 1 mM Dithiothreitol (DTT)) HisTrap Ni²⁺ geladen. Der Durchfluss wurde aufgefangen („Ni-Durchfluss 1“). Die Kontaminanten wurden mit 20 CV Equilibrierungspuffer 1 einschließlich 1% Triton-X-100 (v/v), 10 CV Equilibrierungspuffer 1 und 5 CV Waschpuffer 1 entfernt („Ni-Waschung 1“).

Die an die stationäre Phase gebundenen Proteine wurden mit 5 CV Eluierungspuffer 1 eluiert und in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Diese wurden auf Protein mittels Bradford-Test untersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden gemischt („Ni-Elution 1) und auf eine equilibrierte (10 CV Equilibrierungspuffer 2) mit immobilisierter Amylose beladenen Affinitätssäule (HiTrap MBP) geladen („MBP-Durchfluss“). Kontaminanten wurden durch Waschen mit 10 CV Equilibrierungspuffer 2 entfernt („MBP-Waschung“). Das gebundene MBP-hsApoE3-Fusionsprotein wurde durch eluieren mit 5 CV Eluierungspuffer 2 in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Diese wurden mit dem Bradford-Test auf Protein untersucht. Proteinhaltige Fraktionen wurden gemischt („MBP-Elution“). Anschließend wurde mit dem Eluat, wie in der 3.2.3.1 beschriebenen Methode, weiter verfahren. Es wurden 300 µl His6-Tag markierter TEV-Protease zugesetzt, über Nacht bei 18°C inkubiert und das Proteingemisch über die mit Nickel-Ionen beladenen Affinitätssäule gereinigt.

3.2.3.3 Zweifache Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus dem pET MBP-hsApoE3 Plasmidkonstrukt nach TEV- und 3C-Protease Behandlung

Der Überstand aus den Zentrifugationen wurde auf eine equilibrierte (10 CV Equilibrierungspuffer 2 inklusive 1 mM DTT, 5 CV Equilibrierungspuffer 2 inklusive 1 mM DTT und 1% (v/v) Triton-X-100) mit immobilisierter Amylose beladenen Affinitätssäule geladen („MBP-Durchfluss“). Die an die Säule gebundenen Proteine wurden mit 20 CV Equilibrierungspuffer 2 inklusive 1% (v/v) Triton-X-100 und 10 CV Equilibrierungspuffer 2 gewaschen („MBP-Waschung“) und mit 5 CV Eluierungspuffer 2 in 1 ml Fraktionen eluiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden mit dem Bradford-Test ermittelt und anschließend gemischt („MBP-Elution“). Dem Eluat wurden 200 µl 3C-Protease hinzugegeben. Dieses wurde für eine Stunde inkubiert („3C-Schnitt“) und anschließend wurde das Protein wie unter 3.2.3.1 beschrieben aufgereinigt.

3.2.4 Expression des hsApoE3 in SFplus-Insektenzellen

Um die optimale Expressionsdauer des hsApoE3 in Insektenzellen zu ermitteln, wurde ein Expressionskinetik über 4 Tage verfolgt. Dafür wurden aufgetaute, infizierten SFplus-Zellen aus 3.1.5 mit nicht infizierten SFplus-Zellen mit einer Zelldichte von 1 Mio Zellen/ml Medium 1:10000 verdünnt. Im Abstand von 24 Stunden wurde täglich eine 1 ml SDS-Page Probe der infizierten Zellen genommen. Diese wurde für vier Minuten bei 100 U/min herunterzentrifugiert und in 50 µl 1x PBS und 50 µl 2x Proben-Puffer resuspendiert.

3.3 Proteinnachweis und -messung

Um die Proteinexpression und -aufreinigung zu überprüfen wurden Western Blots mit anschließender Immundetektion, Coomassie-Färbungen und Bradford-Tests durchgeführt. Bei den beiden erstgenannten Nachweismethoden geht eine SDS-Page voraus. Die im Gel aufgetrennten Proteine werden entweder auf eine Nitrocellulose-

Membran übertragen und danach mit einem spezifischen Antikörpern nachgewiesen oder mit Coomassie Brilliant-Blau angefärbt.

3.3.1 Probenvorbereitung

Bei dieser Standardtechnik der Proteinanalytik werden die Proben vor dem Beladen des Gels mit 2x Ladepuffer versetzt. Dieser enthält unter anderem SDS, ein stark negatives Detergenz welches an hydrophobe Bereiche der Proteine bindet und diese denaturiert. Die Proteine sind nun negativ geladen und die Wanderung dieser im elektrischen Feld ist nicht mehr von der Ladung sondern nur noch von der Proteingröße abhängig. Des Weiteren enthält der 2x Ladepuffer DTT, wodurch beim Erhitzen der Proben die Disulfidbrücken der Proteine aufgespalten werden.

Das Probenvolumen wurde 1:1 mit 2x Ladepuffer gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 90°C wurden die Proben für eine Minute bei 11000 g zentrifugiert. Um genomische DNA zu verdauen, wurde den Proben 1 µl Benzonase zugesetzt, 20 Minuten bei 37°C und 1300 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf das Gel geladen [20].

3.3.2 Natrium Dodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese

In der Proteinanalytik wird die SDS-Page, eine diskontinuierliche Elektrophorese-methode, zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen genutzt. Das Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel, welche sich hinsichtlich ihrer pH-Werte und Poren-größen unterscheiden. Das Sammelgel ist sehr großporig. Es entsteht ein Konzentrations-effekt der Proteine an der Grenze zum engmaschigen Trenngel. Bei der Wanderung der Proteine im Trenngel kommt es zum Siebeffekt auf Grund ihres Molekulargewichtes. Konzentrationsgradienten (5 – 20%) verstärken den Trenneffekt.

Die Proben und ein Molekulargewichtsmarker wurden in die Geltaschen pipettiert und bei 130 V für 130 Minuten aufgetrennt.

3.3.3 Coomassie-Färbung

Die Polyacrylamidgele wurden mit Coomassie Brilliant Blau-Lösung überschichtet, kurz in der Mikrowelle erhitzt und für 20 min inkubiert. Dabei lagert sich der Farbstoff an die Seitenketten der Proteine an. Proteinfreie Bereiche des überfärbten Gels wurden durch mehrmaliges Waschen mit Entfärbungslösung entfärbt. Die Proteinbanden sind als blaue Banden im Gel sichtbar.

3.3.4 Western Blot

Nach dem elektrophoretischen Auftrennen der Proteine wurden diese durch Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, um sie mittels spezifischer Antikörper nachweisen zu können. Dabei wurde folgender Aufbau verwendet:

Kathode

3 Chromatographiepapiere

Polyacrylamidgel

Nitrozellulose-Membran

3 Chromatographiepapiere

Anode

Chromatographiepapiere, Nitrozellulose-Membran und das Gel wurden in Blotting Puffer getränkt und in der Apparatur aufgeschichtet. Die Proteine wurden in einer Stunde bei 130 mA auf die Membran transferiert.

Anschließend erfolgte der immunologische Nachweis der Proteine. Dafür müssen freie Bindungsstellen der Membran blockiert werden, so dass Antikörper keine unspezifischen Bindungen eingehen. Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur in 20 ml Block Puffer geschwenkt. Die Membran wurde anschließend über Nacht mit einer 1:5000 Verdünnung des Primärantikörpers in 5 mL Block-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran dreimalig mit Block Puffer (je 15 Minuten) gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Daraufhin erfolgte eine 30

minütige Inkubation mit einer 1:5000 Verdünnung des markierten Sekundärantikörpers in 5 mL Block Puffer. Dieser bindet spezifisch an den primären Antikörper. Nach weiteren drei Waschschritten (je 15 Minuten) mit 1xPBS wurde die Membran mit ECL(+) Reagenz überschichtet und ein Röntgenfilm belichtet.

3.3.5 Bradford-Test

Zur Untersuchung der eluierten Fraktionen auf Protein diente der Bradford-Test. Hierfür wurden je 5 µl pro eluierter Fraktion auf eine 96/500 µL Well-Platte pipettiert. Zu jeder Vertiefung wurden 200 µL Bradford-Test-Lösung gegeben. Die Bradford-Test-Lösung enthält Coomassie Brilliant Blau. In Anwesenheit von Proteinen kommt es mit der kupferfarbenen Bradford-Test-Lösung zu einem blauen Farbumschlag.

3.3.6 Bestimmung der Konzentration von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 280 nm mit Hilfe des NanoDrop ND 1000 bestimmt. Als Leeransatz diente dabei der Eluierungspuffer.

4 Ergebnisse

In dieser Studie wurde die Überexpression des rekombinanten hsApoE3 in *E. coli* und in SFplus-Insektenzellen untersucht. Dazu wurde die hsApoE3 Gensequenz von der Firma Geneart synthetisch erstellt, mit Nukleotiden codierend für His6-Tag fusioniert sowie den flankierenden Restriktionsschnittstellen für *EcoR* I und *Nco* I ausgestattet. Die Gensequenz des hsApoE3 wurde an den Expressionsorganismus *E. coli* angepasst, um eine Wachstumsinhibierung durch die Überexpression und einer verringerten Produktausbeute durch wirtsunspezifische Codonnutzung zu minimieren.

4.1 Expression in *Escherichia coli*

Für die Expression in *E. coli* stand bereits das Plasmidkonstrukt pET 24d-hsApoE3 zur Verfügung, so dass dieses direkt in BL21(DE3) transformiert werden konnte.

4.1.1 Induktion des pET 24d-hsApoE3 Plasmidkonstrukt

Es wurde eine 1 l Expressionskultur angelegt und Proben für SDS-PAGE vor und nach der Induktion mit IPTG genommen. Abbildung 8 zeigt die coomassiegefärbten Proben nach der SDS-Page. Das His6-hsApoE3 Protein hat ein Molekulargewicht von 36,5 kDa. His6-hsApoE3 aus dem Plasmidkonstrukt pET24d wurde nur in sehr geringer Menge in *E. coli* exprimiert.

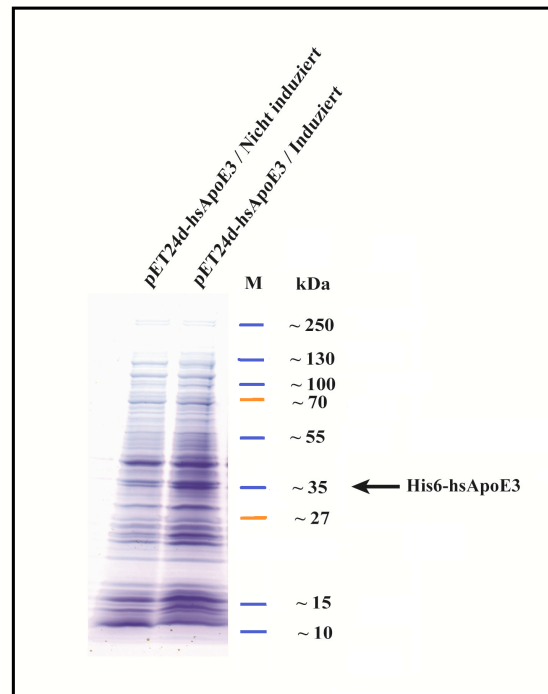


Abbildung 8: Induktion des pET 24d -hsApoE3 Plasmidkonstrukt

4.1.2 Klonierung von hsApoE3 in die Plasmidkonstrukte zur Expression im bakteriellen System

Das hsApoE3 Protein wurde in verschiedene pET Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Fusionsproteinen kloniert. Tabelle 6 veranschaulicht die durch die Klonierung entstandenen und für die Expression verwendeten Plasmidkonstrukte.

Tabelle 6: hsApoE3 Fusionsproteine der Plasmidkonstrukte

Plasmidkonstrukt	Fusionsprotein	Molekulargewicht [kDa]
pET MBP-hsApoE3	MBP-3C-His6-TEV-hsApoE3	79,5
pET ZZ-hsApoE3	ZZ-His6-TEV-hsApoE3	53,0
pET NusaA-hsApoE3	NusaA-His6-TEV-His6-TEV-hsApoE3	93,5
pET GST-hsApoE3	GST-TEV-His6-hsApoE3	65,4

Zur Überprüfung der Konstrukte wurden je zwei Klone in einer Kolonie-PCR mit hsApoE3 spezifischen Primern amplifiziert (Abbildung 9). Die amplifizierte Produktgröße betrug 2331 bp für pET MBP-hsApoE3, 1621 bp im pET ZZ, 2736 bp im pET NusA und 1941 bp im pET GST-hsApoE3 Plasmidkonstrukt, In allen gewählten Bakterienkolonien konnte hsApoE3 in den entsprechenden Expressionskassetten der Vektoren nachgewiesen werden.

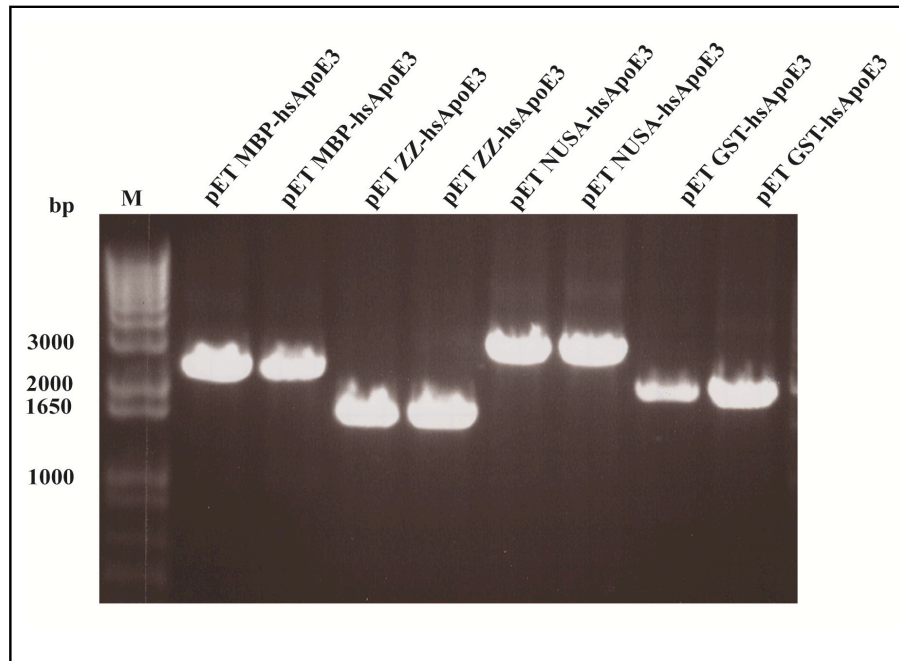


Abbildung 9: Kolonie-PCR der pET Plasmidkonstrukte

Die Klone wurden sequenziert und jeweils ein Klon pro Plasmidkonstrukt wurde für die Überexpression des hsApoE3 in *E. coli* verwendet.

4.1.3 Induktionsverhalten von hsApoE3 in den verschiedenen pET Plasmidkonstrukten

Das Protein hsApoE3 wurde über die Expressionsplasmide pET GST-hsApoE3, pET NusA-hsApoE3, pET ZZ-hsApoE3 und pET MBP-hsApoE3 in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen überexprimiert.

Das Induktionsverhalten der klonierten Konstrukte wurde anschließend mit der Induktion des bereits zur Verfügung stehenden Konstruktes, pET 24d-hsApoE3, verglichen.

Es wurden 1 l Kulturen angelegt, Proben für eine SDS-Page entnommen und die Expression bei 18°C mit IPTG induziert.

Nicht-induzierte und induzierte Proben wurden in einer SDS-Page getrennt und mit Coomassie gefärbt. Abbildung 10 zeigt das Induktionsverhalten von hsApoE3 in den verschiedenen neuklonierten pET Expressionsplasmiden.

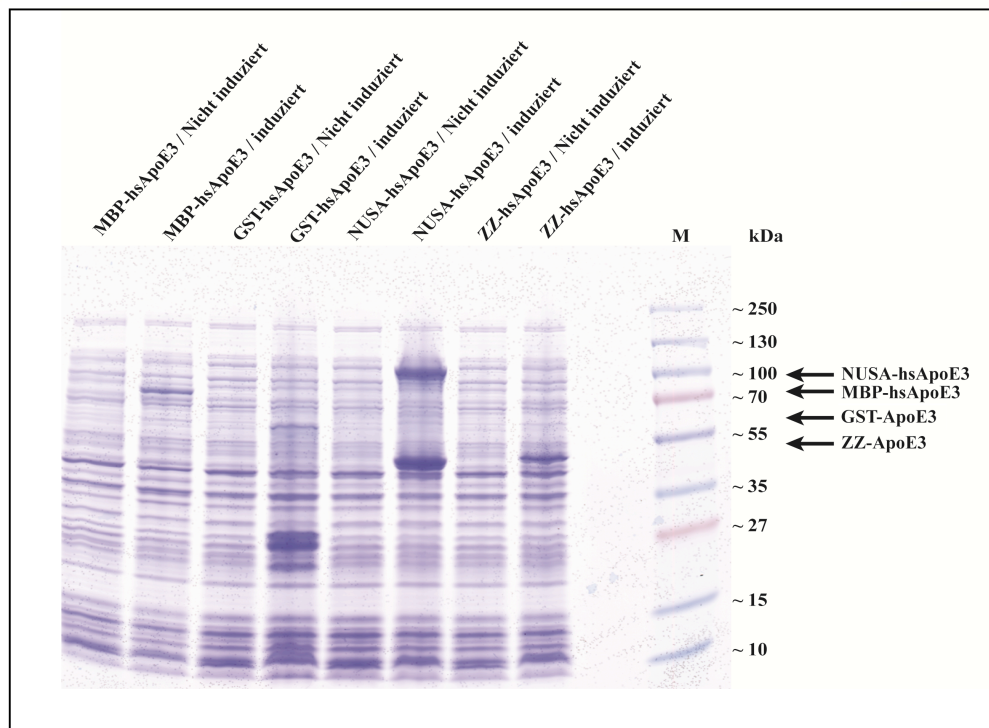


Abbildung 10: Coomassiegefärbtes Gel zur Analyse des Induktionsverhalten der neukreierten Expressionskonstrukte

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben und anfärben der Proteinbanden konnte eine Verbesserung der Expression nach Induktion mit IPTG und Übernachtkultivierung im Vergleich mit der Expression des Ausgangskonstruktes pET 24d-hsApoE3 nachgewiesen werden. Das Plasmidkonstrukt pET NusA-hsApoE3 weist die stärkste Expression des hsApoE3-Fusionsproteins auf (NusA-hsApoE3 / induziert), während über das Plasmid pET GST-hsApoE3 nur mäßige exprimiert wird (pET GST-hsApoE3 / induziert). Des Weiteren ist auffällig, dass nicht nur die Fusionsproteine NusA-hsApoE3 und GST-hsApoE3, sondern auch das NusA- und GST-Protein bzw. eine degradierte Form des GST-Protein alleine überexprimiert wird (NusA-hsApoE3 / induziert, ~ 55 kDa Bande, GST-hsApoE3 / induziert, ~ 27 kDa Bande).

4.1.4 Einfache His6-Tag Affinitätschromatographie

Um hsApoE3 mit den Fusionsproteinen MBP, GST, NusA und ZZ überzuexprimieren, wurde von jedem Konstrukt eine 1 l Kultur angelegt und über Nacht induziert. Die beim Ernten entstandenen Bakterienpellets wurden im Resuspendierungspuffer A resuspendiert und mittels Emulsiflex aufgeschlossen. Danach wurden die Extrakte durch Zentrifugation (12000 bzw. 39000 U/min) und Filtrierung aufgereinigt. Das im Filtrat vorliegende Fusionsprotein wurde über den in allen Expressionsprodukten vorhandenen His6-Tag in einer einfachen Ni^{2+} Affinitätschromatographie gereinigt, mit TEV-Protease über Nacht geschnitten und erneut mittels einer Ni^{2+} -Säule gereinigt.

Aus den nachfolgenden coomassiegefärbten Gelen ist ersichtlich, dass die Fusionsproteine nicht nur in löslicher Form im Filtrat, sondern auch in unlöslicher Form in den Pellets 1 und 2 auftritt.

pET GST-hsApoE3

Das GST-hsApoE3 Fusionsprotein (~ 65 kDa) tritt nur in sehr geringer Menge in löslicher Form im aufgereinigten und zentrifugierten Extrakt auf. Es konnte hauptsächlich in unlöslicher Form in den Pellets nachgewiesen werden (Abbildung 11, Pellet 1, Pellet 2). Das verbleibende lösliche Protein ist nahezu komplett in der ungebundenen Fraktion wiederzufinden (Abbildung 11, Ni-Durchfluss 1). In der anschließenden Elution 1 und nach Entsalzung durch die PD 10 Säule ist nur eine geringe Menge des GST-hsApoE3-Fusionsproteins sichtbar (Abbildung 11, Ni-Elution 1, Entsalzung). Hauptsächlich wurde das GST-His6-Tag und seine Degradationsprodukte eluiert. Nach der Behandlung mit der TEV-Protease konnte kein GST-hsApoE3 Fusionsprotein mehr nachgewiesen werden (Abbildung 11, TEV-Schnitt). Die TEV-Protease trennt hsApoE3 vom GST-His6-Tag. Das dabei entstehende hsApoE3 ist im Durchfluss nach dem erneuten Beladen einer Ni^{2+} -Säule kaum nachweisbar (Abbildung 11, Protein). In der folgenden Elution kann der GST-His6-Tag in einer sehr hohen Konzentration detektiert werden (Abbildung 11, Ni-Elution 2).

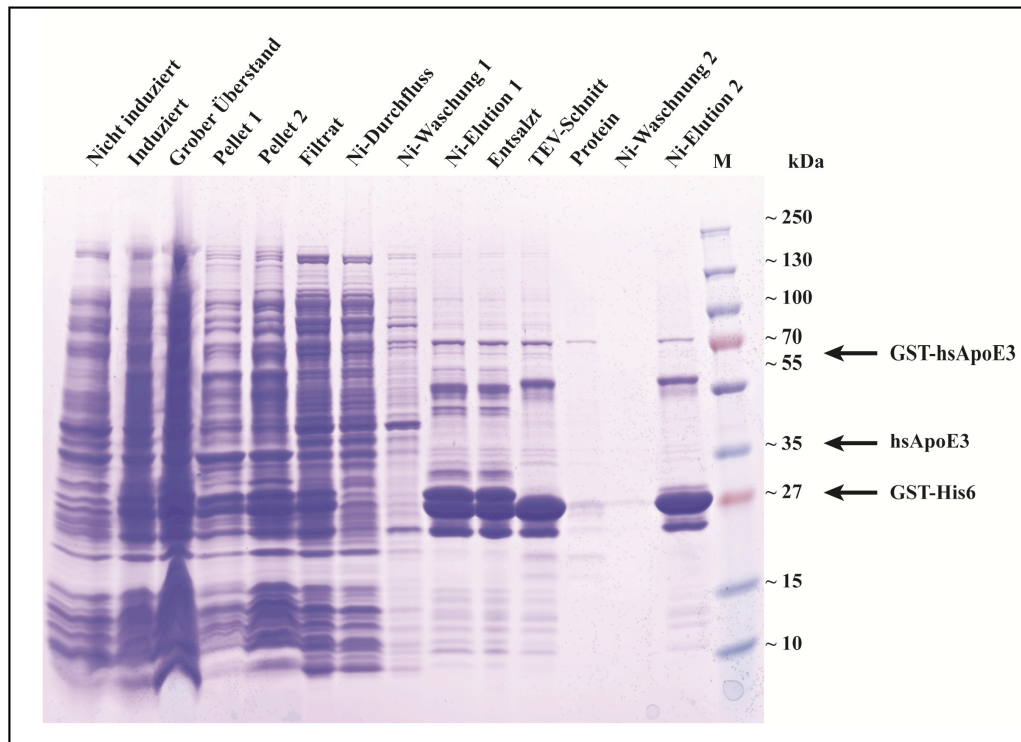


Abbildung 11: SDS-Page der während der Aufreinigung des GST-hsAPoE3-Fusionsproteins gesammelten Proben

pET NusA-hsApoE3

Das Plasmidkonstrukt pET NusA-hsApoE3 führt zu einer sehr starken Induktion des Fusionsproteins NusA-hsApoE3 (~ 94 kDa) (Abbildung 12, Induziert). Bei diesem Plasmidkonstrukt kommt das Fusionsprotein gleichermaßen in löslicher Form im Filtrat als auch in unlöslicher Form in den Zellpellets vor (Abbildung 12, Filtrat, Pellet1, Pellet 2). Im Durchfluss und der Waschfraktion der stationären Phase der Ni²⁺-Affinitätssäule ist kaum NusA-hsApoE3 nachweisbar (Abbildung 12, Ni-Durchfluss 1, Ni-Waschung 1). NusA-hsApoE3 hat an die Ni-Ionen gebunden und konnte eluiert werden (Abbildung 12, Ni-Elution 1). Durch das Entsalzen ging das Fusionsprotein NusA-hsApoE3 nicht verloren (Abbildung 12, Entsalzt). Das entsalzte Protein wurde über Nacht mit TEV-Protease behandelt. Dadurch wurde das Fusionsprotein NusA-hsApoE3 nahezu vollständig in NusA-His6 und hsApoE3 geschnitten (Abbildung 12, TEV-Schnitt). Das Proteingemisch wurde nach dem Proteaseverdau über die Ni-Affinitätssäule gegeben. Im Durchfluss dieser befindet sich das ungebundene hsApoE3 in aufgereinigter Form

(Abbildung 12, Protein). NusA-His6 wurde durch den Waschpuffer teilweise von der Säule gewaschen, wird jedoch hauptsächlich in der Elutionsfraktion sichtbar (Abbildung 12, Ni-Waschung 2, Ni-Elution 2).

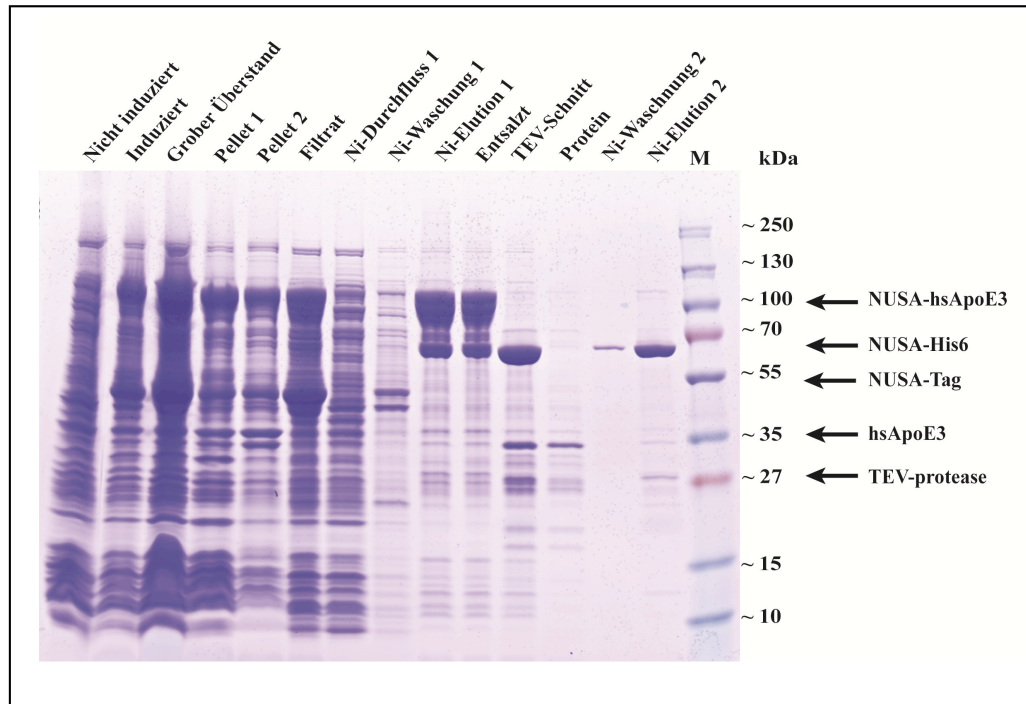


Abbildung 12: Aufreinigung des MBP-hsApoE3 Fusionsprotein über den His6-Tag

pET ZZ-hsApoE3

hsApoE3 aus dem Plasmidkonstrukt pET ZZ-hsApoE3 konnte in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt werden (Abbildung 13). Das Protein hsApoE3 aus dem ZZ-hsApoE3-Plasmidkonstrukt (~ 53 kDa) wird mäßig gut exprimiert (Abbildung 13 ,Induziert). Der größte Teil des ZZ-hsApoE3 war unlöslich und befand sich in den Zellpellets (Abbildung 13, Pellet 1, Pellet 2). Nur ein geringerer Teil des ZZ-hsApoE3 wurde in löslicher Form exprimiert und befand sich im Filtrat (Abbildung 13, Filtrat). Nach dem Beladen der Ni-Affinitätssäule konnte das mit dem ZZ-Tag fusionierte hsApoE3 weder im Durchfluss noch in der Waschfraktion (Abbildung 13, Ni-Durchfluss 1, Ni-Waschung 1) nachgewiesen werden. Es konnte nahezu vollständig über den His6-Tag an die Ni-Ionen in der Affinitätssäule gebunden und über den Elutionspuffer 1 eluiert werden (Abbildung 13, Ni-Elution 1). Allerdings sind in dieser Probe weiterhin viele Kontaminanten und

Degradationsprodukte erkennbar. Die entsalzte Probe (Abbildung 13, Entsalzt) wurde mit TEV-Protease behandelt. Die Protease hat das Fusionsprotein nahezu komplett in hsApoE3 und ZZ-His6-Tag geschnitten (Abbildung 13, TEV-Schnitt).

Im anschließenden Durchfluss über die Säule befand sich das aufgereinigte hsApoE3 Protein (Abbildung 13, Protein). Der ZZ-His6-Tag und die meisten anderen Kontaminanten wurden in der Säule zurückgehalten und traten im anschließenden Elutionsschritt auf (Abbildung 13, Ni-Elution 2).

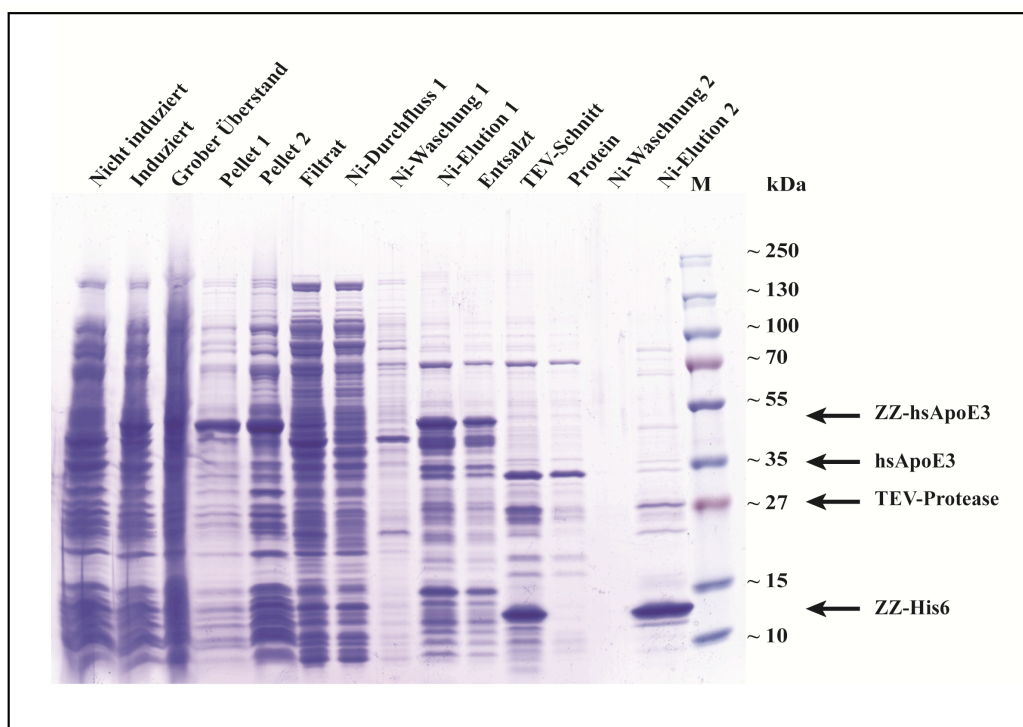


Abbildung 13: Einfache Ni-affinitätschromatographische Aufreinigung des ZZ-hsApoE3 Fusionsprotein über den His6-Tag

pET MBP-hsApoE3

Das hsApoE3 Protein aus dem Plasmidkonstrukt pET MBP-hsApoE3 (~ 79 kDa) wurde in einer sehr großer Menge in *E. coli* exprimiert und lag zu einem großen Teil in löslicher Form im Filtrat vor (Abbildung 14, Induziert, Filtrat). Nur ein geringer Teil des Proteins wurde in unlöslicher Form exprimiert (Abbildung 14, Pellet 1, Pellet 2). Im Vergleich zu den anderen Fusionsproteinsystemen war die Löslichkeit des hsApoE3 unter Verwendung des MBP-Tags am größten. Das Filtrat wurde chromatographisch aufgereinigt. Im dem dabei entstandenen Ni-Durchfluss 1 befand sich ungebundenes

MBP-hsApoE3. In der darauf folgenden Waschfraktion war kaum MBP-hsApoE3 Fusionsprotein detektierbar (Abbildung 14, Ni-Waschung 1). Das MBP-hsApoE3 wurde mit Elutionspuffer 1 eluiert (Abbildung 14, Ni-Elution 1) und anschließend über Nacht durch Behandlung mit TEV-Protease in hsApoE3 und MBP-His6-Tag gespalten (Abbildung 14, TEV-Schnitt). In der folgenden Chromatographie konnte im Durchfluss das hsApoE3 in reiner Form nachgewiesen werden (Abbildung 14, Protein). Bei der anschließenden Waschung und Elution der gebundenen Proteine von der stationären Phase trat hauptsächlich der MBP-His6-Tag und einige Kontaminanten auf (Abbildung 14, Ni-Waschung 2, Ni-Elution 2).

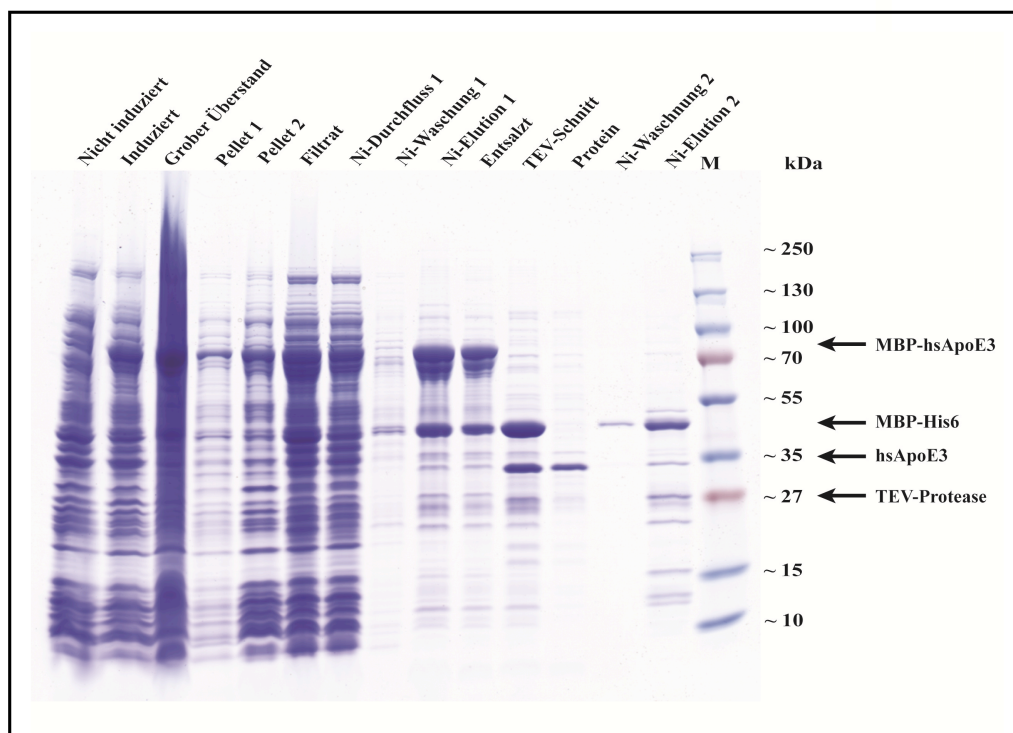


Abbildung 14: Einfache Ni-affinitätschromatographische Aufreinigung des MBP-hsApoE3 Fusionsproteins über den His6-Tag

Das Fusionsprotein NusA-hsApoE3 lieferte eine Proteinmenge von 4,6 mg/ 1 Kultur, ZZ-hsApoE3 hingegen 3,2 mg/ 1 Kultur. Die geringste Proteinmenge von 0,3 mg/ 1 Kultur wurde mit dem Konstrukt GST-hsApoE3 erzeugt. Die höchste Ausbeute konnte mit dem MBP-hsApoE3 Fusionsprotein erzielt werden (6,5 mg/ 1 Kultur).

Die Ergebnisse der Affinitätschromatographie zeigten, dass die aufgereinigten hsApoE3 Proteine aus den unterschiedlichen Plasmidkonstrukten noch zu viele Kontaminationen

enthielten. Um diese zu minimieren musste eine Reinigungsstrategie mit mehreren Aufreinigungsschritten entwickelt werden. Weiterhin wurden verschiedene Resuspendierungspuffer getestet, welche die unlöslichen Proteine in ihre lösliche Form überführen und somit für die Aufreinigung erreichbar machen sollten.

Da das MBP-hsApoE3 Fusionsprotein in hohem Maße und in löslicher Form exprimiert werden kann, bzw. der MBP-Tag über seine Affinität zu Amylose die Möglichkeit einer zweiten affinitätschromatographischen Aufreinigung bietet, wurde dieser für die folgenden Affinitätschromatographien genutzt.

4.1.5 Löslichkeit der Zellpellets

Das Fusionsprotein MBP-hsApoE3 kam sowohl in löslicher als auch in unlöslicher Form in den Pellets vor. Diese wurden mit den Resuspendierungspuffern B-E, welche unterschiedliche Detergenzien bzw. Denaturierungsmittel enthielten behandelt, erneut bei 12000 U/min und 39000 U/min zentrifugiert und gefiltert. Anschließend wurden die gesammelten Proben mit einer SDS-Page durch den Vergleich mit den Proben die mit dem Resuspendierungspuffer A gesammelt wurden, analysiert. Aus dieser SDS-Page (Abbildung 15) geht hervor, dass jeder der vier Resuspendierungspuffer nahezu das gesamte zuvor in unlöslicher Form vorliegende MBP-hsApoE3 Fusionsprotein in eine lösliche Form überführen konnte. Da der Resuspendierungspuffer B das mildeste Detergens (Triton X-100) enthält und davon auszugehen war, dass dieses die folgende Affinitätschromatographie am wenigsten beeinflussen würde, wurde mit diesem weitergearbeitet.

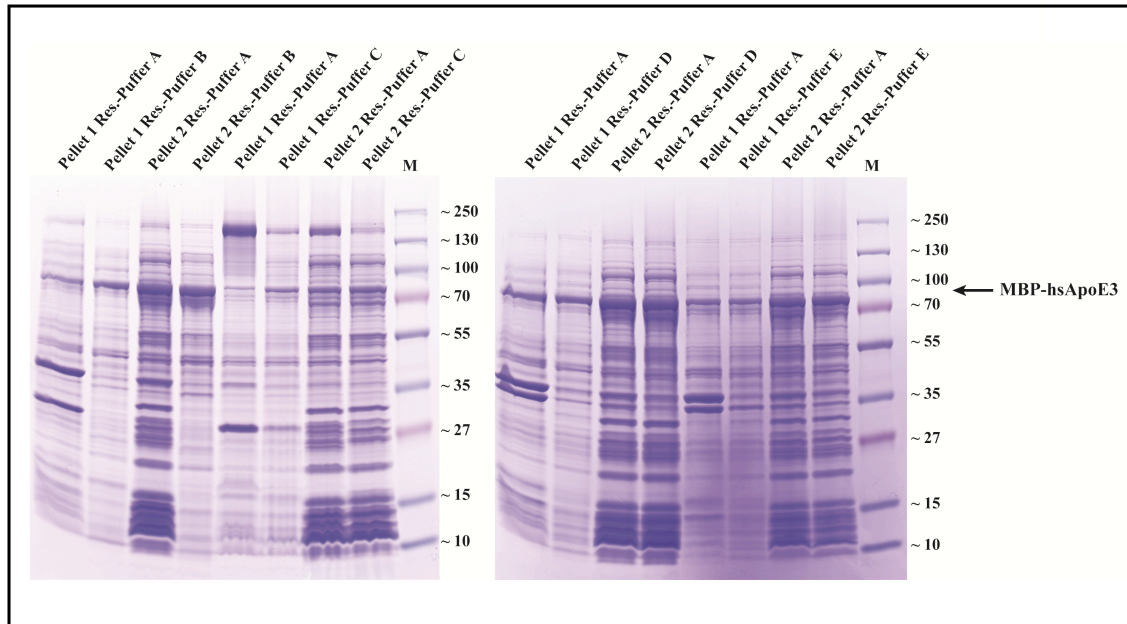


Abbildung 15: SDS-Page der Proben, welche für die Aufreinigung des MBP-hsApoE3 Fusionsproteins über den His6-Tag gesammelt werden konnten

4.1.6 Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus dem pET MBP-hsApoE3 Plasmidkonstrukt über His6- und MBP-Tag

Bei dieser Aufreinigungsstrategie wurde das überexprimierte MBP-His6-hsApoE3 Fusionsprotein zu erst über den His6-Tag und das resultierende Eluat anschließend über den MBP-Tag gereinigt.

Für diese Aufreinigung wurden Bakterien einer IPTG-induzierten 2 l Kultur genutzt. Die Zellpellets wurden in Resuspendierungspuffer B resuspendiert und mittels eines Homogenisators aufgeschlossen. Anschließend wurden das aufgeschlossene Material bei 12000 U/min und 39000 U/min zentrifugiert, gefiltert und über eine Ni- sowie eine MBP-Affinitätssäule aufgereinigt, bevor das daraus resultierende Eluat übernachtet mit der TEV-Protease geschnitten wurde. Danach fand eine erneute Aufreinigung über die Ni-Affinitätssäule statt.

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, fand eine Überexpression des MBP-hsApoE3 Fusionsproteins statt (Induziert). Die Resuspendierung des Zellpellets in Resuspendierungspuffer B (Abbildung 16, Pellet 1, Pellet 2) führte zu einem nahezu

vollständig löslichen MBP-hsApoE3 Protein (Abbildung 16, Filtrat). Im Durchfluss 1 und der Waschung 1 der Ni-Affinitätssäule befindet sich bereits ein Großteil des exprimierten MBP-hsApoE3 Fusionsproteins (Abbildung 16, Ni-Durchfluss 1, Ni-Waschung 1), so dass nur noch eine geringe Menge dessen in der Elutionsfraktion nachgewiesen werden konnte (Abbildung 16, Ni-Elution 1). Hinzu kommt, dass das Fusionsprotein nach dem Ernten der Zellen und während des Zellaufschlusses in MBP-His6-Tag und hsApoE3 geschnitten wurde (, Grober Überstand). Ein Großteil dieses unfusionierten hsApoE3 konnte im Pellet 1 nachgewiesen werden (Abbildung 16, Pellet 1). Ähnliches konnte für den MBP-His6-Tag beobachtet werden, der im Durchfluss 1, in der Waschung 1 als auch in der Elution nachweisbar war (Abbildung 16, Ni-Durchfluss 1, Ni-Waschung 1, Ni-Elution 1).

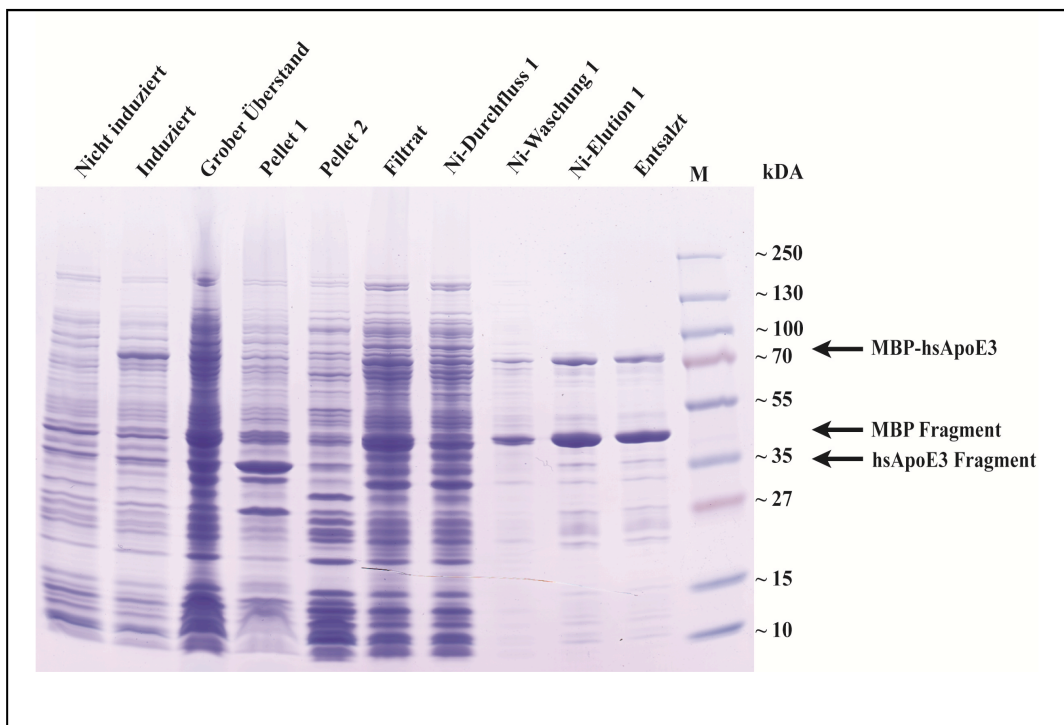


Abbildung 16: Aufreinigung des MBP-hsApoE3 Fusionsproduktes durch eine zweifache Affinitätschromatographie

Das noch verbleibende MBP-hsApoE3, welches über die Ni^{2+} -Säule aufgereinigt werden konnte, wurde entsalzt und anschließend über die MBP-Affinitätssäule chromatographisch gereinigt. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 dargestellt

Das Fusionsprotein konnte an die MBP-Affinitätssäule binden. Sowohl die ungebundene Fraktion also auch die Waschfraktion weisen kein MBP-hsApoE3 auf (Abbildung 17, MBP-Durchfluss, MBP-Waschung). Das gebunden Protein konnte eluiert (Abbildung 17, MBP-Elution) und mit der TEV-Protease übernacht vollständig geschnitten werden (Abbildung 17, TEV-Schnitt). Beim erneuten Beladen der Ni-Affinitätssäule wurde im aufgefangenen Durchfluss nur eine geringe Menge hsAPoE3 nachgewiesen (Abbildung 17, Protein). Das verbleibende hsApoE3 war in der Elutionsfraktion detektierbar (Abbildung 17, Ni-Elution 2).

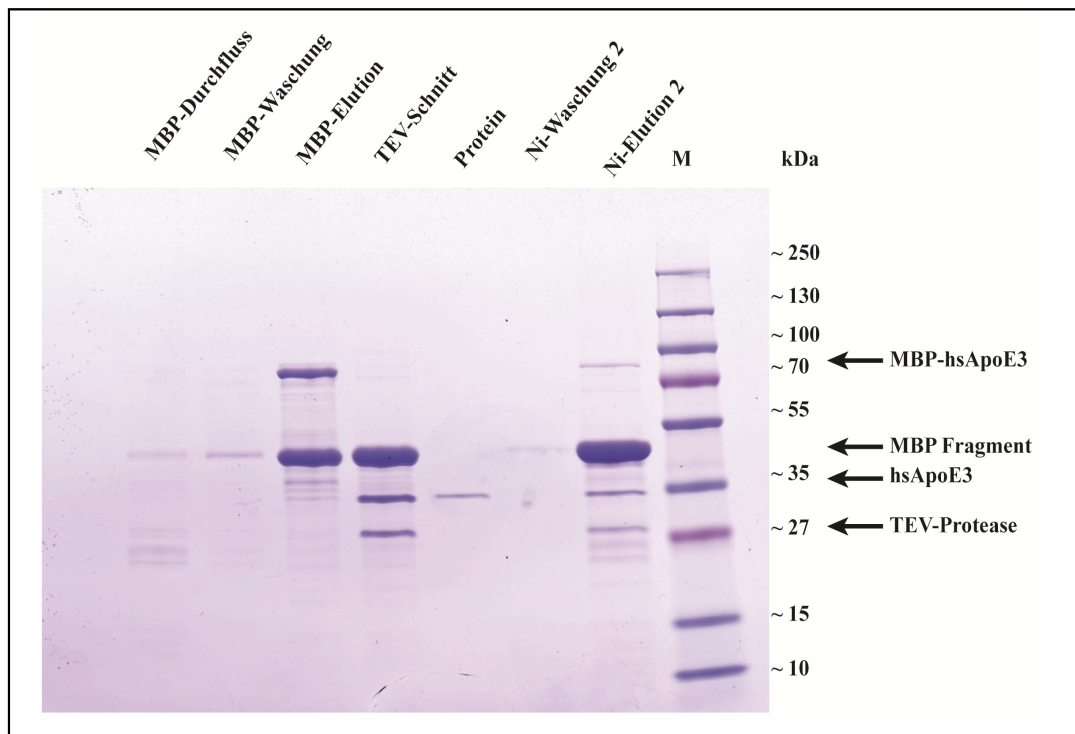


Abbildung 17: Zweite Affinitätschromatographische Reinigung des MBP-hsApoE3 Fusionsproteins über den MBP-Tag

4.1.7 Zweifache Affinitätschromatographie des hsApoE3 aus dem pET MBP-hsApoE3 Plasmidkonstrukt mit TEV- und 3C-Protease Behandlung

Die Anzucht, der Zellaufschluss und die Extraktzubereitung erfolgte wie unter 4.1.6 beschrieben. Das Filtrat wurde daraufhin zu erst über eine MBP-Affinitätssäule gereinigt. Die eluierten Proteine wurden mit einer 3C-Protease inkubiert und anschließend über

eine Ni-Affinitätssäule aufgereinigt. Das dabei entstehende Eluat wurde über Nacht mit einer TEV-Protease behandelt und wieder über eine Ni-Affinitätssäule gereinigt.

Aus Abbildung 18 ist erkennbar, dass das MBP-hsApoE3 exprimiert wurde (Nicht induziert versus Induziert). Wie bei der zuvor beschriebenen Auswertung konnte auch bei dieser beobachtet werden, dass das Fusionsprotein MBP-hsApoE3 während des Zellaufschlusses in hsApoE3 und MBP-His6-Tag aufgespalten wurde (Abbildung 18, Grober Überstand).

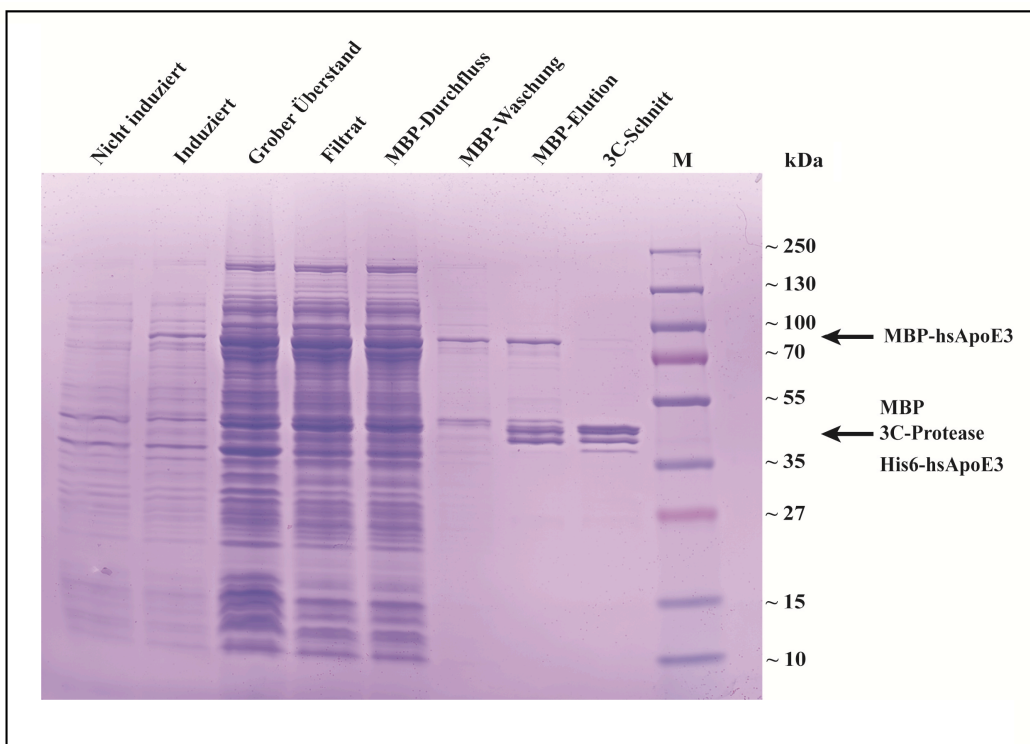


Abbildung 18: Aufreinigung des MBP-hsApoE3 Fusionsproteins über den MBP-Tag und Spalten des eluierten Proteins mit 3C-Protease

Im Filtrat (Abbildung 18) zeigte sich sowohl das Fusionsprotein MBP-hsApoE3 als auch ein Teil des MBP-His6-Tags ohne hsApoE3. Das wenige lösliche MBP-hsApoE3, welches sich noch im Filtrat befand, hat nicht an die MBP-Affinitätssäule gebunden und ließ sich im MBP-Durchfluss nachweisen (Abbildung 18, MBP-Durchfluss). Auch in der anschließenden aufgefangenen Waschung war ein Teil des Fusionsproteins detektierbar (Abbildung 18, MBP-Waschung), so dass nur noch eine sehr geringe Menge des exprimierten MBP-hsApoE3 in der eluierten Fraktion der MBP-Affinitätssäule vorzufinden war (Abbildung 18, MBP-Elution). Dieses konnte durch die Behandlung mit

der 3C-Protease vollständig in MBP und His6-hsApoE3 geschnitten werden (Abbildung 18, 3C-Schnitt).

Um His6-ApoE3 weiter aufzureinigen und anzureichern wurde an die MBP-Affinitätschromatographie eine Reinigung über eine Ni-Säule angeschlossen. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 dargestellt.

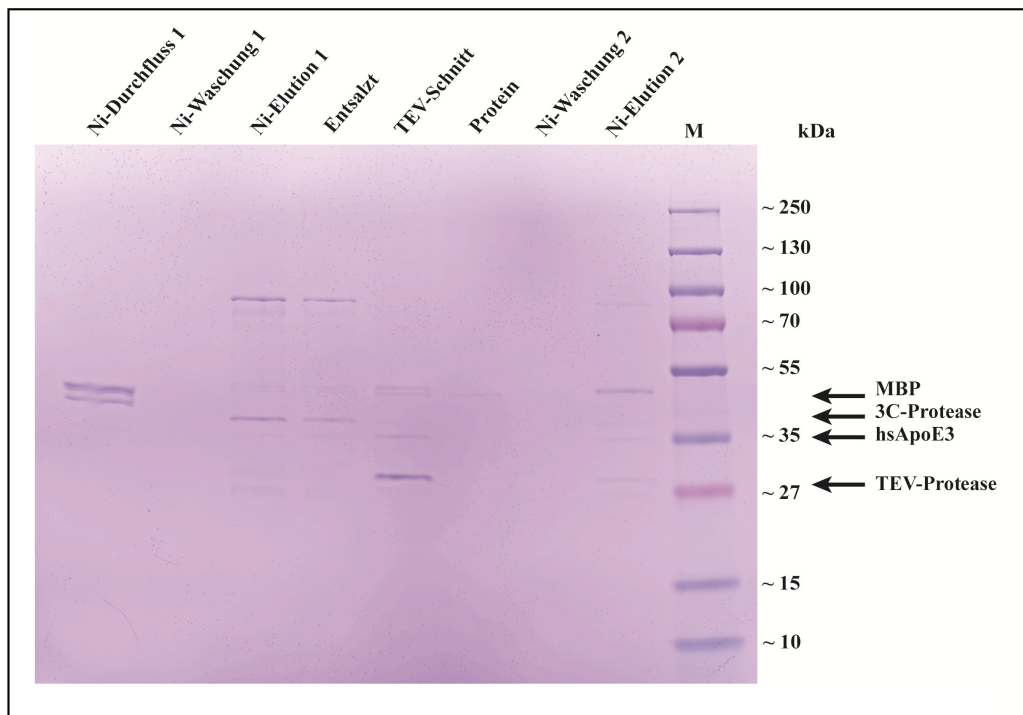


Abbildung 19: Aufreinigung des zuvor über dem MBP-Tag aufgereinigte und mit anschließend mit der 3C-Protease behandelten Proteins

Weder in der ungebundenen Fraktion (Abbildung 19, Ni-Durchfluss 1) noch in der Waschfraktion (Abbildung 19, Ni-Waschung 1) trat His6-hsApoE3 auf. Im Nickeldurchfluss war der abgetrennte MBP-Tag und die 3C-Protease erkennbar. His6-hsApoE3 hat vollständig an die Ni²⁺-Säule gebunden und wurde mit Imidazol eluiert (Abbildung 19, Ni-Elution 1). Dieses konnte auch in sehr geringer Menge in der entsalzten Probe nachgewiesen werden (Abbildung 19, Entsalzt). Durch die TEV-Protease wurde hsApoE3 erfolgreich vom His6-Tag getrennt (Abbildung 19, TEV-Schnitt). Die Proteinmenge war sehr gering und daher in dem fraktionierten Ni-Durchfluss nicht mehr detektierbar (Abbildung 19, Protein). In der anschließenden

Waschfraktion waren keine Proteine erkennbar (Abbildung 19, Ni-Waschung 2) und in der eluierten Nickelfraktion ließ MBP-His6 Fusionsprotein nachweisen (Abbildung 19, Ni-Elution 2).

4.2 Expression des hsApoE3 in dem Baculovirus-System

4.2.1 Klonierung des rekombinanten Baculovirengenoms

Um das Protein hsApoE3 mit dem Baculovirussystem herstellen zu können, musste die hsApoE3 Gensequenz zuerst in die EcoR I und Nco I verdauten pFastBac M10 bzw. Mellitin Vektoren kloniert werden. Die Klonierung (jeweils 6 Klone) wurde mit einer Kolonie-PCR überprüft (Abbildung 20).

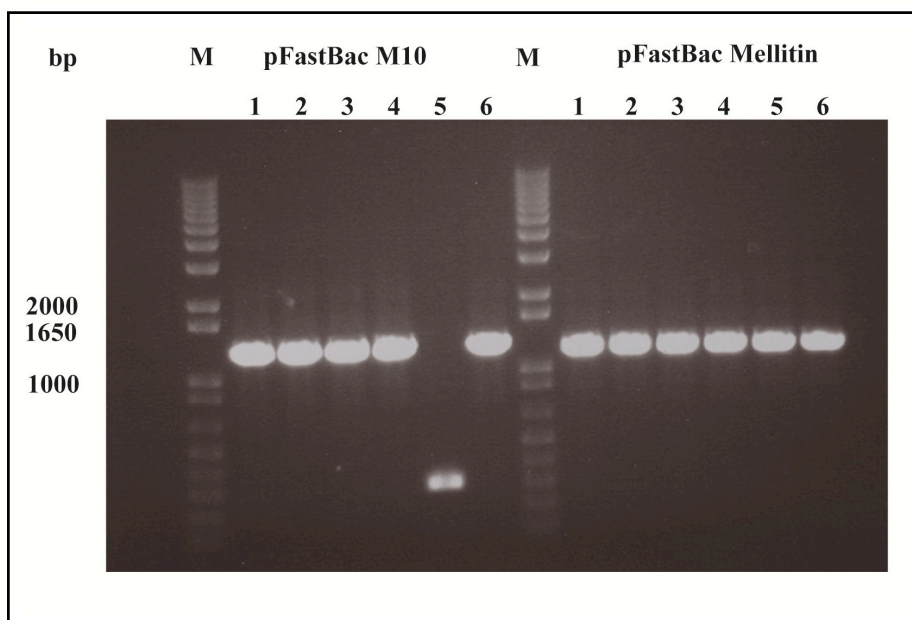


Abbildung 20: Kolonie-PCR des hsApoE3 in pFastBac -Plasmide

Die Bakterienkolonien 1-4 und 6 des Plasmidkonstruktes pFastBac M10 wiesen hsApoE3 auf. Klon 5 trug nicht das gewünschte Insert. Die Klone 1 bis 6 des pFastBac Mellitin - hsApoE3 enthielten die gewünschte Gensequenz. Jeweils 2 Klone mit der korrekten Sequenz wurden in DH10bac-Zellen transformiert. Schließlich wurden vier positiv rekombinante Einzelkolonien der pFastBac Mellitin-hsApoE3 und zwei positiv

rekombinante Einzelkolonien der pFastBac M10-hsApoE3 gewählt. Von diesen wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, um die Bacmid-Plasmide auf das hsApoE3 Insert hin zu überprüfen (Abbildung 21).

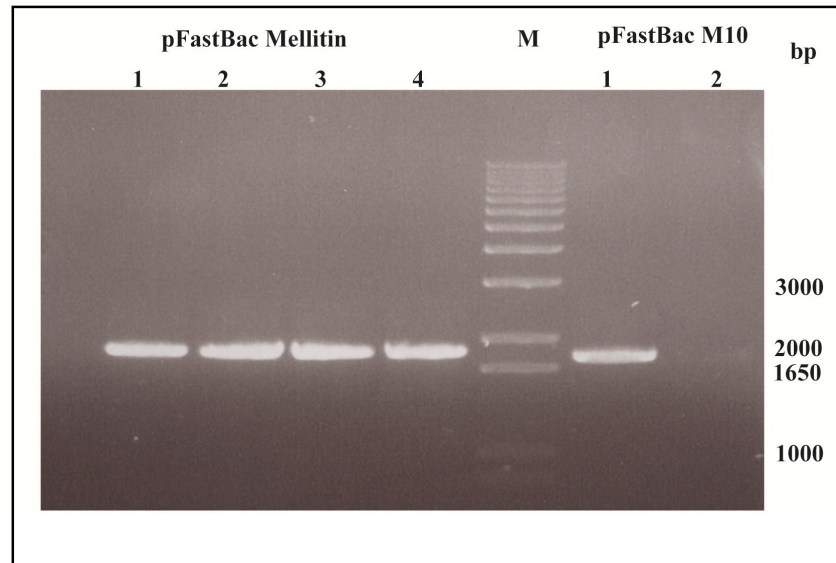


Abbildung 21: Kolonie-PCR der DH10bac Zellen zur Überprüfung der Bacmidkonstrukte auf das Insert

Die Abbildung 21 zeigt das Vorhandensein des hsApoE3 Inserts in den Bacmidkonstrukten der pFastBac Mellitin und pFastBac M10. Die Bande der Bakterienkolonie 2 des pFastBac M10 Plasmidkonstruktes war nur sehr schwach ausgebildet. Es wurden jeweils zwei der Bakterienkolonien jedes Bacmidkonstruktes kultiviert. Danach wurden die Bacmid-Plasmide extrahiert, aufgereinigt und durch die Sequenzierung der Gensequenz verifiziert. Anschließend wurde diese DNA zur Transfektion der SFplus-Insektenzellen genutzt.

4.2.2 Expressionskinetik

Um eine optimale Dauer der Expression zu ermitteln, wurden zunächst 20 ml SFplus-Insektenzellen mit bereits infizierten Insektenzellen inokuliert und für vier Tage kultiviert. Alle 24 Stunden wurde eine Probe der Zellen entnommen und später eine Western Blot angefertigt (Abbildung 22).

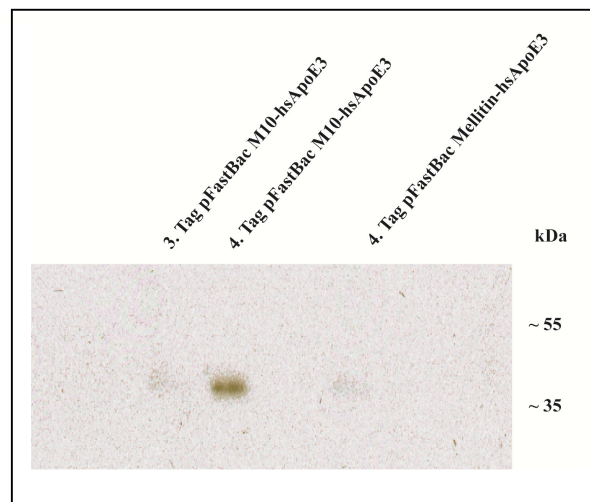


Abbildung 22: Western Blot der zur Expression in Insektenzellen angefertigten Expressionskinetik

Abbildung 22 zeigt den Western Blot der Proben, die drei bzw. vier Tage nach der Infizierung der Zellen genommen wurden. Dabei sind nur sehr schwache Banden des hsApoE3 in je einem Klon der beiden Plasmidkonstrukte aufgetreten.

5 Diskussion und Ausblick

Für biochemische Untersuchungen ob hsApoE3 sich als Medikamentenfähre eignet, ist es erforderlich, dass das Protein in größeren Mengen produziert werden kann und in seiner aktiven Form vorliegt. Ziel dieser Arbeit war das Etablieren einer Methode zur Expression und Aufreinigung des hsApoE3. Bisher war es nicht gelungen, die erstellte cDNA Sequenz des ApoE3 mit dem pET 24d Vektor in *E. coli* BL21(DE3) zu exprimieren. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere pET Vektoren, die jeweils für einen bestimmten TAG kodieren, zur Expression und Produktion des hsApoE3 getestet. Zusätzlich wurde das Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystem erprobt.

5.1 Expression im bakteriellen System

Für die Überexpression von hsApoE3 wurde als Wirtsorganismus *E. coli* gewählt. Das verwendete Expressionssystem war das T7-Kaskadensystem, bei dem die Expression durch Zugabe von IPTG eingeleitet wird.

Für die Überexpression des hsApoE3 waren Fusionsproteine zwingend erforderlich. ApoE3 aus dem pET 24d konnte nur sehr gering exprimiert werden. Ein möglicher Grund dafür könnte die zytotoxische Wirkung der Nanopartikel für *E. coli* sein, welche von hsApoE3 und Lipiden gebildet werden. Wurde hsApoE3 jedoch mit GST, NUSA, ZZ oder MBP fusioniert, verbesserte sich die Induktion und die exprimierte Proteinmenge stieg, abhängig vom Konstrukt, stark an. MBP lieferte die größte Proteinausbeute.

Tags verbessern die Induktion und Löslichkeit eines Proteins [21].

Das hsApoE3 aus dem Vektor pET 24d besaß nur einen His6-Tag. Dieser sehr kleine Tag ist nicht in der Lage die Bildung von Nanopartikel aus hsApoE3 und Lipiden aus *E. coli* zu verhindern. Die GST-, NusA-, ZZ- oder MBP-Tags waren in der Lage, die Bildung der Nanopartikel zu hemmen bzw. einzudämmen, so dass eine Expression des Fusionsproteins möglich war.

Die dabei entstandenen hsApoE3-Fusionsproteine wurden aber sowohl in löslicher als auch in unlöslicher Form exprimiert. Das Expressionsprodukt GST-hsApoE3 lag

weitestgehend nur in unlöslicher Form vor. Da für eine Affinitätschromatographie lösliches Protein zwingend erforderlich ist, war die Ausbeute des GST-fusionierten hsApoE3 mit 0,3 mg/l Kultur sehr gering.

Die anderen verwendeten Fusionsproteine konnten in den löslichen Fraktionen nachgewiesen und aufgereinigt werden. Mit dem MBP-Tag wurde mit 6,5 mg/l Kultur die höchste Ausbeute erzielt. Auch der NusA-Tag verstärkte die Proteinexpression. Am wenigsten waren der ZZ- sowie der GST-Tag geeignet. Sowohl MBP als auch NusA sind *E. coli* Proteine. Als Fusionspartner erhöhen Sie die Löslichkeit von Proteinen. Das Auftreten unlöslicher Fusionsproteine könnte auf die starke Überexpression in *E. coli* zurückzuführen sein. Dadurch wird die Faltung der Proteine beeinträchtigt, sie lagern sich zusammen und das Bakterium ist nicht mehr in der Lage das Protein trotz Tag in Lösung zu bringen.

Ein Teil des GST- und MBP-fusionierten hsApoE3 konnte nicht an die Ni-Affinitätssäule binden. Die Effizienz der Reinigung hängt zum einen stark von der aufzureinigenden Proteinmenge sowie der Bindungskapazität der Säule ab. Zum anderen beeinflusst die Proteinfaltung und damit die Interaktion von Affinitätstag und stationärer Phase die Reinigungseffizienz.

Für den späteren pharmazeutischen Gebrauch war ein hochreines und hochkonzentriertes hsApoE3 erforderlich. Das MBP-hsApoE3 wurde deshalb nach der Chromatographie über den His6-Tag ein weiteres Mal über den MBP-Tag gereinigt.

Um die in den Zellpellets in unlöslicher Form vorliegenden MBP-hsApoE3 Fusionsproteine in Lösung zu bringen, wurden Resuspendierungspuffer entwickelt (Resuspendierungspuffer B bis E), die unterschiedliche Detergenzien (Triton X-100, Sarkosyl) und Denaturierungsmittel (Harnstoff, Guanidin) enthielten. Sowohl Detergenzien, als auch Denaturierungsmitteln führten zu einer Überführung der zuvor unlöslichen Proteine in die lösliche Form. Jedoch sollte auf die Aktivität und damit Funktionsfähigkeit des Proteins geachtet werden.

Sarkosyl, Harnstoff und Guanidin können zur Denaturierung des MBP-Tags führen. Der Affinitätstag verliert somit seine Funktion in der Aufreinigung. Eine eventuelle Proteinrenaturierung ist mit einem erheblichen Mehraufwand verbunden. Triton X-100, ein mildes und neutrales Detergenz, ist in der Lage an hydrophobe Bereiche zu binden.

Dieser enthielt das Detergenz Triton X-100. Das bedeutet, dass es an Lipide bindet und mit hsApoE3 in Konkurrenz tritt. Dieses kann sich nicht mehr an die mit Triton X-100 gebundenen Lipide anlagern um Nanopartikel zu bilden und bleibt somit in einer löslichen Form und weniger toxisch. Zum anderen lagert sich Triton X-100 an das hsApoE3 an und kann somit das Zusammenschließen der nicht korrekt gefalteten Proteine verhindern.

Zur zweifachen Affinitätschromatographie über den His6-Tag und den MBP-Tag wurde das Zellpellet in Resuspendierungspuffer B, welcher Triton X-100 enthielt, resuspendiert. Beide Affinitätschromatographien führten zu einer nur sehr geringen hsApoE3-Ausbeute. Dies ist damit zu erklären, dass ein Großteil des exprimierten Fusionsproteins durch proteolytische Vorgänge nach der Resuspendierung gespalten wurde. Dabei scheinen in *E. coli* befindliche Proteasen, das Fusionsprotein zu schneiden. Dies konnte bei den vorhergehenden Aufreinigungen unter Verwendung des Resuspendierungspuffers ohne Triton X-100 nicht beobachtet werden. Die Spaltung weist darauf hin, dass das im Resuspendierungspuffer befindliche Triton X-100 mit dem Proteasen Hemm Cocktail interagiert und diesen an der Hemmung der *E. coli*-Proteasen hindert, so dass diese das Fusionsprotein in Fragmente zerlegt. hsApoE3 konnte somit nicht aufgereinigt werden. Eines der entstandenen Degradationsprodukte schien ein MBP-His6 Fusionsprotein zu sein. Es konnte an die Ni-Affinitätssäule bindet und eluiert werden. Die Chromatographie des MBP-hsApoE3 über den His-Tag und anschließend über den MBP-Tag führte zu einer sehr hohen Reinheit. Bedingt durch den hohen Verlust an exprimiertem Protein vor und während der Aufreinigung konnte hsApoE3 jedoch nur in einer sehr geringen Menge eluiert werden.

Auch in der zweifachen Affinitätschromatographie mit 3C- oder TEV-Protease Behandlung kam es zur Degradation eines Großteil des exprimierten Fusionsproteins. Außerdem ging das verbleibende MBP-hsApoE3 keine Bindung mit der MBP-Affinitätssäule ein. Eine mögliche Erklärung ist der Zusatz von Triton X-100 im Resuspendierungspuffer, welches die Bindung des MBP an Amylose verhindert.

5.2 Expression über den Baculovirus

Alternativ zum bakteriellen Expressionssystem wurde hsApoE3 in Insektenzellen exprimiert. Um den optimalen Zeitpunkt zu bestimmen wurde eine Expressionskinetik über 4 Tage durchgeführt. Das Protein hsApoE3 wurde in der Zeit jedoch nur gering synthetisiert. Somit konnte das Baculovirussystem für die Überexpression nicht genutzt werden. Eine weitere Studie ist erforderlich, um die optimalen Expressionsbedingungen zu bestimmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hsApoE3 in *E. coli* und in geringer Menge in Insektenzellen exprimiert werden kann. Die Proteinausbeute war abhängig von dem verwendeten Expressionskonstrukt in *E. coli* unterschiedlich hoch. Das MBP-hsApoE3 Fusionsprotein lieferte den höchsten Ertrag an hsApoE3. Das Protein lag sowohl in löslicher als auch in unlöslicher Form vor. Durch den Zusatz von Triton X-100 konnte der unlösliche Teil in Lösung gebracht werden. Das Detergenz bewirkte jedoch zum einen das Spalten des Proteins während des Zellaufschlusses und zum anderen verhin-derte es die Bindung an die Affinitätsäulen.

Das Fusionsprotein MBP-hsApoE3 lies sich erfolgreich über den vorhandenen His6-Tag aufreinigen. Eine anschließende Affinitätschromatographie über den MBP-Tag verstärkte den Reinigungseffekt.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: pET GST.....	18
Abbildung 2: pET NusA.....	18
Abbildung 3: pET ZZ.....	19
Abbildung 4: pET MBP.....	19
Abbildung 5: pFastBac Mellitin.....	20
Abbildung 6: pFastBac M10.....	20
Abbildung 7: Ausschnitt des Bacmids.....	21
Abbildung 8: Induktion des pET 24d -hsApoE3 Plasmidkonstrukt.....	38
Abbildung 9: Kolonie-PCR der pET Plasmidkonstrukte.....	39
Abbildung 10: Coomassiegefärbtes Gel zur Analyse des Induktionsverhalten der neukreierten Expressionskonstrukte.....	40
Abbildung 11: SDS-Page der während der Aufreinigung des GST-hsAPoE3- Fusionsproteins gesammelten Proben.....	42
Abbildung 12: Aufreinigung des MBP-hsApoE3 Fusionsprotein über den His6-Tag....	43
Abbildung 13: Einfache Ni-affinitätschromatographische Aufreinigung des ZZ-hsAPoE3 Fusionsprotien über den His6-Tag.....	44
Abbildung 14: Einfache Ni-affinitätschromatographische Aufreinigung des MBP- hsApoE3 Fusionsproteins über den His6-Tag.....	45
Abbildung 15: SDS-Page der Proben, welche für die Aufreinigung des MBP-hsApoE3 Fusionsproteins über den His6-Tag gesammelt werden konnten.....	47
Abbildung 16: Aufreinigung des MBP-hsApoE3 Fusinsproduktes durch eine zweifache Affinitätschromatographie.....	48
Abbildung 17: Zweite Affinitätschromatographische Reinigung des MBP-hsApoE3 Fusionsproteins über den MBP-Tag.....	49
Abbildung 18: Aufreinigung des MBP-hsApoE3 Fusionsproteins über den MBP-Tag und Spalten des eluierten Proteins mit 3C-Protease.....	50
Abbildung 19: Aufreinigung des zuvor über dem MBP-Tag aufgereinigte und mit anschließend mit der 3C-Protease behandelten Proteins.....	51
Abbildung 20: Kolonie-PCR des hsApoE3 in pFastBac -Plasmide.....	52

Abbildung 21: Kolonie-PCR der DH10bac Zellen zur Überprüfung der
Bacmidkonstrukte auf das Insert 53

Abbildung 22: Western Blot der zur Expression in Insekteinzellen angefertigten
Expressionskinetik..... 54

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer und Sequenzen.....	22
Tabelle 2: Vektorabhängige LB-Selektionsplatten.....	25
Tabelle 3: Primer für die PCR	27
Tabelle 4: PCR Programm für die Amplifikation der pET-hsApoE3 Plasmidkonstrukte	28
Tabelle 5: PCR-Programm für die Ampifikation der pFastBac hsApoE3 Plasmidkonstrukte.....	28
Tabelle 6: hsApoE3 Fusionsproteine der Plasmidkonstrukte.....	38

8 Literaturverzeichnis

[1] Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. <www.deutsche-alzheimer.de> : Die neurologischen Grundlagen der Alzheimer-Krankheit. URL<<http://www.deutsche-alzheimer.de/index.php?id=13>>, verfügbar am 05.09.2010

[2] Zensi A.; Begley D.; Pontikis C.; Legros C.; Mihoreanu L.; Wagner S.; Büchel C.; von Briesen H.; Kreuter J. : Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *Journal of Controlled Release*. – 137: (2009), 78-86

[3] Vogel T.; Weisgraber K.H.; Zeevi M.I.; Ben-Artzi H.; Levanon A.Z.; Rall S.C.Jr; Innerarity T.L.; Hui D.Y.; Taylor J.M.; Kanner D. : Human apolipoprotein E expression in *Escherichia coli*: Structural and functional identity of the bacterially produced protein with plasma apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (1985), 8696-8700

[4] Pillot Thierry; Barbier Anne; Visvikis Athanase; Lozac'h; Rosseneu Maryvonne; Vandekerckhove Joel; Gérard Siest : Single-Step Purification of Two Functional Human Apolipoprotein E Variants Hyperexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression And Purification*. – 7: (1996), 407-414

[5] Renz, Harald (Hrsg.): *Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin: Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie*. – Berlin : de Gruyter , 2003

[6] GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit: Affinitätsmarker zur Proteinreinigung, seine Herstellung und Verwendung. URL:<<http://www.patent/de.com/20060921/DE102005011579A1.html>>; verfügbar am 05.09.2010

[7] Qiagen : *The QIAexpressionist™ : A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins*. – 5. Aufl. Venlo : 2003

- [8] Duplay P.; Bedouelle H.; Fowler A.; Zabin I.; Saurin W.; Hofnung M. : Sequences of the malE gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry*. – 259: (1984), 10,606-10,613
- [9] Kellerman O. K.; Ferenci T. : Maltose binding protein from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*. – 90: (1982), 459 – 463
- [10] Smith D.B.; Johnson K.S. : Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*. – 67: (1988), 31-40
- [11] Jinming Geng; Russ P. Carstens : Two methods for improved purification of full-length mammalian proteins that have poor expression and/or solubility using standard *Escherichia coli* procedures. *Protein Expression and Purification*. – 48: (2006) 142-150
- [12] de Marco Ario : Two-step metal affinity purification of double-tagged (NusA-His6) fusion proteins. *Nature Protocols*. – 1: (2006). 1538-1543
- [13] Terpe Kay : Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology And Biotechnology*. – 72: (2006), 211-222
- [14] Mülhardt Cornel : *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 6. Aufl. Heidelberg : Spektrum, Akad. Verl., 2009
- [15] *Expression und Reinigung rekombinanter Proteine*.
URL<<http://www.texys.de/biodata/expression.html>>, verfügbar am 05.09.2010
- [16] Novagen : *Novagen's pET System: The Gold Standard for Protein Expression*. – 10. Aufl. Darmstadt : 2003
- [17] Invitrogen : *Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems*. - Carlsbad : 2002
-

[18] Murphy Cheryl Isaac; Piwnica-Worms Helen : Overview of the Baculovirus Expression System. Current Protocols in Protein Science.- (1995), 5.4.1-5.4.4

[19] Invitrogen : Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques. – Carlsbad : 2002

[20] Laemmli U.K. : Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. – 227: (1970), 680-685

[21] Dümmler A, Lawrence AM, de Marco A.: Simplified screening for the detection of soluble fusion constructs expressed in E. coli using a modular set of vectors. Microbial cell factories 4: (2005), 34

Danksagung

Mein größter Dank gilt Dr. D. Drechsel, der mir das Thema meiner Bachelorarbeit am Max Planck Institut für molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden bereitgestellt hat und mich mit seinen konstruktiven Vorschlägen bei der Lösung der Aufgabe unterstützte.

Des Weiteren danke ich meinem Hochschulbetreuer Herrn Prof. Dr. Röbbbe Wünschiers, der mich während meiner Bachelorzeit sehr gut betreut und immer für Fragen zur Verfügung gestanden hat.

Mein besonderer Dank gilt Annett Dümmler, die mich im theoretischen Teil der Arbeit unterstützt und motiviert hat.

Zuletzt möchte ich mich bei den Kollegen, besonders Barbara Borgonovo, Mike Tip sword und Règis Lemaitre für ihre Betreuung und fachliche Unterstützung, bedanken.