

Transformation, Expression und Aufreinigung von Glycosyltransferasen in *E.coli* am Beispiel von Fucosyltransferase und Sialyltransferase

Bachelor Thesis

Im Studienfach Biotechnologie an der HAW-Hamburg

Im Zeitraum vom 26.06.-30.08.2013

Vorgelegt von: Stefanie Oelers

Matrikelnummer: 1956974

Erstgutachter: Prof. Dr. F. Birger Anspach

Zweitgutachter: Dr. Jürgen Kuballa

Erklärung

Hiermit versichere ich die folgende Bachelorarbeit selbständig erarbeitet, nur die angegebenen Quellen und keine weiteren Hilfsmittel verwendet zu haben.

Vielen Dank

Ich möchte mich bei der Firma GALAB Laboratories für die Bereitstellung dieses interessanten Themas bedanken. Durch diese Bachelorarbeit konnte ich viele neue Eindrücke und Erfahrungen sammeln.

Ich danke meinem Professor Dr. F. Birger Anspach, dass er sich bereit erklärt hat mein Erstgutachter zu sein und Dr. Jürgen Kuballa für die Übernahme der Zweitkorrektur. Beiden danke ich zudem für die stets nette und hilfreiche Betreuung. Für die Bereitstellung der benötigten Vektoren und die tolle Unterstützung im Labor gilt mein besonderer Dank Uma Katha, er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite, egal wie groß oder klein die „Probleme“ waren.

Bei Henning und Anna möchte ich mich herzlich für die Hilfe im Labor, die Unterstützung bei allen Problemen und für das Korrekturlesen bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir nicht nur mein Studium ermöglicht haben sondern auch immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich bei allen Höhen und Tiefen motiviert und unterstützt haben.

Inhalt

Erklärung.....	I
Vielen Dank.....	II
Abkürzungen.....	V
1. Einleitung.....	1
2. Theoretische Grundlagen.....	2
2.1 Glycosyltransferasen.....	2
2.2 α -1,2-Fucosyltransferase.....	2
2.3 α -2,3-Sialyltransferase.....	3
2.4 <i>Escherichia coli</i>	4
2.4.1 <i>E.coli</i> BL21 (DE3).....	4
2.4.2 <i>E.coli</i> SHuffle [®] T7.....	5
2.5 Transformation.....	5
2.6 Expression per pET-System.....	6
2.7 Zellaufschluss.....	7
2.8 Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie.....	8
2.9 Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	9
2.10 Western Blot.....	10
3. Geräte und Materialien.....	12
3.1 Geräte.....	12
3.2 Substanzen.....	13
3.3 Materialien.....	14
4. Methoden.....	15
4.1 Transformation.....	15
4.2 Ausplattieren nach der Transformation.....	15
4.3 Expression des Zielproteins.....	16
4.3.1 Optimierung der Expression.....	17
4.4 Ansatz größerer Zellkulturen.....	20
4.5 Zellaufschluss.....	22
4.6 Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie.....	23
4.6.1 Optimierung der Aufreinigung per IMAC.....	23
4.7 Expressionsüberprüfung.....	24
4.8 SDS-PAGE.....	24
4.9 Western Blot.....	28
4.10 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien.....	29

4.10.1	Nährmedien.....	29
4.10.2	Zellaufschluss.....	30
4.10.3	SDS-PAGE.....	30
4.10.4	Western Blot.....	32
4.10.5	Metallchelataffinitätschromatographie	33
5.	Ergebnisse	35
5.1	Expression und Aufreinigung der α -1,2-Fucosyltransferase	35
5.2	Expression und Aufreinigung der α -2,3- Sialyltransferase	43
6.	Diskussion	50
	Transformation und Expressionsüberprüfung.....	50
	Expressionsoptimierung der α -1,2-Fucosyltransferase.....	50
	Aufreinigung der α -1,2-Fucosyltransferase.....	51
	Expressionsoptimierung der α -2,3-Sialyltransferase	52
	Aufreinigung der α -2,3-Sialyltransferase.....	53
7.	Ausblick.....	55
8.	Zusammenfassung.....	56
9.	Literaturverzeichnis	i
9.1	Internetliteratur.....	ii
	Anhang.....	iv
	Sequenzen der verwendeten Proteine.....	iv
	Tabellenverzeichnis.....	vi
	Abbildungsverzeichnis.....	vii

Abkürzungen

Tabelle 1: Abkürzungen

Kürzel	Ausgeschrieben
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine serum albumin/ Rinderserumalbumin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat/ Ethylendiamintetraessigsäure
GDP	Guanosindiphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
IPTG	isopropyl- β -Dthiogalactopyranoside
LB-Medium	lysogeny <u>broth</u> Medium
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
OmpT	outer membrane protein 3b
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rcf	Relative Zentifugalbeschleunigung" (=RZB= RCF)
rpm	Revolutions per minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SV	<u>Säulenvolumen</u>
tag	Markierung
TBS	Tris Buffered Saline /Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/ Tromethamin/ Trometamol

1. Einleitung

Glycosyltransferasen sind wichtige Enzyme, die zur Synthese von Oligosacchariden benötigt werden. Fucosyltransferase wird zur Synthese von Fucosyllactose benötigt und die Sialyltransferase zur Synthese von Sialyllactose. Oligosaccharide wie die Sialyllactose und die Fucosyllactose kommen unter anderem in humaner Muttermilch vor. Durch solche Oligosaccharide wird das Immunsystem eines Säuglings gestärkt. Säuglingen, die nicht gestillt werden können, fehlt diese Immunabwehr bzw. sie ist nicht so gut ausgeprägt (Kunz et al, 2000). Aus diesem Grund ist es wichtig diese Oligosaccharide herzustellen, um sie Säuglings- und Kindernahrung zufügen zu können und somit auch das Immunsystem von Flaschenkindern zu stärken.

Das Ziel dieser Bachelorarbeit war es, Plasmide, die kodierende Gene für α -1,2-Fucosyl- bzw. α -2,3-Sialyltransferase tragen in *E.coli* zu transformieren, die Expression zu optimieren und die Enzyme bestmöglich aufzureinigen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Glycosyltransferasen

Glycosyltransferasen sind nützliche Enzyme zur Präparation von natürlichen Oligosacchariden und Glykokonjugaten (Palcic, 2011). Es gibt unzählige Glykosyltransferasen, jede mit einer eigenen Donor-, Akzeptor- und Bindungsspezifität (Ünlügil & Rini, 2000). Glycosyltransferasen katalysieren die Übertragung von Monosacchariden von einem Donor auf einen Saccharidakzeptor. Die Enzyme sind anhand der Donortypen, welche sie verwenden, klassifiziert (Palcic, 1999).

2.2 α -1,2-Fucosyltransferase

α -1,2-Fucosyltransferase spielt bei der Synthese von Fucosyloligosacchariden wie Fucosyllactose eine wichtige Rolle. Durch die enzymatische Fucosylierung von Lactose durch α -1,2-Fucosyltransferase kann Fucosyllactose synthetisiert werden. Bei der Synthetisierung von Fucosyllactose wird GDP-L-Fucose als Fucosespender benötigt (Lee, et al., 2012).

Eukaryotische α -1,2-Fucosyltransferasen haben eine typische Domänenstruktur. Sie bestehen aus einem N-terminalen Ende, welches sich im Zytoplasma befindet, einer Transmembrandomäne und einer Schaftregion, gefolgt von einer großen C-terminalen Domäne. Diese C-terminale Domäne ist globulär, sprich sie befindet sich außerhalb der Zelle, zudem ist sie der Ort der Katalyse. Bakterielle α -1,2-Fucosyltransferasen sind kürzer als die eukaryotischen. Zudem fehlen das N-terminale Ende und die Transmembrandomäne. In der Lokalisation im Golgi-Apparat und Bindung des Enzyms bei eukaryotischen α -1,2-Fucosyltransferasen spielen das N-terminale Ende und die Transmembrandomäne eine Rolle. Die Sequenz der bakteriellen α -1,2-Fucosyltransferase legt nahe, dass dieses Enzym ein lösliches Protein mit Lokalisation im Zytoplasma ist (Wang et al, 1999).

In dieser Arbeit wurde mit der α -1,2-Fucosyltransferase aus *Helicobacter pylori* J99 gearbeitet. Sie hat eine Größe von ca. 35 kDa. Die Sequenz für die α -1,2-

Fucosyltransferase ist im Anhang zu finden. Das Plasmid pET16, welches das Gen für die α -1,2-Fucosyltransferase trägt und mit dem in dieser Arbeit gearbeitet wurde, wurde von dem Doktoranden Uma Katha zur Verfügung gestellt.

2.3 α -2,3-Sialyltransferase

Durch Sialyltransferase wird die Übertragung von Neuraminsäuren (Sialinsäuren) auf Oligosaccharide katalysiert (Schwörer, 2004).

α -2,3-Sialyltransferase von dem Genom *Neisseria meningitidis* hat eine Größe von etwa 43 kDa. α -2,3-Sialyltransferase ist in der äußeren Membran lokalisiert. Die Sialylierung von Lipooligosacchariden (LOS) wird durch α -2,3-Sialyltransferase katalysiert, wobei 5'-cytidinemonophospho-N-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) als Zuckernucleotid-Donor benötigt wird (Shell et al, 2002). Die beiden Enzyme α -2,3-Sialyltransferase und CMP-Neu5Ac-Synthetase werden gemeinsam unter anderem zur Synthese von Sialyllactose und Sialyl-N-acetyllactosamine genutzt. α -2,3-Sialyltransferase ist unlöslich und kann seine Aktivität während der Lagerung verlieren. CMP-Neu5Ac-Synthetase wird für Synthesezwecke benötigt und ist gut löslich. Es besteht die Möglichkeit die beiden Enzyme α -2,3-Sialyltransferase und CMP-Neu5Ac-Synthetase zu fusionieren. Das so entstehende Fusionsenzym besitzt eine bessere Löslichkeit und Stabilität als die α -2,3-Sialyltransferase (Gilbert, et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde mit α -2,3-Sialyltransferase aus *Neisseria meningitidis* MC58 gearbeitet. Die α -2,3-Sialyltransferase wurde mit N-acylneuraminat cytidyltransferase zu einem Fusionsprotein fusioniert, zusätzlich ist noch ein His-tag angefügt. Die als Fusionsprotein exprimierte α -2,3-Sialyltransferase hat eine Größe von etwa 70 kDa. Eine einfache α -2,3-Sialyltransferase hätte eine Größe von ca. 43 kDa und das zweite Protein N-acylneuraminat cytidyltransferase von ca. 25 kDa. Der His-tag, der für die Aufreinigung per immobilisierter Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) benötigt wird, ist ca. 1 kDa groß.

Das Plasmid pET24a, welches das Gen für die α -2,3-Sialyltransferase trägt und mit dem in dieser Arbeit gearbeitet wurde, wurde von dem Doktoranden Uma Katha zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen für die beiden einzelnen Proteine sind im Anhang zu finden.

2.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E.coli*) wurden 1886 von dem Kinderarzt Theodor Escherich entdeckt und zum ersten Mal beschrieben. Es sind gram-negative, stäbchenförmige Bakterien mit einer Länge von 2-4 μm und einem Durchmesser von 1 μm (Knippers, 2006). *E.coli* werden oft als Wirt für die Expression von rekombinanter DNA genutzt. Dies kommt daher, dass *E.coli* schon gut erforscht und leicht zu kultivieren sind. Im Laufe der Jahre wurden *E.coli* zu einem der wichtigsten Organismen in der molekularbiologischen und gentechnischen Forschung (Campbell et al, 2006).

In dieser Arbeit wurden für die Expression von α -1,2-Fucosyltransferase kompetente *E.coli* Zellen des Typ BL21 (DE3) und für die Expression von α -2,3-Sialyltransferase des Typ SHuffle[®] T7 verwendet.

2.4.1 *E.coli* BL21 (DE3)

E.coli BL21 (DE3) Zellen sind chemisch kompetente Zellen, die für Transformation und Proteinexpression geeignet sind. *E.coli* BL21 (DE3) besitzen ein T7-RNA-Polymerasegen, eine Resistenz gegen T1 Phagen (*fhuA2*) sowie einen Mangel an Lon und OmpT Proteasen.

T1 ist ein äußerst virulenter Phage, dessen Aufnahme durch den Eisen-Hydroxamat-Rezeptors erfolgt. Durch die Entfernung des Gens zur Aufnahme des Eisen-Hydroxamat-Rezeptors bekommen die *E.coli* ihre Resistenz gegen T1 Phagen. Durch diese Resistenz werden die Transfektion und die Wachstumseigenschaften kaum beeinflusst.

E.coli B Stämme haben von Natur aus einen Mangel an Lon Protease. Lon Protease baut bei K-12 Stämmen falsch gefaltete Proteine ab und kann das Ansammeln von zellzyklusspezifischen Proteinen verhindern. OmpT Protease befindet sich bei den beiden *E.coli* Stämmen K-12 und B an der Oberfläche. Zellen, die einen Mangel an beiden Proteasen aufweisen, sind für die Produktion von Proteinen aus klonierten Genen gut geeignet.

Die T7-RNA-Polymerase wird von den Lambda Prophagen DE3 kodiert. T7-RNA-Polymerase wird unter Kontrolle des *lac* UV5-Promotor exprimiert, welcher gegenüber katalytischer Repression unempfindlicher ist als der *lac* Promotor des

Wildtyps. Diese DE3 Stämme können uninduzierte Expression aufweisen (New England Biolabs).

2.4.2 *E.coli* SHuffle[®] T7

SHuffle[®] T7 Zellen sind Zellen, die so entwickelt wurden, dass sie die Disulfidbrückenbildung im Zytoplasma fördern. SHuffle[®] T7 Zellen exprimieren eine chromosomale Kopie der Disulfidbindungsisomerase C (DsbC). Die Disulfidbindungsisomerase C fördert die Korrektur von falsch oxidierten Proteinen zurück zu deren korrekter Form und unterstützt die Faltung von Proteinen, die keine Disulfidbrückenbindungen ausbilden. SHuffle[®] T7 Zellen sind in der Lage, eine chromosomale Kopie der T7-RNA-Polymerase zu exprimieren. Zudem wird durch die Kontrolle der Expression durch den *lac*-Repressor *lacI^q* die Expression der toxischen Proteine ermöglicht. Wie die BL21 (DE3) Zellen haben auch die SHuffle[®] T7 Zellen eine Resistenz gegen T1 Phagen (*fhuA2*).

Die *lac*-Repressoren verhindern die Expression von *lac*, *tac* und *trc* Promotoren. Ist die Menge an *lac*-Repressoren nicht hoch genug um die Expression dieser Promotoren während der Transformation und des Zellwachstum zu unterdrücken, kann selbst eine geringe Expression dieser Promotoren zu einer Reduzierung der Transformationseffizienz führen. Zudem helfen zusätzliche Moleküle den *lac*-Repressoren in *lacI^q*-Stämmen die Promotoraktivitäten bis zur Aktivierung mit IPTG zu unterbinden.

Bei SHuffle[®] T7 Zellen sind die Gene für Glutaredoxin- und Thioredoxinreduktase gelöscht. Da Reduktasen normalerweise die Cysteine im Zytoplasma in deren reduzierten Form halten wird die Bildung von Disulfidbrückenbindungen unterdrückt. Die Mutation, bei dem die Reduktasen nicht vorhanden ist, ist für gewöhnlich letal für die Zellen. Durch das Peroxiredoxin-Enzym wird diese letale Wirkung unterdrückt. Die SHuffle[®] T7 Zellen exprimieren eine periplasmatische Disulfidbindungsisomerase C, der eine Sequenz fehlt, wodurch auch sie im Zytoplasma bleibt (New England Biolabs).

2.5 Transformation

Als Transformation wird der Vorgang bezeichnet, bei dem eine bakterielle Zelle Plasmid-DNA aus ihrer Umgebung aufnimmt und diese Plasmid-DNA zu einem Bestandteil der Zelle wird. Transformation wird bei andern Organismen als Bakterien

auch Transfektion genannt (Munk, 2001). Da die meisten Bakterien Fremd-DNA nicht freiwillig aufnehmen, müssen diese vorbehandelt werden. Vorbehandelte Zellen werden als kompetente Zellen bezeichnet. Es gibt mehrere Methoden um Zellen zu behandeln. Eine dieser Methoden ist die chemische Behandlung mit Calciumionen. Dabei werden die Zellen in eine sehr kalte Calciumlösung gegeben. Dadurch können sich die positiv geladenen Calciumionen an die Zellwand/ -membran anlagern. Durch die Anlagerung wird die Zellwand/-membran porös, wodurch wiederum das Eindringen von DNA ermöglicht wird.

Für die Transformation von Bakterienzellen wird normalerweise DNA verwendet, die in Plasmide eingebracht wurde. Die verwendeten Plasmide besitzen für gewöhnlich ein bis zwei Selektionseigenschaften wie z.B. Ampicillin- oder Kanamycinresistenz (Thieman & Palladino, 2007).

Für die Transformation per Hitzeschock wird die Plasmid-DNA mit den kompetenten Zellen gemischt und auf Eis inkubiert. Während der Inkubation auf Eis kann die Plasmid-DNA an die Zelloberfläche anlagern. Bei dem anschließenden Hitzeschock werden die Zellen für kurze Zeit auf 42°C erhitzt. Durch das Erhitzen entsteht ein Temperaturgefälle, welches das endgültige Eindringen der DNA in die Zellen ermöglicht (Thieman & Palladino, 2007). Diese Art von Behandlung überleben nicht alle Zellen, von daher wird ein Teil der Zellen nach der Transformation auf Agar-Platten, welche z.B. mit Ampicillin versetzt sind, ausplattiert. Auf diesen Agar-Platten können ausschließlich die Zellen wachsen, die diese Behandlung überlebt und die Plasmid-DNA aufgenommen haben und somit z.B. eine Ampicillinresistenz besitzen.

2.6 Expression per pET-System

Das pET-System ist ein leistungsstarkes System zur Klonierung und Exprimierung von rekombinanten Proteinen in *E.coli*. Die gewünschten Proteine werden in pET-Plasmiden (T7-Plasmiden) unter der Kontrolle von Translations- und Transkriptionssignalen der Bakteriophagen T7 kloniert. Die Expression wird durch die Bereitstellung der T7-RNA-Polymerase in der Wirtszelle (*E.coli*) induziert. T7-RNA-Polymerase ist sehr selektiv und aktiv. Wenige Stunden nach der vollständigen Induktion kann das Zielprotein über die Hälfte des gesamten Zellproteingehaltes eingenommen haben. Es ist trotz der hohen Leistungsfähigkeit dieses Systems möglich, die Expression des Zielproteins durch die Konzentrationsminderung des

eingesetzten Induktors zu senken. Bei einigen Proteinen kann diese Senkung und damit auch die Senkung der Expression zu einer höheren löslichen Proteinausbeute führen. Ein weiterer sehr praktischer Vorteil dieses Systems ist es, die Transkription bis zur Induktion der Expression in einem inaktiven Zustand zu halten.

Eine Möglichkeit dieses System zu nutzen besteht darin das Gen des Zielproteins zunächst in einem Wirt zu klonieren, welcher kein T7-RNA Polymerase-Gen besitzt. Dadurch wird eine eventuelle Instabilität des Zielproteins verhindert. Wenn sich das Gen in einem Wirt ohne T7-RNA Polymerase-Gen befindet, kann die Expression durch die Infizierung des Wirtes mit der Phage λ CE6 eingeleitet werden. Der Phage λ CE6 trägt das T7-RNA Polymerase-Gen, welches unter der Kontrolle von lacUV5 steht. Die zweite Möglichkeit, die Expression zu induzieren ist, das Gen des Zielproteins in einem Wirt, der schon das T7-RNA Polymerase-Gen besitzt, zu klonieren, so kann die Expression durch die Zugabe von IPTG oder Laktose zur Zellkultur induziert werden (Merck, 2011).

2.7 Zellaufschluss

Der Zellaufschluss ist ein wichtiger Verfahrensschritt zur Gewinnung von intrazellulären Produkten. Bei der Wahl der Aufschlussart muss berücksichtigt werden, dass die Aktivität der biologisch aktiven Moleküle nicht verloren geht, bzw. der Aktivitätsverlust so gering wie möglich gehalten wird (Chmiel, 2011). Ein Zellaufschluss kann physikalisch, chemisch oder biologisch erfolgen. Beispiele für die einzelnen Zellaufschlüsse sind osmotischer Druck (physikalisch, nicht-mechanischer Aufschluss), Ultraschall (physikalisch, mechanischer Aufschluss), durch Enzyme (biologischer Aufschluss), und durch Chelatbildner oder Detergenzien zur Senkung der Oberflächenspannung (chemischer Zellaufschluss). Häufig werden die einzelnen Verfahren kombiniert (Busch, 2010).

Bei der Extraktion der Proben ist eine Kühlung wichtig, da die Enzymaktivität bei niedrigen Temperaturen gehemmt wird (Busch, 2010).

In dieser Arbeit wurde der Zellaufschluss per BugBuster[®] Protein Extraction Reagent (BugBuster[®]) durchgeführt. BugBuster[®] wurde zur sanften Zellwandzerstörung von *E.coli* Zellen entwickelt um lösliche Proteine freizusetzen. Es ist eine schnelle und relativ einfache Alternative zu mechanischen Zellaufschlüssen. BugBuster[®] ist ein geschütztes Produkt, welches nicht-ionische und zwitterionische Detergenzien auf

einer Tris-Base enthält (Novagen®, 2008). Die Zellwand der *E.coli* wird durch die Detergenzien perforiert, ohne jedoch die löslichen Proteine zu denaturieren (Schär, 2006). Zu der BugBuster®-Lösung wurden in dieser Arbeit noch Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Lysozym und Benzonase hinzugegeben. Benzonase ist ein Enzym, welches alle Formen von DNA und RNA degradiert und die Verdauung von Nukleinsäuren unterstützt (Novagen, 1999). Lysozym ist ein Enzym, welches häufig zur Zellyse von Bakterienzellen verwendet wird. Dabei kommt es zur Zellyse durch Hydrolyse des Peptidoglycans in den Zellwänden. PMSF ist ein irreversibler Inhibitor von Serin Proteasen. PMSF hemmt effektiv den Proteinabbau durch die kovalente Derivatisierung des aktiven Zentrums (Rehm & Letzel, 2006).

2.8 Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie

Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie ist eine Methode, die zur Aufreinigung von Proteinen, insbesondere von Proteinen mit Histidin-tag (His-tag) genutzt wird. Das Prinzip dieser Methode beruht auf den Unterschieden in der Affinität der Proteine zu den Metallionen, welche durch Liganden wie z.B. immobilisierte Iminodiessigsäure zu einem Chelat an das Säulenmaterial gebunden sind (Janson, 2011). Histidin-markierte Proteine haben eine Affinität zu Nickel, Cobalt und mehreren anderen Metallionen, die mit chelatbildenden Liganden immobilisiert werden können. Dadurch kann ein Protein mit einem oder mehreren Histidin-tag selektiv an die oben genannten Metallionen binden, während die meisten anderen zellulären Proteine nicht oder nur sehr schwach binden (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2007). Die Bindung der Proteine wird durch den pH-Wert der verwendeten Puffer beeinflusst. Die meisten Proteine binden bei einem pH-Wert zwischen 6-8 am besten. Die an das Metallchelate gebundenen Proteine können auf zwei verschiedene Wege eluiert werden. Die erste Elutionsmöglichkeit ist es, den pH-Wert von einem neutralen in einen schwach sauren Bereich zu ändern. Die andere Elutionsmöglichkeit besteht in dem Einsatz eines Moleküls z.B. Imidazol, welches auch bei einem neutralen pH-Wert mit dem Protein um die Bindungsplätze konkurriert (Janson, 2011).

Für die Metallchelataffinitätschromatographie wurde eine selbstgepackte 1 ml TALON® Metal Affinity-Säule mit einer Flussrate von etwa 0,5 – 1 ml/min verwendet.

Das Prinzip dieser Säule beruht auf hydrostatischem Druck (Gravitationsdruck). Der hydrostatische Druck ist der Druck, der sich bei einer ruhenden Flüssigkeit durch den Einfluss der Schwerkraft einstellt.

2.9 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Elektrophoresen sind Trennungsmethoden, bei denen Protein- oder DNA-Gemische durch die Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld getrennt werden. Elektrophoresen gehören zu den wichtigsten Methoden für die Untersuchung und Charakterisierung komplexer Gemische.

Die sogenannte Gelelektrophorese ist ein trägergebundenes System. Bei einem trägergebundenen System erfolgt die Trennung der einzelnen Teilchen durch die Ladung und zu dem noch durch den Siebeffekt des Gels (Grund sind die Größe und Gestalt der zu trennenden Teilchen). Wie gut sich die Teilchen trennen lassen hängt von mehreren Faktoren wie der Größe und der Gesamtladung des Moleküls, Porengröße des Trägers, pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke des Puffers und der elektrischen Feldstärke ab. Für viele Trennungen werden polymere Matrizen wie Celluloseacetat, Stärke, Agarose oder Polyacrylamid als Träger verwendet. Dadurch werden physikalische Effekte wie Konvektion und Diffusion umgangen. Für die Gelelektrophorese von Proteinen wird hauptsächlich Polyacrylamid als Trägermaterial verwendet, da es das höchste Trennungsvermögen besitzt (Jansohn & Rothhämel, 2012).

Bei den Gelelektrophoresen gibt es das kontinuierliche und das diskontinuierliche Verfahren. Bei dem diskontinuierlichen Verfahren, dem Lämmli-System, besteht das Gel aus einem sogenannten Sammel- und einem Trenngel, wobei sich das Sammelgel über dem Trenngel befindet. Sammel- und Trenngel unterscheiden sich in ihrer Acrylamidkonzentration (Rehm & Letzel, 2006). Zu dem unterscheiden sich Trenn- und Sammelgel im pH-Wert, in der Salzkonzentration und auch in der Porengröße. Das Sammelgel besitzt eine größere Porenweite, eine niedrigere Salzkonzentration sowie einen niedrigeren pH-Wert als das Trenngel.

Die im Sammelgel enthaltenen Chloridionen haben eine größere, die Glycinionen im Probenpuffer eine geringere elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit als die Proteine in der Probe. Dadurch sammelt sich die Probe zwischen den Chlorid- und den Glycinionen und wird zu einer schmalen Bande konzentriert, bevor sie durch das

Trenngel wandert. Bei jeder Art von Gelelektrophorese wird zum Vergleich ein Proteinmarker mit bekannter Zusammensetzung (Größe der im Marker enthaltenen Proteine) neben den Proben aufs Gel aufgetragen.

Die Struktur des Polyacrylamids baut sich aus der radikalischen Polymerisation des monomeren Acrylamids und einem quervernetzenden bifunktionellen Reagenz auf. Die Acrylamidkonzentration ist in einem Bereich von 2% - 30% variabel, somit auch die Porengröße. In einem Polyacrylamidgel werden die größeren Moleküle stärker zurückgehalten als die kleineren. Je größer die Acrylamidkonzentration, desto größer ist auch der molekulare Siebeffekt (Jansohn & Rothhämel, 2012).

Bei der Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bilden die Proteine in Gegenwart von SDS einen negativ geladenen Komplex. Dieser SDS-Proteinkomplex hat ein konstantes Verhältnis von der Ladung zur Masse. Durch die negative Ladung des SDS-Proteinkomplexes wandert dieser zur positiv geladenen Anode (Rehm & Letzel, 2006). Bevor die Proben auf das Gel geladen werden, werden diese mit einem Probenpuffer, der 0,1% SDS und Dithiothreitol (DTT) oder Mercaptoethanol enthält, durch Erhitzen denaturiert. Durch das DTT oder Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken reduziert und durch SDS Protein-Protein Wechselwirkungen verhindert (Jansohn & Rothhämel, 2012).

2.10 Western Blot

Der Western Blot wird auch Immunoblot genannt. Vom Western Blot gibt es mehrere Varianten z.B. den South-Western Blot, Liganden-Blotting oder Enzym-Blotting. Die verschiedenen Varianten basieren auf einem gemeinsamen Schema, es sind nur die jeweiligen bindenden Liganden und deren Nachweisreagenz angepasst.

Durch einen Western Blot kann man Informationen über die Spezifität der Nachweisreaktionen oder den Eigenschaften sowie der Menge der Proteine erhalten. Der Western Blot wurde ursprünglich für die Ermittlung der Molmasse eines Proteins über die Bindung von spezifischen Antigenen oder zur Ermittlung der Spezifität von Antikörpern zu Antigenen entwickelt (Jansohn & Rothhämel, 2012).

Beim Western Blot werden Proteine von Polyacrylamid-Gelen auf eine Membran übertragen mit denen sie eine starke Bindung eingehen (Twyman & Primose, 2006). Membranen sind im allgemeinen besser zu handhaben als Gele, da keine Diffusionsprobleme auftreten und die Reaktionen und Waschschriffe besser und

somit schneller ablaufen können. Die Membranen können aus Nitrozellulose, Nylon oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) bestehen. Proteine gehen z.B. mit der PVDF-Membran eine hydrophobe Wechselwirkung ein (Rehm & Letzel, 2006).

Die an der Membran gebundenen Proteine stehen für eine Analyse durch eine Vielzahl von spezifischen Proteinliganden-Wechselwirkungen zur Verfügung. Um spezifische Antigene zu erkennen werden am häufigsten Antikörper verwendet. Zur Identifizierung von Glykoproteinen werden Lektine verwendet. In diesem Fall kann die Sonde, welche zur Detektion verwendet wird, mit Radioaktivität oder einer anderen Markierung (*tag*) markiert werden. Häufig ist die Sonde jedoch unmarkiert und wird durch ein zweites Molekül, welches markiert ist, in einer Sandwich-Reaktion erfasst. Diese zweiten Moleküle können auf vielfältige Weise markiert sein, z.B. mit einem radioaktiven, Enzym-, oder fluoreszierenden *tag*. Die Sandwich-Methode kann aufgrund der multivalenten Bindungen von Antikörper-Molekülen eine erhöhte Empfindlichkeit aufweisen (Twyman & Primose, 2006).

3. Geräte und Materialien

In diesem Abschnitt sind alle verwendeten Geräte, Materialien und Substanzen aufgelistet.

3.1 Geräte

Tabelle 2: Geräteliste

Gerät	Typ	Firma
Autoklav	VE-150	Systemec
Blotting Apparatur		
Gefriertrocknungsanlage	ALPHA 1-4 Ldplus	CHRIST
Magnetrührer	smart stir SB161	
Magnetrührer	RH-KT/C	IKA
Netzteil	PowerPac300	Bio Rad
Netzteil	EPS 2A200	Hofer
pH-Meter	pH 211 Microprocessor	Hanna Instruments
pH-Meter	seven Easy	Mettler Toledo
Schüttelinkubator	Max Q	Thermo scientific
Schüttler	Promax 1020	Heidolph Instruments
Schüttler mit Kippbewegung	3013	GFL
Sicherheitswerkbank	SC-R Class II	Labcaire
Thermomixer	5436	Eppendorf
Thermomixer	comfort	Eppendorf
UV-Spektrometer	Helios 3	Thermo Spectronic
Vortexer	MS3 basic	IKA
Waage	GX- 2000	AND
Waage	GX-600	AND
Zentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf

3.2 Substanzen

Tabelle 3 Chemikalienliste

Name	Lieferant
2-(N-morpholine)-ethansulfonic acid (MES)	SIGMA ALDRICH
2-Propanol	ROTH
3,5-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid	ROTH
Ampicillin	SIGMA ALDRICH
Anti-Mouse IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in rabbit (10 – 20 mg/ml)	SIGMA ALDRICH
Benzoase® Nuclease (Reinheit: 90%)	Merck
Bromphenol Blue	SIGMA ALDRICH
BSA (98%)	SIGMA ALDRICH
BugBuster® Protein Extraction Reagent	Merck Cat No. 70584-4
CoCl ₂	Merck
Coomassie Blue Färbelösung	SIGMA ALDRICH
DL-Dithiothreitol	SIGMA ALDRICH
EDTA	Fluka
Essigsäure	Merck
Ethanol	Carl Roth
Glycerin	ROTH
Glycin	ROTH
HEPES-Base	SIGMA ALDRICH
His-probe Antibody a mouse monoclonal IgG (200 µg/ml)	Santa Cruz Biotechnology
Imidazol	Carl Roth
IPTG	ROTH
Kanamycin	SIGMA ALDRICH
Lauriyl Sulfate (Sodium dodecyl sulfate)	SIGMA ALDRICH
LB-Broth, Miller	Neogen corporation
Lysozym	SIGMA ALDRICH
Methanol	VWR
NaCl	VWR
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo scientific
Phenylmethylsulfonylfluorid	ROTH
Prestained SDS-Page Standards, low range	BIO RAD
TEMED	ROTH
Tris Base (99,3%)	Molekula
Tris-HCl	Molekula
Tween 20	SIGMA ALDRICH

3.3 Materialien

Tabelle 4 Materialienliste

Materialien	Hersteller
Bechergläser	
Biosphere® Filter Tips 100-100 µL 2-100 µL	Biosphere® plus
Cpyoröhrchen 2 mL	VWR International
Gel Blot Paper 10x10 cm	
Gel Loading Tip 0,5-200 µl	Costar
Kolbenhubpipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
1000 µL 200 µl 10 µL	
PVDF-Membran (ProBlott® membranes)	Applied biosystems
SafeSeal tubes	Sarstedt
2 mL 1,5 mL 0,5 mL	
TALON® Metal Affinity Resins (Säulen Beads)	Clontech
Tubes	Sarstedt
50 mL 15 mL 13 mL	
ZelluTrans Dialysierschlauch	Roth

Tabelle 5 Verwendete Zellen

	Herkunft	Eigenschaften
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	New England Biolabs C2527I; Lot 18	Transformation Effizienz: 1-5 x 10 ⁷ KBE/ ug pUC19 DNA T7 Expressionsstamm Mangel an den Proteasen Lon und OmpT Beständig gegen Phagen T1 (fhuA2) Frei von tierischen Produkten
<i>E.coli</i> SHuffle® T7	New England Biolabs C3026H; Lot: 3	Transformation Effizienz: 1 x 10 ⁶ KBE/ ug pUC19 DNA fördern Disulfidbindungsbildung im Zytoplasma Exprimieren eine chromosomale Kopie des Disulfidbindungsisomerase DsbC und eine chromosomale Kopie des T7 RNAPolymerase Eine strenge Kontrolle der Expression durch lacIq ermöglicht potentiell toxische Gene geklont werden Widerstand gegen Phagen T1 (fhuA2)

4. Methoden

Die in den Methoden verwendeten Puffer und deren Herstellung sind unter verwendete Puffer 4.10 und dann dem jeweiligem Abschnitt zu finden. Alle Arbeiten mit den Zellen und deren Medien, wie Transformation, Ausplattieren und Expression wurden unter einer Steril-Werkbank durchgeführt. Soweit nicht anders beschrieben wurden für die α -2,3-Sialyltransferase LB-Medium versetzt mit Kanamycin und *E.coli* SHuffle® T7 Zellen verwendet und bei 30°C inkubiert. Bei der α -1,2-Fucosyltransferase wurden *E.coli* BL21 (DE3) Zellen und LB-Medium versetzt mit Ampicillin verwendet und bei 37°C inkubiert. Die Konzentrationen der Antibiotikastocks sind unter 4.10 zu finden. Die in den Methoden angegebenen Mengen von IPTF, Lysozym und PMSF wurden aus den jeweiligen Stocklösungen entnommen, die in 4.10 beschrieben sind

4.1 Transformation

Ein Reaktionsgefäß mit kompetenten *E.coli* BL21 (DE3) und eins mit *E.coli* SHuffle® T7 Zellen wurden von -80°C auf Eis aufgetaut und anschließend wurden 5 μ l (1 pg-100 ng) der entsprechenden Plasmid-DNA hinzu pipettiert. Zu den *E.coli* BL21 (DE3) Zellen wurde die Plasmid-DNA für α -1,2-Fucosyltransferase und zu den *E.coli* SHuffle® T7 Zellen wurde die Plasmid DNA für die α -2,3-Sialyltransferase pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden im Eis geschüttelt und 30 min auf Eis gelegt. Während der 30 Minuten wurde ein Wasserbad auf 42°C aufgeheizt. Für den Hitzeschock wurde nach den 30 min das Reaktionsgefäß mit den *E.coli* BL21 (DE3) Zellen für genau 20 s und das Reaktionsgefäß mit den *E.coli* SHuffle® T7 Zellen für genau 45 s in das Wasserbad gehalten. Direkt im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße für 5 min auf Eis gelegt. Daraufhin wurden 950 μ l SOC-Medium mit Raumtemperatur zu den Zellen gegeben. Die Zellkulturen wurden für 60 min bei 37°C (BL21 (DE3)) bzw. bei 30°C (SHuffle® T7) und 350 rpm geschüttelt.

4.2 Ausplattieren nach der Transformation

Zur Überprüfung der Transformationen wurden die Zellen auf LB Platten ausplattiert. Es wurde Medium zum Platten gießen angesetzt (siehe 4.10) und autoklaviert. Als das Medium auf ca. 50°C abgekühlt war wurde das Medium einmal für die *E.coli*

BL21 (DE3) Zellen mit 100 µl/100 ml des Ampicillinstocks und für die *E.coli* SHuffle® T7 Zellen mit 100µL/100 ml des Kanamycinstocks versetzt. Mit diesen Medien wurden die benötigten Platten gegossen. Nach dem die Platten ausgehärtet waren, wurden sowohl von der *E.coli* BL21 (DE3) Zellkultur als auch von der *E.coli* SHuffle® T7 Zellkultur auf einer Platte 60 µl und auf einer andern 30 µl mit einem Drigalskispatel ausplattiert. Dafür wurde die Zellsuspension in die Mitte der Platte pipettiert und mit einem Drigalskispatel auf der ganzen Platte verteilt. Nach dem die Lösung leicht angetrocknet war, wurden die Platten der *E.coli* BL21 (DE3) Zellen mit dem Deckel nach unten über Nacht bei 37°C und die Platten der *E.coli* SHuffle® T7 Zellen ebenfalls mit dem Deckel nach unten bei 30°C inkubiert. In jedem Inkubator wurde noch eine Platte ohne Zellen als Negativkontrolle mit inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 4°C gelagert.

4.3 Expression des Zielproteins

Für die Auswahl einer Zellkolonie von der Platte wurden für die *E.coli* BL21 (DE3) Zellen je fünfzehn 13 ml-Reaktionsgefäße mit je 2 ml LB-Medium mit 20 µL des Ampicillinstocks und für die *E.coli* SHuffle® T7 acht 13 ml-Reaktionsgefäße mit je 2 ml LB-Medium und 20 µL des Kanamycinstocks vorbereitet. Vor dem Picken der Zellkolonien wurden diese markiert und nummeriert. Die Zellkolonien wurden mit je einer Pipettenspitze gepickt und die Pipettenspitzen in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben. Für die Sauerstoffversorgung wurde ein Loch in den Deckel der Reaktionsgefäße gestochen. Die Zellkulturen der *E.coli* BL21 (DE3) Zellen wurden über Nacht bei 37°C und die Zellkulturen der *E.coli* SHuffle® T7 Zellen bei 30°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde für jede Zellkultur ein neues 13 ml-Reaktionsgefäß mit dem entsprechenden Medium vorbereitet. Von den Zellkulturen wurden nach einmaligem Schütteln je 20 µl entnommen und in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben. Es wurde ein Loch in den Deckel des Reaktionsgefäßes gestochen und die frisch angesetzten Zellkulturen bei 37°C bzw. 30°C geschüttelt, bis die Zelldichte eine optische Dichte (OD) zwischen 0,5 und 0,8 erreicht hatte. Für die Messung der Zelldichte wurde das reine LB Medium mit Ampicillin bzw. Kanamycin bei 600 nm in einer Einmalküvette als Blank gemessen. Von der Zellkultur wurde 1 ml entnommen und bei gleicher Wellenlänge gemessen. Die Differenz zwischen den beiden Messungen ist die eigentliche OD. Als die OD zwischen 0,5 und 0,8 war wurden die Zellen mit 1 mM IPTG aktiviert und über Nacht

bei 37°C bzw. 30°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 50 µl der Zellkultur mit 10 µl 6fach Probenpuffer vermischt und für 4 min bei 94°C erhitzt. Es wurde mit diesen Proben eine SDS-PAGE durchgeführt (4.8 SDS-PAGE). Auf die Gele wurden 5 µl (BL21 (DE3)) und 10 µl (SHuffle® T7) von jeder Probe geladen. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde mit den Gelen ein Western Blot durchgeführt (4.9 Western Blot). Anhand der Western Blot Ergebnisse wurden drei Kolonien der *E.coli* BL21 (DE3) und zwei Kolonien der *E.coli* SHuffle® T7 Zellen ausgewählt um mit ihnen die Expression zu optimieren.

Sowohl für die α -2,3-Sialyltransferase als auch für die α -1,2-Fucosyltransferase wurden von den ausgewählten Zellkulturen frische 5 ml Kulturen angesetzt und diese mit 400 µl Glycerin versetzt und als Zellstock, für weitere Versuche, bei -80°C gelagert.

4.3.1 Optimierung der Expression

Da zuerst die Expression der α -1,2-Fucosyltransferase optimiert wurde weichen hier die Vorgehensweisen zwischen α -1,2-Fucosyltransferase und α -2,3-Sialyltransferase in einigen Punkten etwas voneinander ab.

4.3.1.1 *Expressionsoptimierung für die α -1,2-Fucosyltransferase*

In diesem Abschnitt wird nur die Expressionsoptimierung der α -1,2-Fucosyltransferase beschrieben. Die Expressionsoptimierung der α -2,3-Sialyltransferase ist unter 4.3.1.2 zu finden.

IPTG-Optimierung

Für die Optimierung der IPTG-Menge wurden drei der 15 getesteten Kolonien verwendet um zu sehen ob ein Unterschied zwischen den Kolonien besteht. Es wurde LB Medium mit 10 µl/10 ml des Ampicillinstocks LB-Medium angesetzt. Eine Pipettenspitze wurde in die Zellkultur der drei gepickten Kolonien (Nr. 4, 7, 15) getaucht und diese in ein 15 ml-Reaktionsgefäß mit 2 ml angesetztem LB-Medium gegeben. Diese neu angesetzte Zellkultur wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde für die Zellen neues LB-Medium mit Ampicillin

(10 µl/10 ml) angesetzt. Es wurden je 2 ml des Mediums in ein 15 ml-Reaktionsgefäß gegeben und dieses mit 20 µl der Übernachtskultur angeimpft. Bei einer OD von 0,778 (nach 2,5 h) wurden pro Zellkultur (Nr. 4, 7, 15) fünf verschiedene Konzentrationen an IPTG zugegeben. (Tabelle 6 IPTG Konzentration für die IPTG-Optimierung) Die mit IPTG aktivierten Zellkulturen wurden wieder über Nacht bei 37°C geschüttelt und am nächsten Morgen in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 10 min bei 10000 rcf abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 400 µl BugBuster® aufgeschlossen. Genaue Durchführung siehe 4.5. Im Anschluss an den Zellaufschluss wurde eine SDS-Page (siehe 4.8) und ein Western Blot (siehe 4.9) durchgeführt. Es wurden 7,5 µl der Proben auf das Gel geladen.

Tabelle 6 IPTG Konzentration für die IPTG-Optimierung

Reaktionsgefäßnummer	IPTG [mM/ml]	IPTG [µl/2 ml]
1	0,50	10
2	0,75	15
3	1,00	20
4	1,25	25
5	1,50	30

Temperaturoptimierung

Für die Temperaturoptimierung der Expression wurden drei neue Kolonien von der Platte gepickt und über Nacht in 2 ml LB-Medium mit 20 µl Ampicillin bei 37°C geschüttelt. Es wurden 12 Reaktionsgefäße mit jeweils 2 ml LB-Medium + 20 µl des Ampicillinstocks vorbereitet (für jede Kolonie vier: Blank, 18°C, 28°C, 37°C). Von den Übernachtskulturen wurden je 20 µl in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben. Die frischen Zellkulturen wurden bis zu einer OD von 0,721 (nach 2,5 h) bei 37°C geschüttelt und dann 20 µl IPTG hinzugefügt, so dass die Endkonzentration 1 mM entsprach. Die Zellkulturen wurden bei den jeweiligen Temperaturen geschüttelt (je drei Zellkulturen und ein Blank bei 18°C, 28°C und 37°C). Die Zellkulturen bei 18°C und 28°C wurden über Nacht und die bei 37°C für 6 h geschüttelt. Die 37°C Zellkulturen wurden nach den 6 h bis zum nächsten Tag bei 4°C aufbewahrt. Alle Zellkulturen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 10000 rcf für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet per BugBuster® aufgeschlossen (siehe 4.5). Es wurde mit den aufgeschlossenen Zellen eine SDS-

PAGE durchgeführt (siehe 4.8) wobei vom Pellet und vom Überstand je 5 µl auf die Gele aufgetragen wurden. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde noch ein Western Blot durchgeführt (siehe 4.9).

IPTG und Temperaturoptimierung

Um die IPTG Menge und die Temperaturen gleichzeitig zu optimieren wurden von den Stammkulturen (Nr. 4 und 15) Zellen ausplattiert. Dafür wurde eine Impföse in die Stammkulturen getaucht und diese auf der LB + Ampicillin Platte ausgestrichen. Es wurden beide Stammkulturen auf zwei Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Von jeder Stammkultur wurden zwei Kolonien von einer Platte gepickt und die Pipettenspitzen in die mit 2 ml LB-Ampicillin Medium vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben. Diese Zellkulturen wurden über Nacht bei 37°C geschüttelt und am nächsten Tag zum Animpfen je eines der vorbereiteten Reaktionsgefäße verwendet. Es wurden pro Stammkultur Reaktionsgefäße für drei verschiedene Temperaturen und pro Temperatur fünf verschiedene IPTG Konzentrationen sowie eine Negativkontrolle (Blank) vorbereitet. Das ergab 16 Reaktionsgefäße pro Stammkultur. Die Reaktionsgefäße wurden bis zu einer OD zwischen 0,5 und 0,8 bei 37°C geschüttelt und anschließend die entsprechende Menge IPTG (siehe Tabelle 7 IPTG-Konzentration für die IPTG-Temperatur-Optimierung) hinzugefügt.

Tabelle 7 IPTG-Konzentration für die IPTG-Temperatur-Optimierung

Reaktionsgefäßnummer	IPTG [mM/ml]	IPTG [µl/2 ml]
1	0,10	2
2	0,25	5
3	0,50	10
4	0,75	15
5	1,00	20

In jedes Reaktionsgefäß wurde ein Luftloch gestochen. Es wurden alle Konzentrationen einmal bei 18°C, 25°C und 37°C über Nacht geschüttelt. Alle Zellkulturen wurden am nächsten Morgen in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 10000 rcf für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet per BugBuster[®] aufgeschlossen (siehe 4.5). Es wurde mit den aufgeschlossenen Zellen eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe 4.8). und vom Pellet und Überstand je 7,5 µl auf

die Gele aufgetragen. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde noch ein Western Blot durchgeführt (siehe 4.9)

4.3.1.2 Expressionsoptimierung der α -2,3-Sialyltransferase

Auf Grund der Erfahrungen mit der α -1,2-Fucosyltransferase wurde bei der α -2,3-Sialyltransferase direkt die gemeinsame Optimierung von IPTG und Temperatur durchgeführt.

IPTG und Temperatur-Optimierung

Für die gemeinsame Optimierung der Temperatur und IPTG-Menge wurden die Stammkulturen 3 und 7 ausgewählt. Bevor die Stammkulturen wie in 4.3 beschrieben gelagert wurden, wurden je 20 μ l der Zellkulturen in ein mit 2 ml LB-Kanamycin Medium vorbereitetes Reaktionsgefäß pipettiert. Es wurden pro Stammkultur Reaktionsgefäße für drei verschiedene Temperaturen und pro Temperatur fünf verschiedene IPTG Konzentrationen sowie eine Negativkontrolle vorbereitet. Das ergab 16 Reaktionsgefäße pro Stammkultur. Die Reaktionsgefäße wurden bis zu einer OD größer als 0,5 bei 30°C geschüttelt und anschließend die entsprechende Menge IPTG (siehe Tabelle 7 IPTG-Konzentration für die IPTG-Temperatur-Optimierung) hinzugefügt. In jedes Reaktionsgefäß wurde ein Luftloch gestochen. Es wurden alle Konzentrationen einmal bei 18°C, 25°C und 30°C über Nacht geschüttelt. Alle Zellkulturen wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 10000 rcf für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet per BugBuster[®] aufgeschlossen (siehe 4.5). Es wurde mit den aufgeschlossenen Zellen eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe 4.8). und von Pellet und Überstand je 7,5 μ l auf die Gele aufgetragen. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde noch ein Western Blot durchgeführt (siehe 4.9)

4.4 Ansatz größerer Zellkulturen

Für die Aufreinigung der beiden Enzyme wurden größere Zellkulturen angesetzt.

Kultivierung der Zellen zur α -1,2-Fucosyltransferase-Expression

Für die α -1,2-Fucosyltransferase wurden drei 50 ml Kulturen angesetzt. Für eine wurde von der in der Optimierung verwendeten Kolonie 4 eine frische

Übernachtskultur vorbereitet. Für die anderen beiden 50 ml Kulturen wurden Zellen aus dem gelagerten Zellstock auf Eis aufgetaut und die Zellen mit einer Impföse auf frischen Platten ausplattiert. Diese Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für beide Übernachtskulturen wurden zwei Reaktionsgefäße mit 2 ml Medium vorbereitet. Eine Pipettenspitze wurde in die vorhandene Zellkultur der Kolonie 4 getippt bzw. es wurde eine Kolonie von der frischen Platte gepickt und in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben. Die neuen Zellkulturen wurden über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden drei autoklavierte 250 ml Erlenmeyerkolben mit je 50 ml Medium vorbereitet und mit 500 µl Übernachtskultur angeimpft (zwei mit der Übernachtskultur der „neuen“, aufgetauten und ausplattierten Zellen und eine mit der Übernachtskultur der „alten“ noch vorhandenen Zellen der Kultur 4). Die drei 50 ml Kulturen wurden bis zu einer OD zwischen 0,5 und 0,8 bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden zwei Kulturen mit 375 µl IPTG induziert, so dass die Zellkulturen eine IPTG-Endkonzentration von 0,75 mM hatten. Eine Zellkultur wurde mit 250 µl IPTG induziert, dies entsprach einer IPTG-Endkonzentration von 0,5 mM. Von den aufgetauten und ausplattierten Zellen wurden eine der Zellkulturen mit der IPTG-Konzentration von 0,75 mM und der Expressionstemperatur von 25°C und die Zellkultur mit der IPTG-Konzentration von 0,5 mM und der Expressionstemperatur von 18°C angeimpft. Mit den noch vorhandenen Zellen wurde die zweite Kultur mit der IPTG-Konzentration von 0,75 mM angeimpft. Die beiden Zellkulturen mit einer Endkonzentration von 0,75 mM wurden über Nacht bei 25°C geschüttelt und die Zellkultur mit der Endkonzentration von 0,5 mM wurde über Nacht bei 18°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Zellkulturen in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 20 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand nach dem Zentrifugieren wurde verworfen und die Pellets bis zum Zellaufschluss bei -20°C gelagert.

Kultivierung der Zellen zur α -2,3-Sialyltransferase-Expression

Für die α -2,3-Sialyltransferase wurden zwei 50 ml Kulturen, eine 250 ml und eine 500 ml Kultur angesetzt. Dafür wurden, mit Ausnahme der 500 ml Kultur, von der in der Optimierung verwendeten Kolonie 3, fünf frische Übernachtskulturen vorbereitet. Für die 500 ml Kultur wurden Zellen aus dem gelagerten Zellstock auf Eis aufgetaut und mit einer Impföse die Zellen auf frischen Platten ausplattiert. Diese Platte wurde über Nacht bei 30°C inkubiert. Für die Übernachtskulturen wurden fünf

Reaktionsgefäße mit 2 ml Medium vorbereitet. Eine Pipettenspitze wurde in die vorhandene Zellkultur der Kolonie 3 getippt bzw. eine Kolonie von der frischen Platte gepickt und in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben. Die neuen Zellkulturen wurden über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden zwei 250 ml autoklavierte Erlenmeyerkolben mit je 50 ml Medium, zwei 1 l Erlenmeyerkolben einmal mit 250 ml und einmal mit 500 ml Medium vorbereitet. Die 50 ml Kulturen wurden mit 500 µl, die 250 ml Kultur mit 2,5 ml und die 500 ml Kultur mit 5 ml der Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen wurden bis zu einer OD zwischen 0,5 und 0,8 bei 30 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Kulturen mit IPTG induziert. Eine der 50 ml Kulturen wurde mit 125 µl IPTG induziert, so dass die Zellkultur eine IPTG-Endkonzentration von 0,25 mM hatte. Die anderen Zellkulturen wurden so mit IPTG induziert, dass sie eine IPTG-Endkonzentration von 0,5 mM hatten (50ml mit 250µl, 250ml mit 1250µl und 500ml mit 2,5ml). Die Zellkulturen wurden über Nacht bei 18 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Zellkulturen in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 20 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand nach dem Zentrifugieren wurde verworfen und die Pellets bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

4.5 Zellaufschluss

Die Zellen wurden per BugBuster[®] aufgeschlossen. Dafür wurden zu 10 ml BugBuster[®] 100 µl Lysozyme, 200 µl PMSF und 1 µl Benzonase hinzugefügt. Die Zellkulturen wurden für 10 min bei 10000 rcf zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Lösen des Zellpellets kleiner Zellkulturen wurden 1/5 des ursprünglichen Zellkulturvolumens an BugBuster[®] verwendet. (z.B. bei einer 2 ml Kultur wurden 400 µl BugBuster[®] verwendet.) Nach dem Aufschließen des Pellets wurde das Reaktionsgefäß für 20 min auf Eis geschüttelt. Im Anschluss an das Schütteln wurden die Zellen bei 10000 rcf und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand des Zellaufschlusses wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Das Pellet wurde in TBS-Puffer gelöst, wobei das gleiche Volumen wie vom BugBuster[®] verwendet wurde und der TBS-Puffer auf Eis gekühlt sein musste. Von dem Überstand und gelöstem Pellet wurden 50 µl abgenommen und als Probe für eine SDS-PAGE auf Eis gestellt.

4.6 Immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie

Für die immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie (IMAC) wurden die Zellen per BugBuster[®] aufgeschlossen (siehe 4.5), wobei für das Pellet einer 50 ml Zellkultur 4 ml, für das Pellet einer 250 ml Zellkultur 10 ml und für eine 500 ml Zellkultur 12 ml BugBuster[®] und der Überstand des Zellaufschlusses 1/1 mit Equilibrierungspuffer verdünnt wurde.

Für die Metallchelataffinitätschromatographie wurde eine selbstgepackte 1 ml TALON[®] Metal Affinity-Säule mit einer Flussrate von etwa 0,5 – 1 ml/min verwendet. Zur Vorbereitung wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen (SV) H₂O dest. gewaschen, anschließend mit 5 SV CoCl₂ beladen und wieder mit 5 SV H₂O dest. gewaschen. Um die nicht an die Säule gebundenen Cobaltionen zu entfernen wurde die Säule mit 3 ml einer 300 mM NaCl-Lösung und ein weiteres Mal mit H₂O dest. gewaschen. Zum Equilibrieren des Säulenmaterials wurde die Säule zwei Mal mit 5 SV Equilibrierungspuffer gewaschen. Nach dem Equilibrieren wurde die Probe auf die Säule gegeben. Der Durchfluss der Probe sowie die weiteren Durchflüsse wurden auf Eis aufgefangen und dort bis zur weiteren Bearbeitung gelagert. Von den aufgefangenen Durchflüssen wurden Proben für eine SDS-PAGE genommen. Nach der Aufgabe der Probe wurde die Säule zwei Mal mit 5 SV Waschpuffer gewaschen. Zum Eluieren des Proteins wurden zwei Mal 5 SV Elutionspuffer auf die Säule gegeben. Zum Abschluss wurde die Säule mit 5 SV MES-Puffer und 5 SV H₂O dest. gewaschen. Die Säule wurde in 20%igem Ethanol bei 4°C gelagert. Von den aufgefangenen Durchflüssen wurden je 50 µl für die Durchführung einer SDS-PAGE abgenommen (siehe 4.8).

Nach vier Reinigungsdurchläufen wurde die Säule komplett regeneriert. Dafür wurde die Säule mit 10 SV einer 0,2 M EDTA-Lösung gespült, so dass alle Cobaltionen von dem Säulen Material gewaschen wurden. Anschließend wurde die Säule mit mindestens 10 SV H₂O dest gespült und wie oben beschrieben wieder mit CoCl₂ beladen.

4.6.1 Optimierung der Aufreinigung per IMAC

Bei der α -2,3-Sialyltransferase wurden verschiedene Optimierungsschritte bei der Aufreinigung vorgenommen.

Bei der 250 ml Kultur wurde die Säule vor der Aufgabe der Probe von unten verschlossen. Die Probe wurde auf die Säule gegeben und nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde wurde die Säule wieder geöffnet. Der Durchfluss wurde wie oben beschrieben aufgefangen. Zusätzlich zu der veränderten Inkubationszeit wurde bei dem zweiten Waschschrift ein Waschpuffer mit einer Imidazolkonzentration von 20 mM verwendet. Die restlichen Arbeitsschritte wurden nicht verändert und die Aufreinigung wie in 4.6 beschrieben durchgeführt.

Die Aufreinigung der 500 ml Kultur wurde wie in 4.6 durchgeführt mit Ausnahme der Waschschriffe. Hier wurden drei Waschriffe mit unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen durchgeführt. Im ersten Waschriff wurde der Waschpuffer mit 20 mM Imidazol verwendet. Im zweiten waren es 30 mM Imidazol und im dritten 40 mM Imidazol.

4.7 Expressionsüberprüfung

Mit den zwei 50 ml Zellkulturen, mit der IPTG-Konzentration von 0,75 mM und der Expressionstemperatur von 25°C sowie mit der IPTG-Konzentration von 0,5 mM und der Expressionstemperatur von 18°C, wurde vor der Aufreinigung eine Expressionsüberprüfung durchgeführt.

Für die Expressionsüberprüfung wurde mit einer Pipettenspitze eine geringe Menge des Zellpellets abgenommen und dieses mit 200 µl BugBuster aufgeschlossen (siehe 4.5). Anschließend wurde eine SDS-Page durchgeführt (siehe 4.8).

4.8 SDS-PAGE

In diesem Abschnitt wird die Herstellung der SDS-PAGE Gele und die eigentliche Durchführung der SDS-PAGE beschrieben.

Herstellung der Gele

Zum Gießen der Gele wurde die Gelgießkammer mit den entsprechenden Dichtungen abgedichtet und nacheinander die einzelnen Platten in die Kammer gestapelt. Es wurde immer erst eine Keramikplatte, dann die jeweiligen Abstandshalter an den Rand der Keramikplatte und dann eine Glasplatte auf die Abstandshalter in die Kammer gelegt. Nach dem Montieren der sechs Gelkammern wurde der Deckel auf die Gelgießkammer gelegt und dieser mit Klammern fixiert (siehe Abbildung 1).

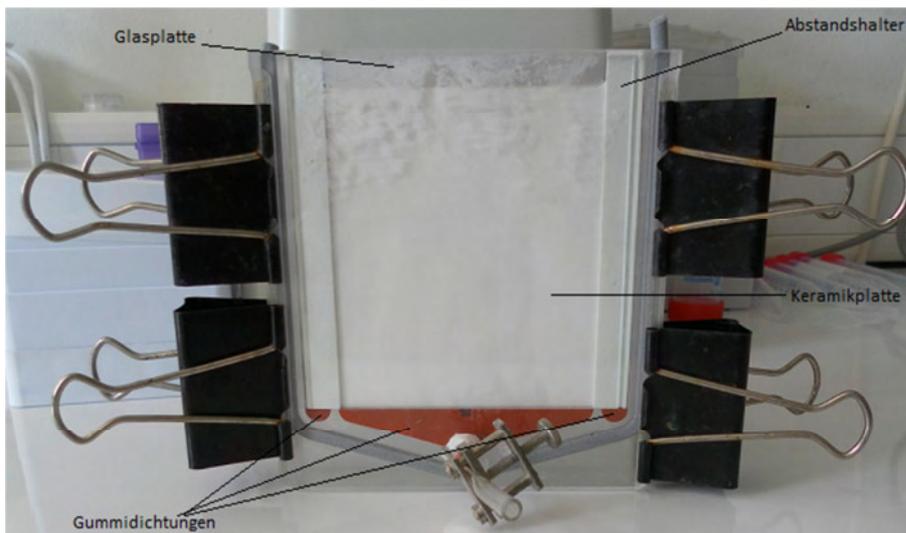


Abbildung 1 Aufbau der Gelkammer

In dieser Abbildung ist der Aufbau der Gelkammer von vorne dargestellt.

Für diese Arbeit wurden 12,5 %ige Gele hergestellt, da bei dieser Konzentration der Trennbereich zwischen 15 und 60 kDa linear ist (Eckert & Kartenbeck, 1997). Die in Tabelle 8 Pipettierschema für SDS-Gele mit einer Konzentration von 12,5% dargestellten Werte für die Acrylamidlösungen wurden mit folgenden vom Hersteller der verwendeten Acrylamidlösungen angegebenen Formeln (4.1) und (4.2) berechnet:

Formel 1 Volumen der 2 % Bisacrylamidlösung in ml

$$V_a = \frac{T \times (100 - C) \times V_t}{3000} \quad (4.1)$$

Formel 2 Volumen der 30 % Acrylamidlösung in ml

$$V_b = \frac{T \times C \times V_t}{200} \quad (4.2)$$

V_a: Volumen 30 % ige Acrylamidlösung in ml

V_b: Volumen 2 %ige Bisacrylamidlösung in ml

V_t: Gesamtvolumen an gewünschter Gellösung

T: Gelkonzentration in % = % Acrylamidlösung + % Bisacrylamidlösung

C: Crosslinking in % = $\frac{\% \text{ Bisacrylamid} \times 100}{T}$

Die einzelnen Komponenten für die Trenn- und Sammelgele wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 8 Pipettierschema für SDS-Gele in zwei Bechergläsern angesetzt. Die in der Tabelle angegebenen Mengen sind ausreichend für 6 Gele.

TEMED und APS wurden sowohl bei der Trenngellösung als auch bei der Sammelgellösung erst kurz vor dem Gießen dazugegeben und untergerührt.

Tabelle 8 Pipettierschema für SDS-Gele mit einer Konzentration von 12,5%.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
	T = 12,5 % C = 2,6 %	T = 5 % C = 2,6 %
Acrylamid 30 % [ml]	24,4	3,2
Bisacrylamid 2 % [ml]	9,8	1,3
4-fach Trenngel-Puffer [ml]	15,0	-
4-fach Sammelgel-Puffer [ml]	-	5,0
10 % SDS [ml]	0,6	0,6
Glycerol 87 % [ml]	3,0	-
H₂O dest. [ml]	7,0	9,5
Bromphenol-Blau	-	0,2
TEMED [ml]	0,06	0,015
APS 10 % [ml]	0,2	0,15
Endvolumen für 6 Gele [ml]	60	20

Nachdem auch TEMED und APS der Trenngellösung zugefügt wurden, wurde die Lösung durch Rühren homogenisiert. Anschließend wurde die Trenngellösung sofort in die Gelkammern gegossen, so dass die Kammern zu 2/3 gefüllt waren. Jedes Trenngel wurde sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren der Trenngele (nach ca. 1 h, zu sehen an dem Rest, der sich noch im Becherglas befand), wurde das Isopropanol abgegossen und eventuelle Reste mit einem Papiertuch aufgesogen. Daraufhin wurden TEMED und APS zu der Sammelgellösung gegeben, diese wie bei der Trenngellösung gerührt und zügig auf die Trenngele gegossen, so dass die Kammern komplett gefüllt waren. In jede Kammer wurde ein Kamm, der die späteren Taschen bildete, gesteckt. Nach dem Auspolymerisieren der gesamten Gele wurden diese aus der Kammer genommen. Die Glasplatten wurden von außen von Gelresten befreit und die Gele in ein mit H₂O dest. getränktes Papiertuch gewickelt. So wurden die Gele in einem Gefrierbeutel für maximal zwei Wochen bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Durchführung

Die SDS Kammer wurde wie in Abbildung 2 SDS-Page Aufbau zu sehen zusammengebaut. Die Gelkammer wurde mit der Pufferkammer verbunden und die Gele mit je zwei Klammern an der Gelkammer befestigt. Wenn nur ein Gel verwendet wurde, dann wurde stattdessen ein Platzhalter (eine Kunststoffplatte in der Größe eines Gels) an dem Platz für das zweite Gel befestigt. Die Pufferkammer und die Zwischenräume zwischen Gel und Gelkammer wurden mit Elektrophoresepuffer gefüllt.

Von den Proben für die SDS-PAGE wurden 50 μl in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und mit der gleichen Menge an Probenpuffer vermischt. Die Proben wurden für 4 min bei 94°C erhitzt. Kurz bevor die Proben auf die Gele geladen wurden, wurde der Kamm aus den Gelen entfernt und die Geltaschen mit Puffer gespült. Es wurden in eine Tasche 5 μl Marker und 5 - 20 μl Probe in die jeweiligen Taschen geladen. Die genauen Volumina sind in den jeweiligen Abschnitten zu finden. Der Deckel wurde auf die Apparatur gesteckt und die SDS-PAGE gestartet. Die ersten 15 min liefen die Gele bei 100 Volt, dann 1 h bei 150 Volt und zum Schluss bis kurz vor Ende des Gels bei 200 Volt.

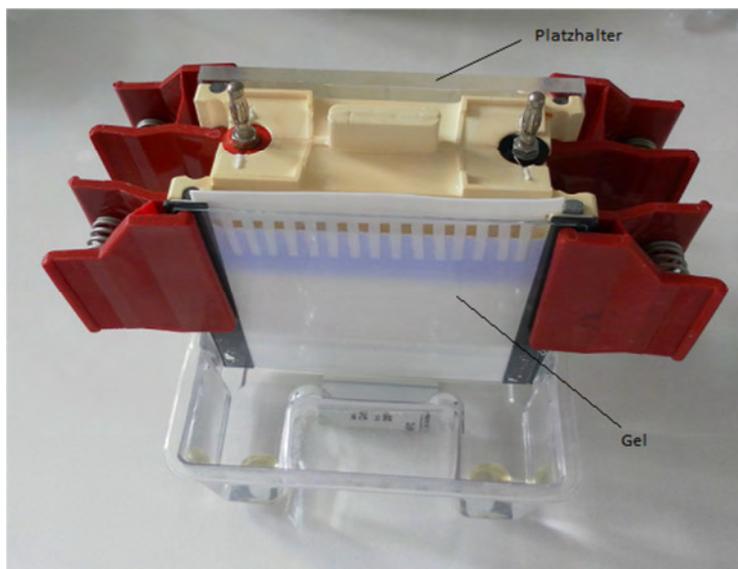


Abbildung 2 SDS-Page Aufbau

In dieser Abbildung ist der Aufbau der SDS-Page Apparatur dargestellt. Auf jeder Seite kann ein Gel oder Platzhalter mit den roten Klammern befestigt werden.

Die gelaufenen Gele wurden aus der Kammer genommen und für einen Western Blot in feuchten Papiertüchern bei 4°C gelagert oder das Gel wurde aus den Glasplatten genommen und für 30 -60 min in Coomassie Blue Färbelösung gefärbt. Nach dem

Färben wurde das Gel mit Entfärbelösung entfärbt. Die Entfärbelösung wurde alle 20 – 30 min gewechselt

4.9 Western Blot

Für den Western Blot wurden die PVDF-Membran und sechs Filterpapiere auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde für 30 s in 100%igem Methanol, für mindestens eine Minute in H₂O dest. und anschließend 5 min in Anoden-Puffer 2 equilibriert. Drei Filterpapiere wurden in 50 ml Kathoden-Puffer, zwei Filterpapiere in 50 ml Anoden-Puffer 1 und ein Filterpapier zusammen mit der Membran in Anodenpuffer 2 getränkt. Die Filterpapiere wurden wie in Abbildung 3 Western Blot Stapelschema der Filterpapiere, des Gels und der Membran abgebildet auf die Blotting-Oberfläche (Kathodenseite) gelegt. Zwischen Gel und Membran wurden eventuelle Luftblasen entfernt.

Nachdem alle Filterpapiere übereinander lagen wurden diese einmal angedrückt, und die austretende Flüssigkeit mit einem Papiertuch aufgenommen. Der Deckel der Blotting-Apparatur wurde nach dem Aufsetzen mit einem Gewicht beschwert. Der Blott-Vorgang erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 1 h, wobei 35 V nicht überschritten werden durfte. Nach dem Blotten wurde die Membran in einer Schale mit Blockpuffer bedeckt und für mindestens 30 min bei RT geschwenkt. Im Anschluss an das Blocken wurde die Membran einmal mit TBS Puffer gewaschen und mit der ersten Antikörperlösung bedeckt. Die Membran wurde 1 h in der Antikörperlösung inkubiert. Hinterher wurde die Membran dreimal für 5-10 min mit TBS Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit der zweiten Antikörperlösung bedeckt und hat 1 h in dieser inkubiert. Nach dem Inkubieren wurde die Membran wieder 4-5-mal für 5-10 Minuten mit TBS Puffer gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran in 50 ml TBS Puffer gelegt, je 500 µl von Reagenz 1, Reagenz 2 und Reagenz 3 sowie 20 µl 30%iges H₂O₂ hinzugefügt und solange in der Lösung geschwenkt, bis die Banden gut sichtbar waren. Die Entwicklung dauerte maximal 5-10 min. Die verwendete BSA-Lösung wurde genau wie die Antikörperlösungen nicht öfters als fünf Mal verwendet.

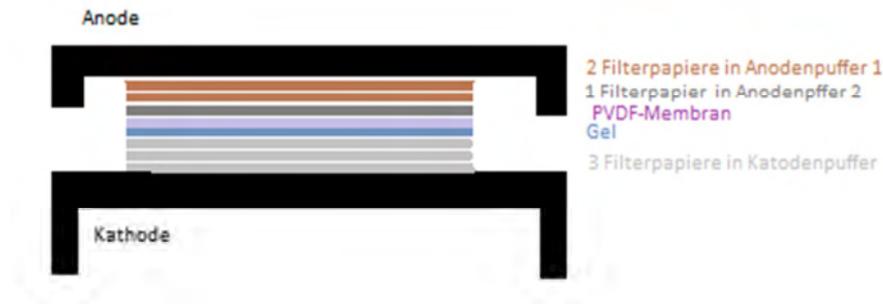


Abbildung 3 Western Blot Stapelschema der Filterpapiere, des Gels und der Membran

4.10 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

In den folgenden Unterpunkten sind die verwendeten Puffer, Lösungen und Medien und deren Zusammensetzung zu finden.

4.10.1 Nährmedien

Für die Zellkulturen der α -2,3-Sialyltransferase und der α -1,2-Fucosyltransferase wurden unterschiedliche Zusätze zu den Nährmedien verwendet.

Ampicillin und Kanamycin Stocks

für Ampicillin wurde ein 100 mg/ml Stock verwendet

für Kanamycin wurde ein 40 mg/ml Stock verwendet

LB-Medium

17,5 g LB-Medium

in 700 ml H₂O dest. lösen und autoklavieren

Für die α -2,3-Sialyltransferase:

100 μ l/100 ml vom Kanamycin-Stock zum Medium hinzugeben und sofort für die Zellkulturen verwenden. (Endkonzentration von Kanamycin beträgt 40 μ g/ml)

Für die α -1,2-Fucosyltransferase:

100 μ l/100 ml vom Ampicillin-stock zum Medium hinzugeben und sofort für die Zellkulturen verwenden. (Endkonzentration von Ampicillin beträgt 100 μ g/ml)

LB-Medium für Zellkulturplatten

17,5 g LB-Medium

10,5 g Agar

In 700 ml H₂O dest lösen und autoklavieren und auf ca. 50 °C abkühlen lassen

Für die α -2,3-Sialyltransferase:

100 μ l/100 ml Kanamycin zum Medium hinzugeben und sofort Platten gießen

(Endkonzentration von Kanamycin beträgt 40 μ g/ml)

Für die α -1,2-Fucosyltransferase:

100 μ l/100 ml Ampicillin zum Medium hinzugeben und sofort Platten gießen

(Endkonzentration von Ampicillin beträgt 100 μ g/ml)

IPTG-Stock zum Induzieren der Expression

100 mM IPTG 0,238 g/10 ml

IPTG in H₂O dest. lösen und anschließend steril filtrieren

4.10.2 Zellaufschluss

In diesem Abschnitt sind die Stocklösungen für die Zusätze zum BugBuster[®] zu finden.

Lysozym-Stock

2 mg Lysozym in 1 ml HEPES-Puffer lösen

PMSF-Stock

50 mM PMSF in einer 55%igen Isopropanollösung lösen

4.10.3 SDS-PAGE

In diesem Unterpunkt befinden sich die Vorschriften für die Puffer, die für die Herstellung der SDS-PAGE Gele und die Durchführung benötigt werden.

Trenngel Puffer, 4-fach (100 ml, pH 8,8)

1,5 M Tris Base 18,2 g

pH-Wert mit HCl auf 8.8 einstellen und mit H₂O dest. auf 100 ml auffüllen

Sammelgel-Puffer 4-fach (100 ml, pH 6,8)

0,5M Tris-HCl 7,88 g

pH-Wert auf 6,8 einstellen und mit H₂O dest. auf 100 ml auffüllen

APS-Lösung

APS 10% 0,1 g

In 1 ml H₂O dest. lösen.

Fertige Lösung bei -20 °C lagern und für jedes Gel frisch ansetzen

Probenpuffer 2-fach (1 ml Ansatz)

Tabelle 9 Probenpuffer-Ansatz

Bezeichnung	Endkonzentration	Pipettiervolumen
Tris-HCl (1 M)	62,5 mM	62,5 µl
SDS (1 %)	2 %	200 µl
Glycerin (100 %)	25 % %	250 µl
Bromphenol Blue (0,25 %)	0,01 5	40 µl
DL-Dithiohreititol (100 %)	1,6 %	16 mg
H₂O dest.		447,5 µl

Elektrophoresen-Puffer 10-fach (1 l)

0,25 M Tris-Base 30,28 g

1,92 M Glycin 144,13 g

1 % SDS 10 g

Der pH-Wert wird nicht extra eingestellt. Für die Elektrophorese wurde der Puffer kurz vor Gebrauch 1:10 verdünnt

SDS-Lösung

10 % SDS (10 g) in 10 ml H₂O dest. lösen

Färbelösung (2 l)

0,025 % Coomassie Brillant Blue 0,5 g

40 % Methanol 800 ml

7 % Essigsäure 140 ml

Mit H₂O dest. auf 2 Liter auffüllen, solange rühren bis sich alles gelöst hat und anschließend zentrifugieren.

Entfärbelösung (1 l)

40 % Methanol	400 ml
10 % Essigsäure	100 ml

Mit H₂O dest. auf 1 L auffüllen

4.10.4 Western Blot

Kathoden-Puffer (1 Liter)

25 mM Tris-Base	3,02 g
150 mM Glycin	11,25 g
10 % (v/v) Methanol	100 ml

Mit H₂O dest. auf 1 l auffüllen

Anoden-Puffer 1 (1 Liter) pH 10,4

300 mM Tris-Base	36,33 g
10 % Methanol	100 ml

pH-Wert auf 10,4 einstellen und mit H₂O dest. auf 1 l auffüllen

Anoden-Puffer 2 (1 Liter) pH 10,4

25 mM Tris Base	3,02 g
10 % (v/v)	100 ml

pH-Wert auf 10,4 einstellen und mit H₂O dest. auf 1 l auffüllen

10x TBS-Puffer (1 Liter) pH 7,6

50 mM Tris-Base	6,04 g
150 mM NaCl	8,77 g

pH-Wert auf 7,6 einstellen und mit H₂O dest. auf 1 l auffüllen. Vor dem Gebrauch wurde der 10x TBS-Puffer 1:10 mit Wasser verdünnt

Blockpuffer

3% BSA in TBS-Tween-Puffer lösen

Primer Antikörper: His-Sonden Antikörper, ein monoklonaler Maus IgG (200 µg/ml)

50 µl in 50 ml TBS lösen

Maximal 3-5 Mal verwenden

Sekundär Antikörper: Peroxidase Antikörper, im Kaninchen produziert (10 – 20 mg/ml)

10 µl in 50 ml TBS lösen

Maximal 3-5 Mal verwenden

Detektionsreagenzien

Reagenz 1

10% Diaminobenzidin in 10 ml TBS Puffer lösen

500 µl Aliquots pipettieren und bei -20°C lagern

Reagenz 2

10% Imidazol in 10 ml TBS Puffer lösen

500 µl Aliquots pipettieren und bei -20°C lagern

Reagenz 3

10% Nickelchlorid in 10 ml TBS Puffer lösen

500 µl Aliquots pipettieren und bei -20°C lagern

4.10.5 Metallchelataffinitätschromatographie

Equilibrations-/Wasch-Puffer (für 1l) pH 7

50 mM HEPES	13,0145 g/l
-------------	-------------

300 mM NaCl	17,532 g/l
-------------	------------

Elutionspuffer pH 7 (für 100 ml)

50 mM HEPES	1,3015 g/100 ml
-------------	-----------------

300 mM NaCl	1,7532 g/100 ml
-------------	-----------------

150 mM Imidazol	1,0212 g/100 ml
-----------------	-----------------

Waschpuffer 1 pH 7 (100ml)

50 mM HEPES	1,3015 g/100 ml
-------------	-----------------

300 mM NaCl	1,7532 g/100 ml
-------------	-----------------

10 mM Imidazol	0,0681 g/100 ml
----------------	-----------------

Waschpuffer 2 pH 7 (100ml)

50 mM HEPES	1,3015 g/100 ml
300 mM NaCl	1,7532 g/100 ml
20 mM Imidazol	0,1362 g/100 ml

Waschpuffer 3 pH 7 (100ml)

50 mM HEPES	1,3015 g/100 ml
300 mM NaCl	1,7532 g/100 ml
30 mM Imidazol	0,2042 g/100 ml

Waschpuffer 4 pH 7 (100ml)

50 mM HEPES	1,3015 g/100 ml
300 mM NaCl	1,7532 g/100 ml
40 mM Imidazol	0,2723 g/100 ml

MES-Puffer pH 5

20 mM 2-(N-morpholine)-ethansulfonic acid	2,172 g/500 ml
---	----------------

Regenerationspuffer

50 mM CoCl ₂	1,185 g/100 ml
-------------------------	----------------

Alle Puffer wurden mit H₂O dest. auf das angegebene Volumen aufgefüllt und der pH-Wert eingestellt.

EDTA-Lösung

0,2 M EDTA	7,4448 g/100 ml
------------	-----------------

5. Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsschritte aufgeführt. Die Ergebnisse der α -1,2-Fucosyltransferase und α -2,3-Sialyltransferase werden separat aufgezeigt. Auf den hier abgebildeten Western Blot Membranen und SDS-Gelen sind teilweise die Banden nicht so gut zu erkennen wie auf den Originalen. Aus diesem Grund sind die Banden farbig unterstrichen. Wenn es in den jeweiligen Abschnitten nicht anders beschrieben wird, dann sind die Banden wie folgt unterstrichen. Die Banden der Pellets orange, die Banden der Überstände rot und, die Banden der Blanks blau.

Bei den Western Blot Membranen untereinander sind Unterschiede in der Helligkeit der Membranen und in der Deutlichkeit der Banden zu erkennen. Die Unterschiede in der Helligkeit sind damit zu erklären, dass z.B. die BSA-Lösung zu alt war und dadurch die Blockfähigkeit nachgelassen hat. Bei der Deutlichkeit der Banden spielt die frische der Antikörperlösungen eine Rolle. Je älter die Lösungen, desto schwächer die Banden. Obwohl die Lösungen maximal 5x verwendet wurden kam es zu diesen Unterschieden. Aus diesem Grund werden nur die Membranen der einzelnen Abschnitte miteinander verglichen.

5.1 Expression und Aufreinigung der α -1,2-Fucosyltransferase

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der α -1,2-Fucosyltransferase dargestellt

Auswahl der Kolonien für die Expression

Die Proteinbanden in Abbildung 4 sind gelb unterstrichen. Die Banden sind alle bei der erwarteten Größe von ca. 35 kDa. An Hand der Banden auf den PVDF-Membranen von Abbildung 4 wurden 3 Kolonien für die weitere Arbeit ausgewählt. Nur die Bande K15 ist etwas kräftiger als die anderen Banden. Ansonsten ist kein sichtbarer Unterschied zwischen den Bandendicken zu erkennen. Für die weitere Arbeit wurden die Kolonien 4, 7 und 15 ausgewählt.

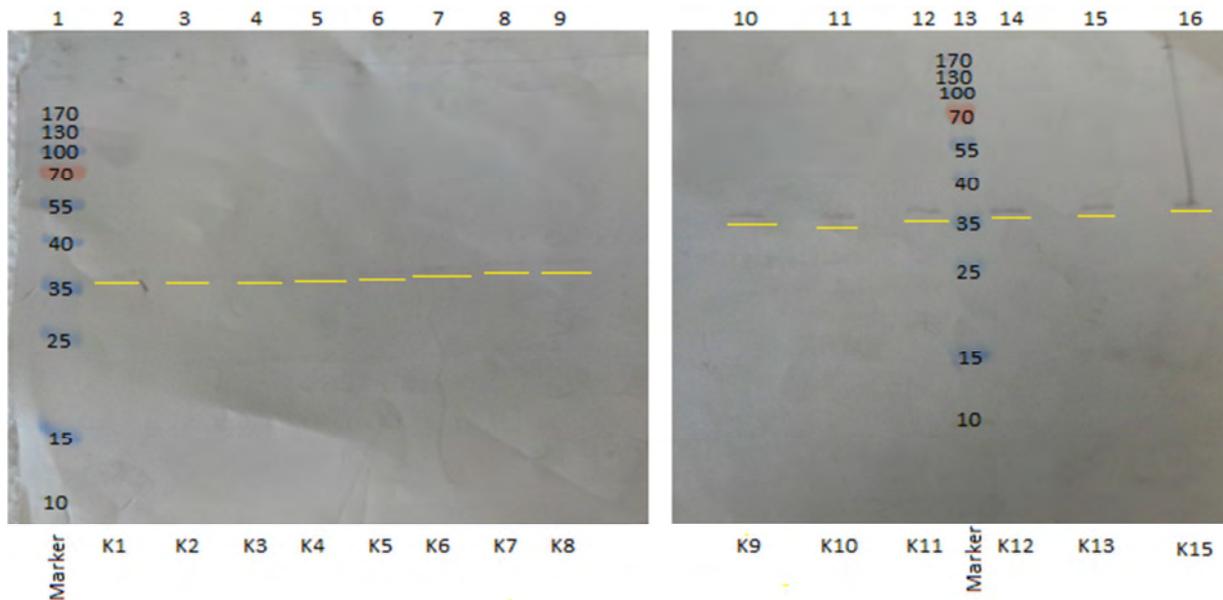


Abbildung 4 Western Blot Ergebnis der Kolonienauswahl Membran 1 und 2

Die Proteinbanden sind gelb unterstrichen und alle bei der erwarteten Größe von 35 kDa. In der Beschriftung steht K für Kolonie. Die einzige Bande, die etwas kräftiger erscheint ist K15, ansonsten ist kein sichtbarer Unterschied zu erkennen

IPTG-Konzentrationsoptimierung bei 37 °C

In der Abbildung 5 und Abbildung 6 in diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der Optimierung der IPTG-Konzentration bei 37 °C dargestellt. Die Banden der Pellets der α -1,2-Fucosyltransferase sind orange unterstrichen. Die Banden sind alle bei der erwarteten Größe. Es ist zu sehen, dass die Banden sehr stark, jedoch nur bei den Pellets der Proben vorhanden sind. Zwischen den Banden ist kein wesentlicher Unterschied zu erkennen. Bei den Überständen der Proben sind keine Banden sichtbar. In Abbildung 6 ist in Spalte 3 beim Pellet des Blanks eine schwache Bande zu erkennen. Bei den Blanks der Kolonie 15 sind jedoch wie erwartet keine Banden sichtbar. Auf Grund der Ergebnisse der IPTG-Konzentrationsoptimierung wurde die Optimierung der Expressionstemperatur bei einer IPTG-Konzentration von 1 mM durchgeführt.

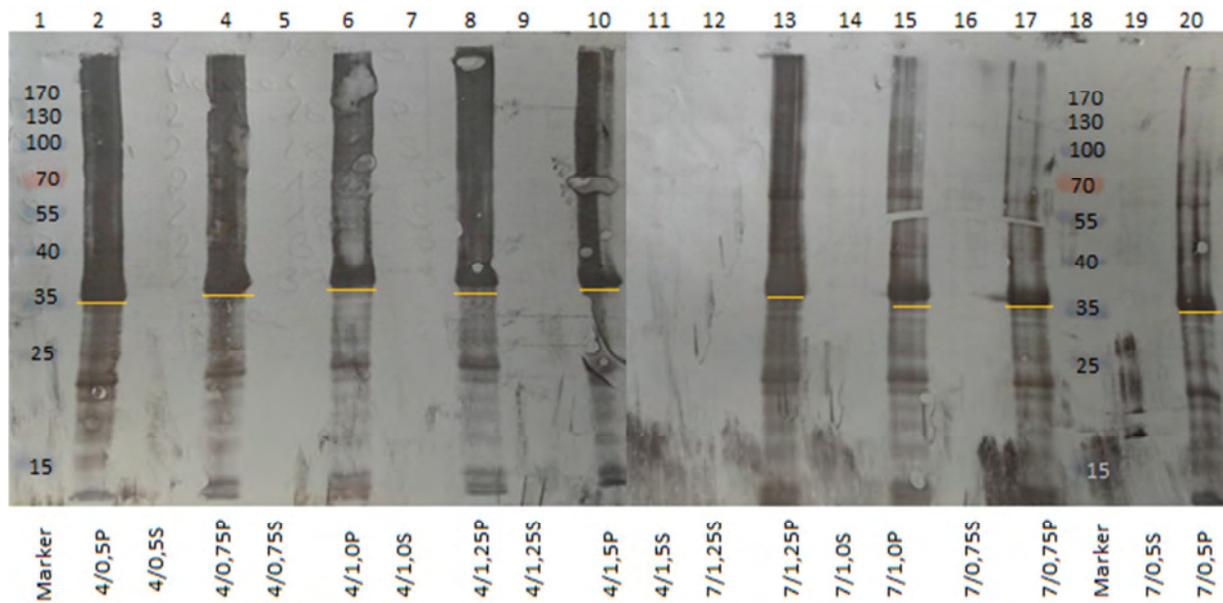


Abbildung 5 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrationsoptimierung bei 37°C; Membran 1 und 2

Die Banden der α -1,2-Fucosyltransferase sind orange unterstrichen. Die erste Zahl in den Beschriftungen steht für die jeweils verwendete Kolonienzahl, die zweite Zahl steht für die IPTG Menge in mM, das P für Pellet, und das S für Supernatant (Überstand). Die Banden der α -1,2-Fucosyltransferase haben alle die erwartete Größe. Ein Größenunterschied der Banden von den Pellets ist nicht zu erkennen. Bei den Überständen sind keine Banden sichtbar.

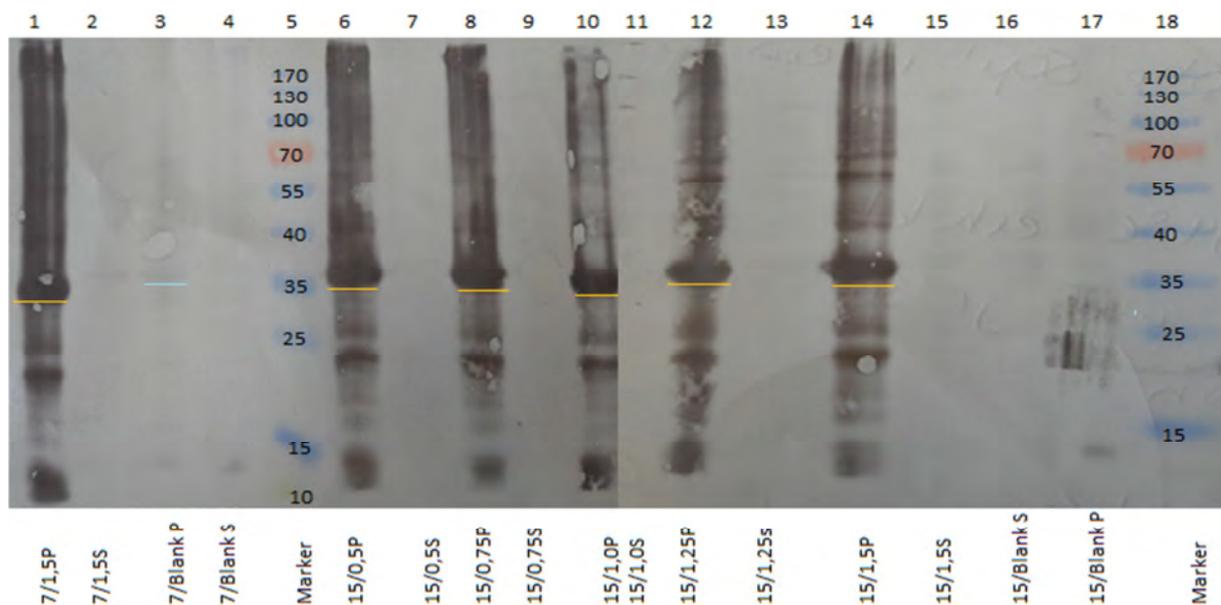


Abbildung 6 Western Blot Ergebnis von der IPTG-Konzentrationsoptimierung bei 37°C; Membran 3 und 4'

Die Banden der α -1,2-Fucosyltransferase sind orange unterstrichen. Die erste Zahl in den Beschriftungen steht für die jeweils verwendete Kolonienzahl, die zweite Zahl steht für die IPTG Menge in mM, das P für Pellet, das S für Supernatant (Überstand) und das B für Blank. Die Banden der α -1,2-Fucosyltransferase haben alle die erwartete Größe. Ein Größenunterschied der Banden von den Pellets ist nicht zu erkennen. Bei den Überständen sind keine Banden sichtbar. In Spalte drei bei dem Pellet des Blanks der Probe 7 ist eine ganz leichte Bande zu erkennen (blau unterstrichen).

Temperaturoptimierung

In der folgenden Abbildung 7 und Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Temperaturoptimierung mit einer IPTG-Konzentration von 1 mM dargestellt. In Abbildung 7 und Abbildung 8 sind pro Membran die Proben je einer Kolonie aufgetragen. Auf allen drei Membranen ist zu sehen, dass bei 28°C und 37°C die Bande beim Pellet sehr dick ist, beim Überstand jedoch keine bzw. nur eine sehr feine Bande vorhanden ist. Bei 18°C ist im Vergleich zu den anderen Temperaturen eine relativ starke Bande im Überstand zu sehen. In jeder Abbildung sind auch bei den Negativkontrollen (Blanks) Banden zu sehen. Bei den Überständen der Proben ist eine zusätzliche Bande zwischen 10 und 15 kDa zu sehen, diese ist grün unterstrichen. Die Banden bei den Pellets können durch Überladen der SDS-Geltaschen oder einen Pipettierfehler hervorgerufen worden sein.

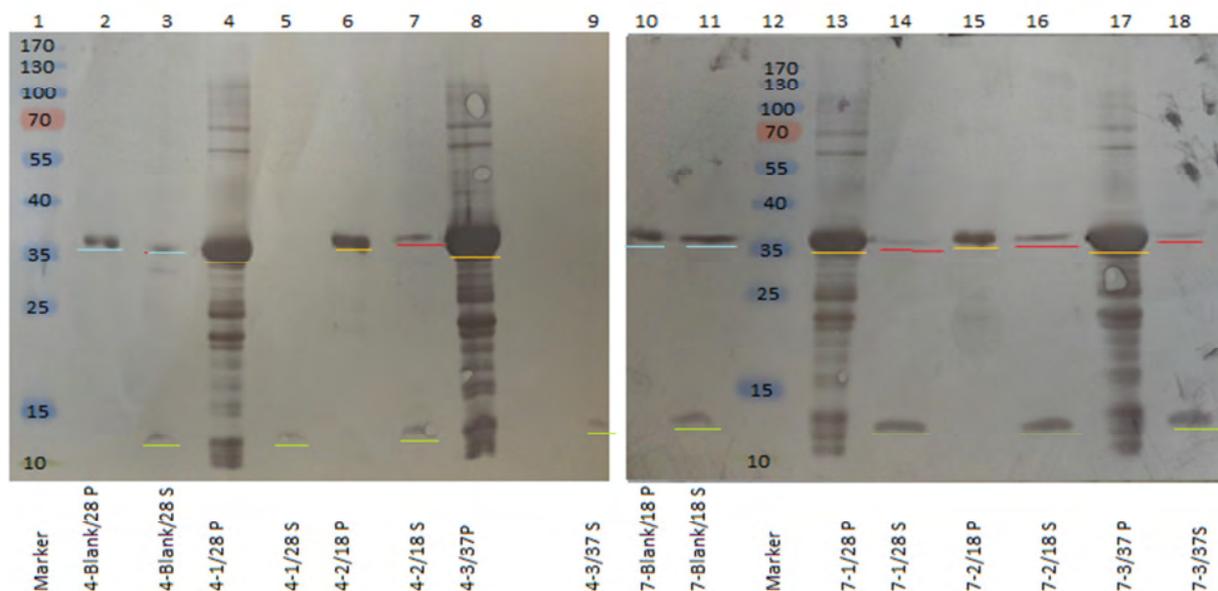


Abbildung 7 Western Blot Ergebnis der Temperaturoptimierung mit einer IPTG-Konzentration von 1 mM; Membran 1 und 2

Die erste Zahl in der Beschriftung steht für die Kolonie, mit der gearbeitet wurde, die zweite für die Nummer der Zellkultur, die letzte Zahl steht für die Expressionstemperatur (18°C, 28°C und 37°C) nach der Aktivierung mit IPTG, P steht für Pellet und S für Supernatant. Die Banden der α -1,2-Fucosyltransferase sind beim Pellet orange unterstrichen, die Banden der Überstände rot. Die Banden der Pellets sind bei allen Proben größer als die der Überstände. Beim Blank sind sowohl im Pellet als auch im Überstand Banden zu sehen (blau unterstrichen). Bei den Überständen ist zu der gewünschten Bande noch eine Bande zwischen 10 und 15 kDa zu sehen (grün unterstrichen).

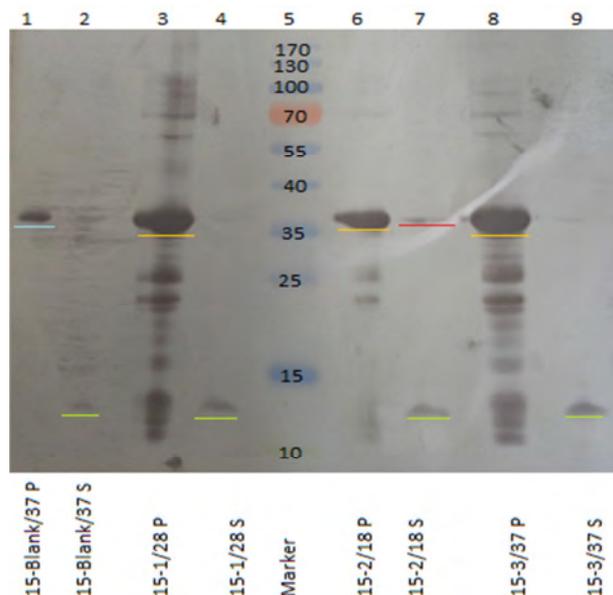


Abbildung 8 Western Blot Ergebnis der Temperaturoptimierung mit einer IPTG-Konzentration von 1 mM; Membran 3

Die erste Zahl bei der Beschriftung steht für die Kolonie, mit der gearbeitet wurde, die zweite für die Nummer der Zellkultur, die letzte Zahl steht für die Expressionstemperatur (18°C, 28°C und 37°C) nach der Aktivierung mit IPTG, P steht für Pellet und S für Supernatant. Die Banden der α -1,2-Fucosyltransferase sind beim Pellet orange unterstrichen, die Banden der Überstände sind rot unterstrichen. Bei den Pellets sind die Banden bei allen Proben größer als die der Überstände. Beim Blank sind sowohl im Pellet als auch im Überstand Banden zu sehen (blau unterstrichen). Bei den Überständen ist zu der gewünschten Bande noch eine Bande zwischen 10 und 15 kDa zu sehen (grün unterstrichen).

IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung

In den nachfolgenden Abbildung 9 bis Abbildung 12 sind die Ergebnisse der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung dargestellt. Bei allen Membranen sind die Banden der Pellets stärker ausgeprägt als die Banden der Überstände. Bei den Blanks sind sowohl im Pellet als auch im Überstand ganz leichte Banden zu erkennen. Die Banden bei den Pellets können durch Überladen der SDS-Geltaschen oder einen Pipettierfehler hervorgerufen worden sein. Bei der Probe 4-25/0,75 (Abbildung 9; Spalte 19 und 20) und bei den Proben 4-18/0,5 und 15-18/0,5 (Abbildung 10, Spalte 8-11) sind die Banden der Überstände im Vergleich zu den anderen Proben fast genauso groß wie der Banden der Pellets. Bei den 37°C Proben sind in den Überständen die Banden sehr schwach oder gar nicht vorhanden.

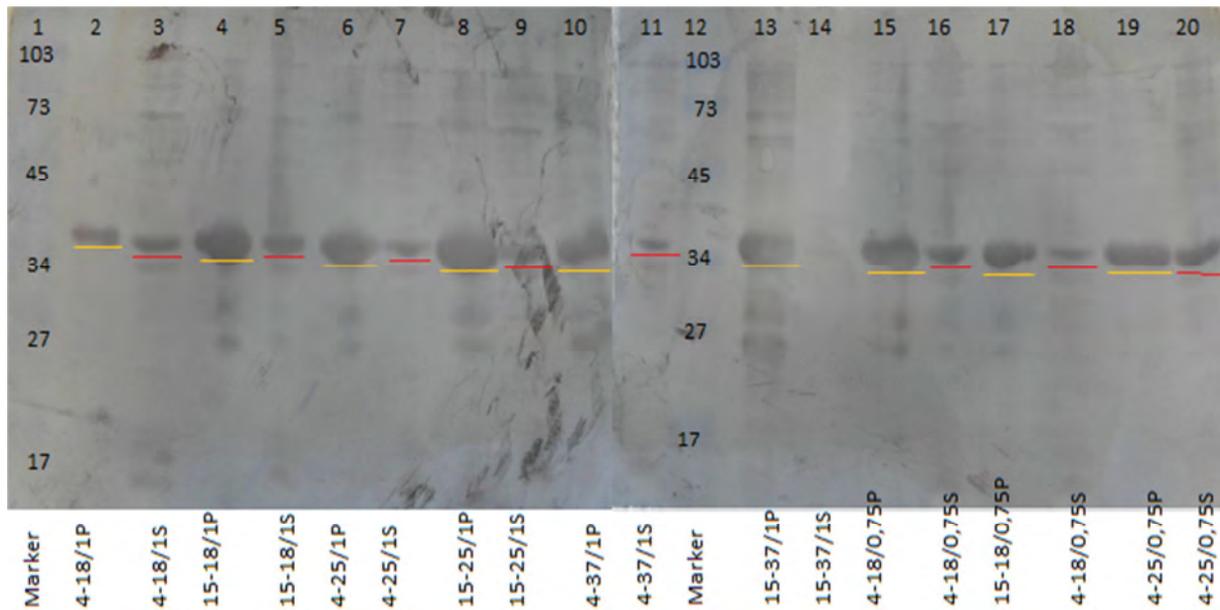


Abbildung 9 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 1 und 2

In dieser Abbildung sind immer Pellet (P) und Überstand (S) von einer Probe nebeneinander dargestellt. Die Banden der Pellets sind orange und die Banden der Überstände sind rot unterstrichen. Die erste Zahl steht für die Beschriftung der Kolonie, mit der gearbeitet wurde und die zweite Zahl für die Temperatur, nach der IPTG-Zugabe. Die letzte Zahl gibt die IPTG-Menge in mM/l an. Bei allen Pellets ist die Bande größer als bei den dazugehörigen Überständen. Bei den 37°C Proben ist zu sehen, dass das im Überstand entweder nur eine sehr schwache Bande oder gar keine Bande sichtbar ist.

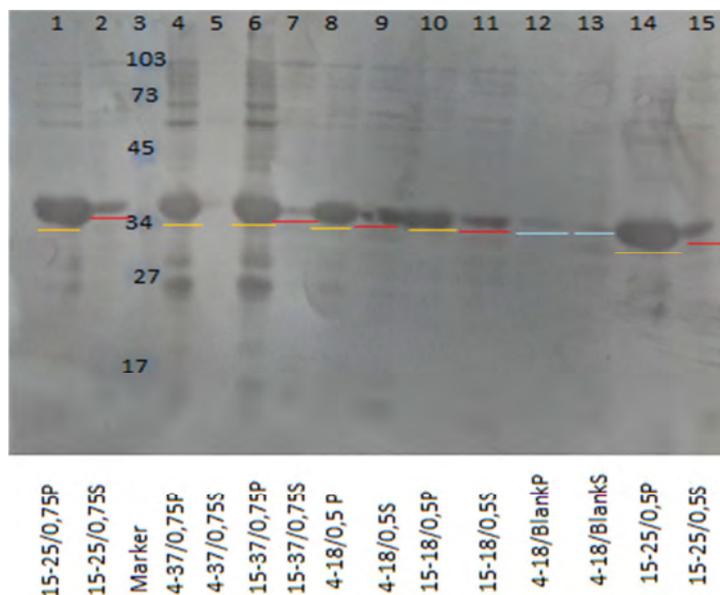


Abbildung 10 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 3

In dieser Abbildung sind immer der Pellet (P) und Überstand (S) von einer Probe nebeneinander dargestellt. Die Banden der Pellets sind orange und die Banden der Überstände sind rot unterstrichen. Die erste Zahl steht für die Beschriftung der Kolonie, mit der gearbeitet wurde und die zweite Zahl für die Expressionstemperatur, nach der IPTG-Zugabe. Die letzte Zahl gibt die IPTG-Menge in mM/l an. Bei allen Pellets ist die Bande größer als bei den dazugehörigen Überständen. Bei den 37°C Proben ist zu sehen, dass im Überstand entweder nur eine sehr schwache Bande oder gar keine Bande sichtbar ist. Bei den Blanks (Spalte 12 und 13) sind ganz leichte Banden zu erkennen.

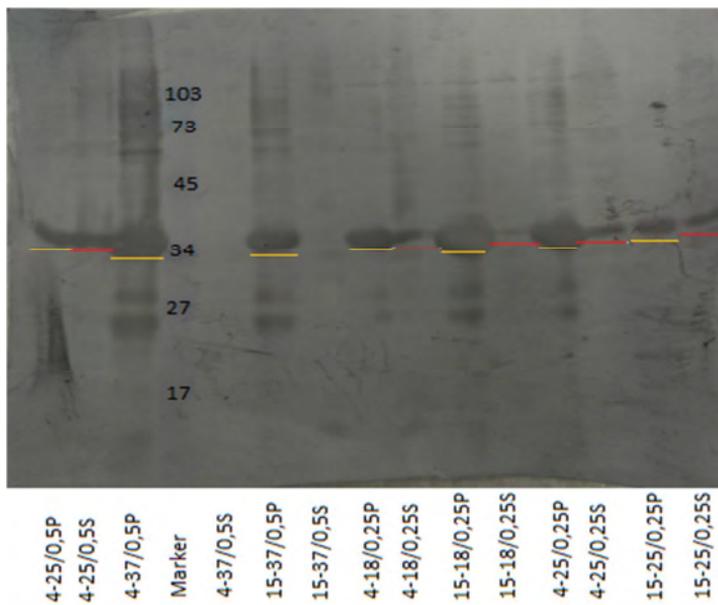


Abbildung 11 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 4

In dieser Abbildung sind immer der Pellet (P) und Überstand (S) von einer Probe nebeneinander dargestellt. Die Banden der Pellets sind orange und die Banden der Überstände sind rot unterstrichen. Die erste Zahl steht für die Beschriftung der Kolonie, mit der gearbeitet wurde und die zweite Zahl für die Temperatur, nach der IPTG-Zugabe. Die letzte Zahl gibt die IPTG-Menge in mM/ an. Bei allen Pellets ist die Bande größer als bei den dazugehörigen Überständen. Bei den 37°C Proben ist zu sehen, dass im Überstand entweder nur eine sehr schwache Bande oder gar keine Bande zu erkennen ist.

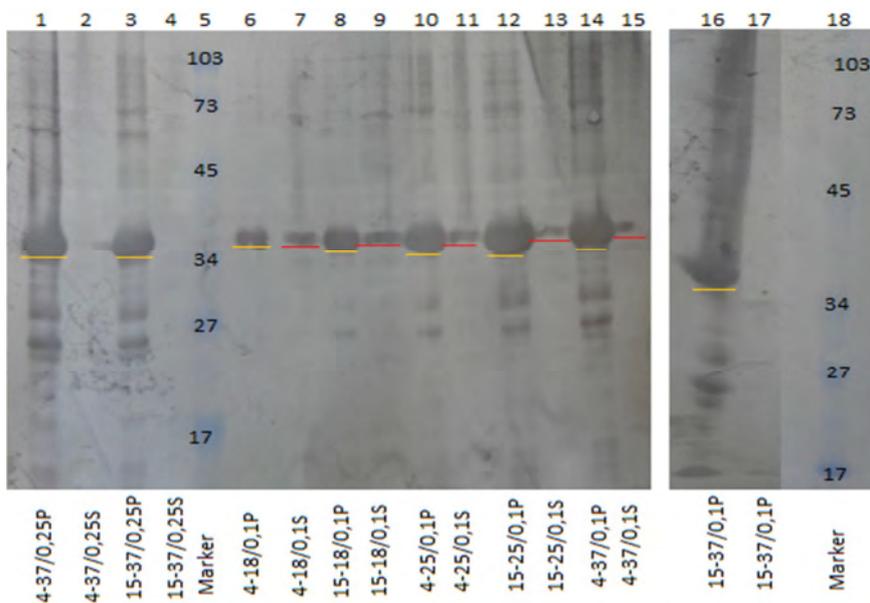


Abbildung 12 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 5 und 6

In dieser Abbildung sind immer das Pellet (P) und der Überstand (S) von einer Probe nebeneinander dargestellt. Die Banden der Pellets sind orange und die Banden der Überstände sind rot unterstrichen. Die erste Zahl steht für die Beschriftung der Kolonie, mit der gearbeitet wurde und die zweite Zahl für die Temperatur, nach der IPTG-Zugabe. Die letzte Zahl gibt die IPTG-Menge in mM an. Bei allen Pellets ist die Bande größer als bei den dazugehörigen Überständen. Bei den 37°C Proben ist zu sehen, dass das im Überstand entweder nur eine sehr schwache Bande oder gar keine Bande zu erkennen ist.

Aufreinigung per IMAC

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der Aufreinigung per IMAC und die Expressionsüberprüfung der 50 ml Kulturen der α -1,2-Fucosyltransferase in Abbildung 13 und Abbildung 14 dargestellt.

Die Proben in Abbildung 13 sind nach den einzelnen Schritten der Aufreinigung benannt. Auf der linken Seite der Abbildung 13 ist das SDS-Gel und auf der rechten Seite die Western Blot Membran der 50 ml Kultur mit einer IPTG-Konzentration von 0,75 mM und einer Expressionstemperatur von 25°C abgebildet. Bei dem SDS-Gel und der Western Blot Membran erkennt man beim Pellet eine sehr dicke Bande bei 35 kDa. In den restlichen Proben, vom Überstand bis zur Probe des letzten Arbeitsschritts mit MES, sind keine Banden, welche der α -1,2-Fucosyltransferase entsprechen zu erkennen. Dies ist darauf zurück zu führen, dass die Zellen keine lösliche α -1,2-Fucosyltransferase exprimiert haben und der Grund für die Expressionsüberprüfung der anderen 50 ml Kulturen (Abbildung 14).

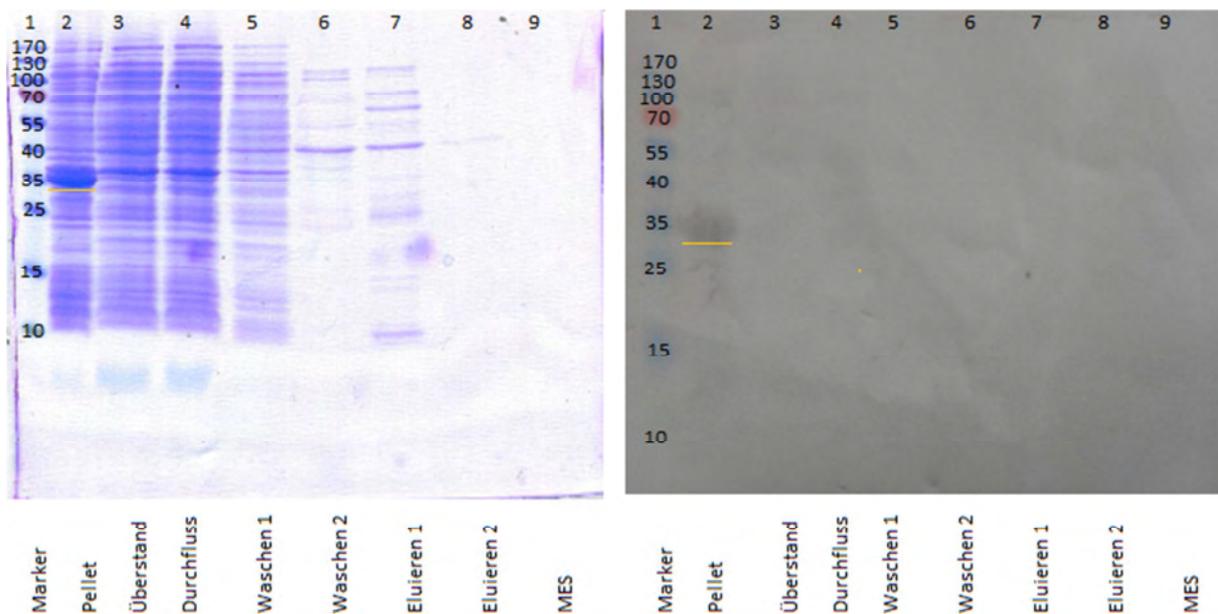


Abbildung 13 SDS-PAGE und Western Blot Ergebnis von der Aufreinigung der 50 ml Kultur 25°C/0,75 mM
Die Beschriftung in dieser Abbildung entspricht den einzelnen Schritten der Aufreinigung. Auf der linken Seite ist das SDS-Gel und auf der Rechten die Western Blot-Membran dargestellt. Die Banden der Pellets sind orange unterstrichen.

In der Abbildung 14 sind die Ergebnisse der Expressionsoptimierung der 50 ml Kulturen, einmal mit einer IPTG-Konzentration von 0,75 mM und einer Expressionstemperatur von 25°C und einmal mit 0,5 mM und einer Expressionstemperatur von 18°C dargestellt. Bei beiden Proben ist bei den Pellets eine deutliche, dicke Bande bei ca. 35 kDa zu sehen, die bei den Überständen jedoch fehlt. Die Ergebnisse der Expressionsüberprüfung waren ausschlaggebend dafür, dass die beiden 50 ml Kulturen nicht weiter aufgereinigt wurden.

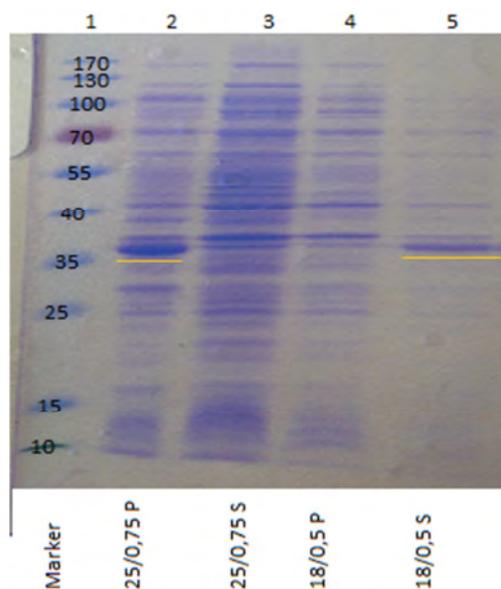


Abbildung 14 Western Blot Ergebnis der Expressionsüberprüfung der 50 ml Kulturen 18°C/0,5 mM und 25°C/0,75 mM

Die erste Zahl in der Beschriftung der Proben steht für die Temperatur nach der IPTG-Zugabe und die zweite für die IPTG-Endkonzentration im mM. Die Banden der Pellets sind orange unterstrichen.

5.2 Expression und Aufreinigung der α -2,3- Sialyltransferase

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse für die α -2,3- Sialyltransferase dargestellt

Auswahl der Kolonien für die Expression

Die Banden der α -2,3- Sialyltransferase sind in Abbildung 15 wie erwartet bei 70 kDa gut zu erkennen. Die Proteinbanden sind gelb unterstrichen. Bei den Kolonien 3 und 7 sind die Banden stärker als die der anderen Kolonien. Es wurden die Kolonie 3 und 7 für nachfolgende Arbeiten ausgewählt.

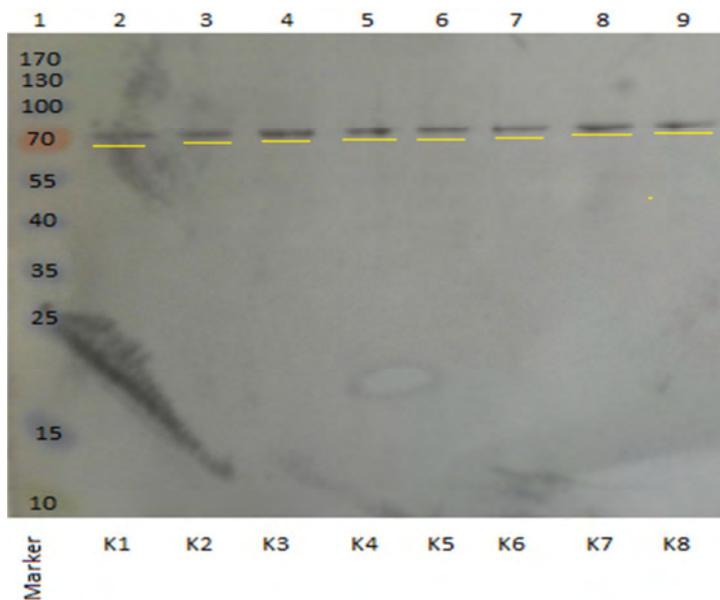


Abbildung 15 Western Blot Ergebnis der Kolonienauswahl von der α -2,3-Sialyltransferase

Die Proteinbanden sind gelb unterstrichen. Das K in der Beschriftung steht für Kolonie. Die Banden der Kolonie 3 und 7 sind stärker zu erkennen als die der anderen.

IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung

Auf der Abbildung 16, Abbildung 17 und Abbildung 18 sind die Ergebnisse der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung dargestellt. Bei jeder Probe mit Ausnahme des Blanks ist beim Pellet eine Bande zu erkennen. Die Banden der Pellets sind jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei den Überständen sind bis auf bei den 30°C Proben auch überall Banden zu erkennen. Es ist deutlich zu sehen, dass bei den 18°C Proben mit einer IPTG-Konzentration von 0,5 mM (Abbildung 17; Spalten 10-13) die Banden der Überstände stärker ausgeprägt sind als die der Pellets. Bei den Proben 3-18/0,25 und 7-18/0,25 (Abbildung 18, Spalten 6 – 9) sind die Banden der Pellets und Überstände in etwa gleich groß. Anhand dieser Ergebnisse wurden 50 ml, 250 ml und 500 ml Kulturen mit einer IPTG Konzentration von 0,5 mM und eine 50 ml Kultur mit einer IPTG-Konzentration von 0,25 mM angesetzt. Alle Kulturen hatten eine Expressionstemperatur von 18°C.

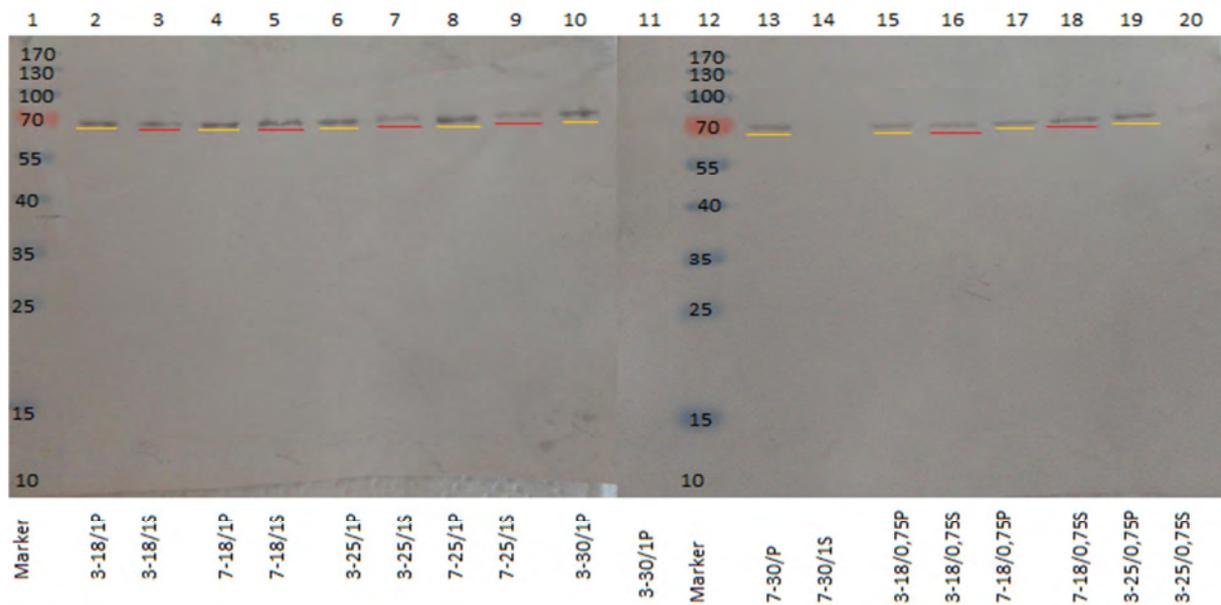


Abbildung 16 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 1 und 2

Die Banden der Pellets sind orange unterstrichen und die der Überstände rot. Es sind Pellet (P) und Überstand (S) von einer Probe nebeneinander dargestellt. Die erste Zahl steht für die Beschriftung der Kolonie, mit der gearbeitet wurde und die zweite Zahl für die Temperatur, nach der IPTG-Zugabe. Die letzte Zahl gibt die IPTG-Endkonzentration in mM an.

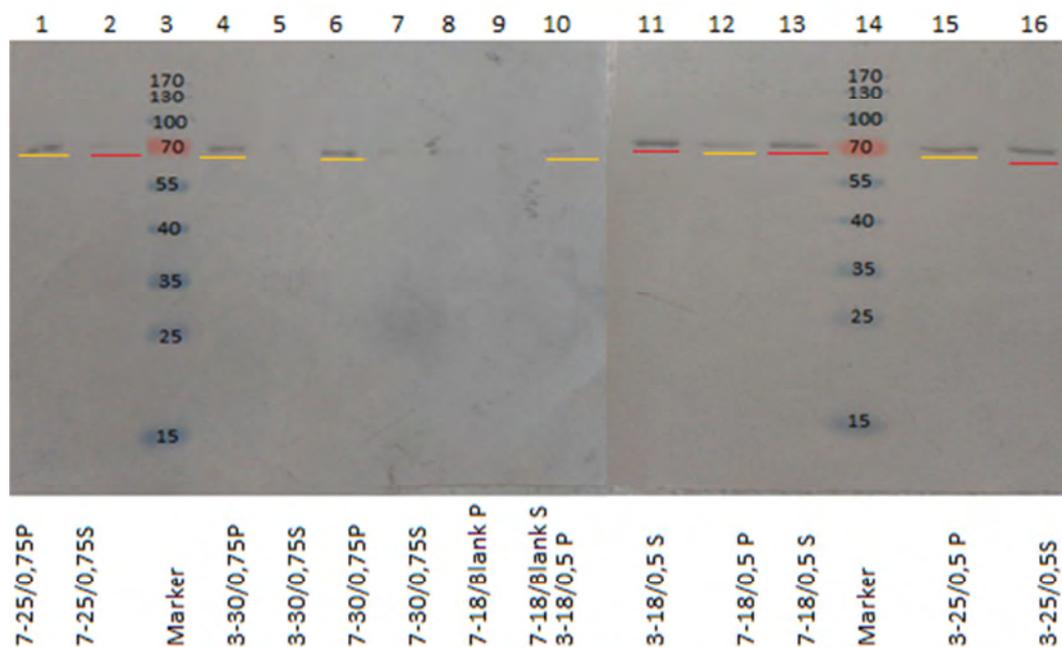


Abbildung 17 Western Blot Ergebnisse der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 3 und 4

Es sind Pellet (P) und Überstand (S) von einer Probe nebeneinander dargestellt. Die erste Zahl steht für die Beschriftung der Kolonie, mit der gearbeitet wurde und die zweite Zahl für die Temperatur, nach der IPTG-Zugabe. Die letzte Zahl gibt die IPTG-Endkonzentration in mM an. Die Banden der Pellets sind orange unterstrichen und die der Überstände rot. Alle Banden haben alle die erwartete Größe. Bei den Proben des Blanks sind keine Banden zu sehen.

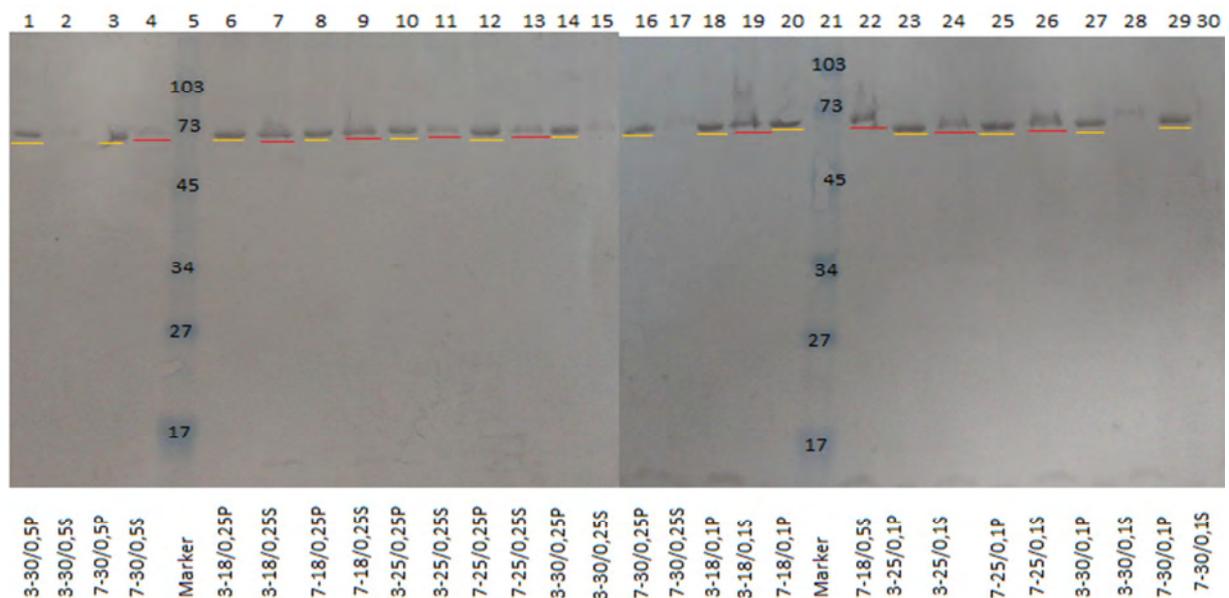


Abbildung 18 Western Blot Ergebnisse der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 5 und 6

Die Banden der Pellets sind orange unterstrichen und die der Überstände rot. Es sind Pellet (P) und Überstand (S) von einer Probe immer nebeneinander dargestellt. Die erste Zahl steht für die Beschriftung der Kolonie, mit der gearbeitet wurde und die zweite Zahl für die Expressionstemperatur, nach der IPTG-Zugabe. Die letzte Zahl gibt die IPTG-Endkonzentration in mM an

Aufreinigung per IMAC

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Aufreinigung der α -2,3-Sialyltransferase per IMAC dargestellt. Die Beschriftung der Proben entspricht den jeweiligen Arbeitsschritten, von dem diese stammen. Die Banden der Proben Total sind dunkel grün unterstrichen und die Banden, die in den Wasch- und Eluatproben nicht denen der α -2,3-Sialyltransferase entsprechen sind lila unterstrichen. Des Weiteren sind alle Banden der α -2,3-Sialyltransferase bis auf die des Pellets rot unterstrichen. Zum Teil sind die unterstrichenen Banden nur auf den Originalen sichtbar.

In der Abbildung 19 ist die Aufreinigung der 50 ml Kultur mit einer IPTG Konzentration von 0,25 mM und einer Expressionstemperatur von 18°C dargestellt. Bei den Proben Total und Pellet sind die Banden nahezu gleich groß. Die Bande des Überstandes ist etwas schwächer. Im Durchfluss ist auch eine schwache Proteinbande, bei den beiden Waschschritten jedoch keine Bande zu erkennen. Im Eluat ist sowohl bei 70 kDa eine Proteinbande als auch bei etwa 40 kDa eine Bande zu erkennen. Im Eluat 2 und MES sind keine Banden zu erkennen. Die 40 kDa

Bande kann ein Zellbestandteil oder ein Zellprodukt sein, welches genau wie die α -2,3-Sialyltransferase eine Affinität zu Cobalt hat.

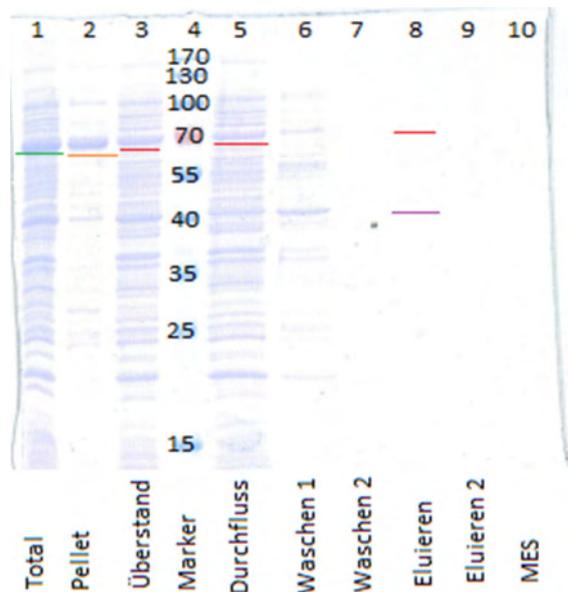


Abbildung 19 SDS-Page Ergebnis der Aufreinigung der 50 ml Kultur 18°C/0,25 mM

Die Bande der α -2,3-Sialyltransferase des Total ist grün, die Bande des Pellets orange, die Bande des Überstandes, Durchfluss und des Eluats sind rot und die zweite Bande im Eluat ist lila unterstrichen. Beim Total und Pellet sind die Banden in etwa gleich groß, die Bande des Überstandes ist im Vergleich etwas kleiner. Die Bande im Durchfluss ist noch etwas kleiner als die des Überstandes. Bei den beiden Waschsritten sind keine Banden der α -2,3-Sialyltransferase zu sehen. Im ersten Eluat ist sowohl bei 70 kDa als auch bei 40 kDa eine Bande zu sehen.

In der Abbildung 20 sind die Ergebnisse der Aufreinigung der 50 ml Kultur mit einer IPTG-Endkonzentration von 0,5 mM und einer Expressionstemperatur von 18°C dargestellt. Links in der Abbildung ist das SDS-Gel und rechts die Western Blot-Membran zu sehen. In dieser Abbildung sind die einzelnen Banden auf dem SDS-Gel dicker als die Banden in der Abbildung 19. In den beiden Waschsritten ist bei 40 kDa ganz deutlich eine Bande zu erkennen, wobei diese im zweiten Waschschrift schwächer ist als im ersten. Auf der Western Blot Membran sind die Banden zu sehen, die auf dem SDS-Gel zur α -2,3-Sialyltransferase gehören. Die Bande vom Durchfluss ist im Gegensatz zu den Banden des Pellets und des Eluats sehr schwach. Auf der Western Blot Membran ist gut zu erkennen, dass die Bande des Überstandes etwa genauso groß ist wie die Bande des Pellets. Im Eluat 2 und MES sind keine Banden zu erkennen.

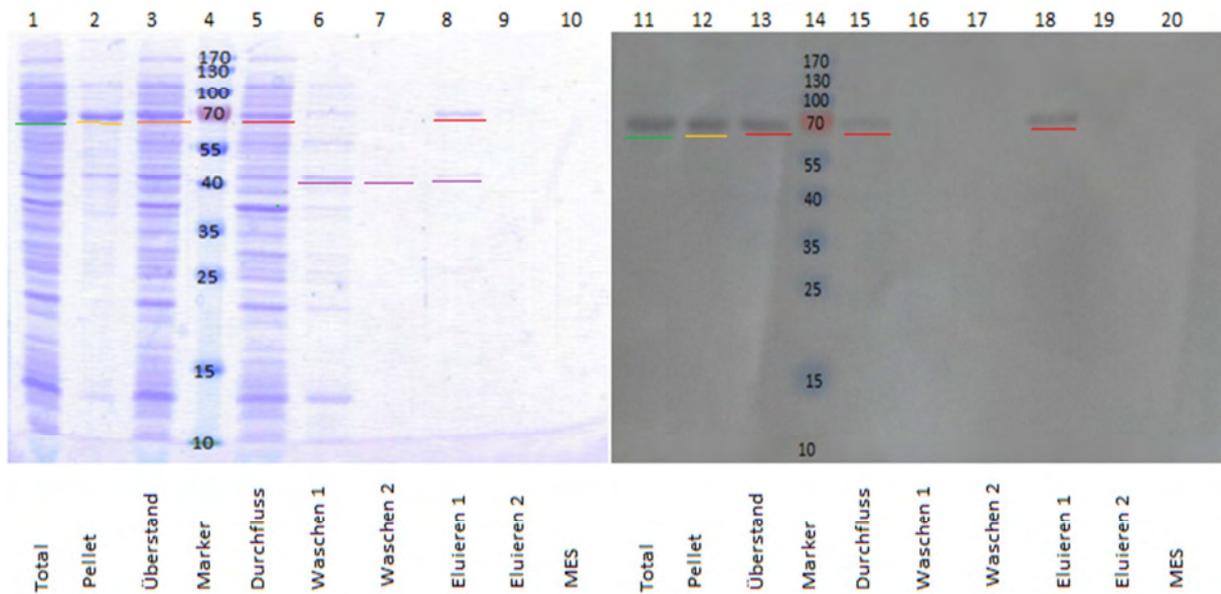


Abbildung 20 SDS-Page und Western Blot Ergebnis der Aufreinigung der 50 ml Kultur 18°C/0,5 mM

Auf der linken Seite der Abbildung ist das SDS-Gel und auf der rechten Seite die Western Blot-Membran der Aufreinigung zu sehen. Die Bande der α -2,3-Sialyltransferase des Total ist grün, die Bande des Pellets orange, die Bande des Überstandes, Durchflusses und des Eluats sind rot und die zweite Bande im Eluat ist lila unterstrichen. Auf der Western Blot-Membran sind die Banden zu sehen, die auf dem SDS-Gel zur α -2,3-Sialyltransferase gehören.

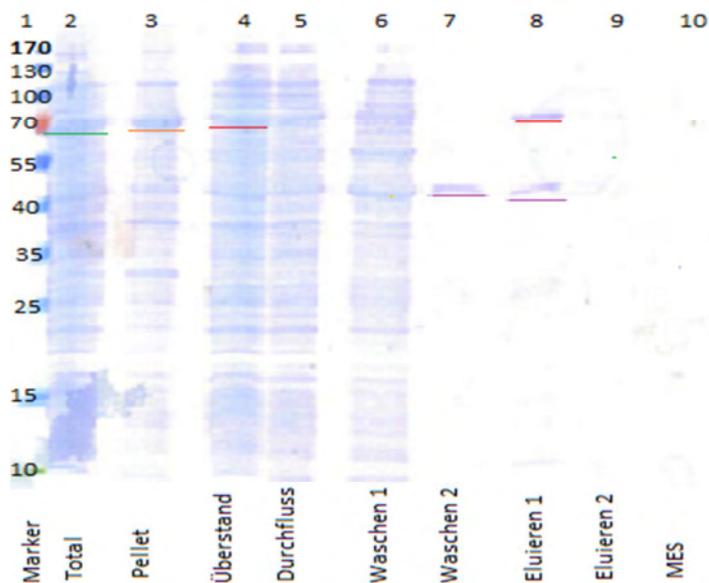


Abbildung 21 Western Blot Ergebnis der Aufreinigung der 250 ml Kultur 18°C/0,5 mM

Die Bande der α -2,3-Sialyltransferase des Total ist grün, die Bande des Pellets orange, die Bande des Überstandes, Durchflusses und des Eluats sind rot und die zweite Bande im Eluat ist lila unterstrichen.

Abbildung 21 stellt das SDS-Gel der Aufreinigung der 250 ml Kultur mit einer IPTG-Endkonzentration von 0,5 mM und einer Expressionstemperatur von 18°C dar. Die Banden der α -2,3-Sialyltransferase sind bei etwa 70 kDa zu sehen und damit bei der erwarteten Größe. Beim Total und Pellet sind die Banden in etwa gleich groß, die Bande des Überstandes weist auch keinen wesentlichen Größenunterschied auf. Die

Bande im Durchfluss ist im Einzelnen nicht zu erkennen. Bei den beiden Waschschrritten sind keine Banden der α -2,3-Sialyltransferase zu sehen, dafür aber eine 40 kDa Bande im zweiten Waschschrritt. Im ersten Eluat ist sowohl bei 70 kDa als auch bei 40 kDa eine Bande zu sehen.

Die α -2,3-Sialyltransferasebande im Total ist grün und die Banden bei 40 kDa im Waschschrritt 2 und Eluat 1 sind lila unterstrichen. Die Banden dieser 250 ml Kultur sind im Vergleich zu den Banden der 50 ml Kulturen wesentlich dicker. Im Eluat 2 und MES sind keine Banden zu erkennen. Die Bande des Überstandes und des Eluat 1 sind in etwa gleich groß. Auch zwischen den Banden des Pellets und Überstandes gibt es keinen wesentlichen Größenunterschied.

In Abbildung 22 ist das SDS-Gel der Aufreinigung der 500 ml Kultur mit einer IPTG-Endkonzentration und einer Temperatur von 18°C dargestellt. Die Bande des Pellets ist im Vergleich zu den anderen Banden der α -2,3-Sialyltransferase ziemlich dick. Die Banden des Überstandes und des Durchflusses sind schwer auszumachen, wirken jedoch etwa gleich groß. Die α -2,3-Sialyltransferasebande in den beiden Eluaten sind nur sehr schwach zu erkennen. Von Waschschrritt zu Waschschrritt wird die Bande bei 40 kDa immer schwächer und im Eluat 1 ist sie kaum noch zu erkennen.

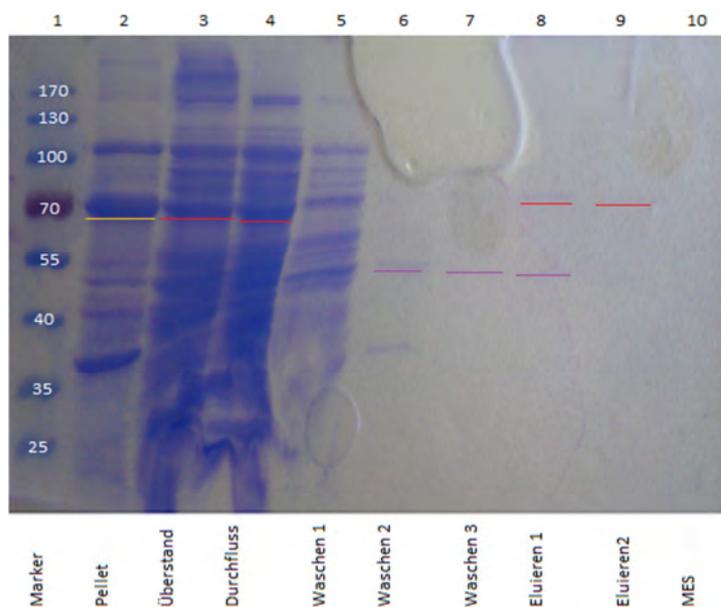


Abbildung 22 Western Blot Ergebnis der Aufreinigung der 500 ml Kultur 18°C/0,5 mM

Die Bande der α -2,3-Sialyltransferase des Pellets ist orange, die Bande des Überstandes, Durchfluss und des Eluats sind rot und die zweite Bande im Eluat ist lila unterstrichen. Beim Pellet ist die Bande im Vergleich zu den anderen ein ganzes Stück dicker. Die Banden des Überstandes und des Durchflusses sind als einzelne Banden schwer auszumachen, weisen untereinander jedoch keinen wesentlichen Größenunterschied auf. Bei den drei Waschschrritten sind keine Banden der α -2,3-Sialyltransferase zu sehen, dafür aber eine 40 kDa Bande ab dem zweiten Waschschrritt. Im ersten Eluat ist sowohl bei 70 kDa als auch bei 40 kDa eine Bande, im zweiten Eluat nur noch die α -2,3-Sialyltransferasebande zu sehen.

6. Diskussion

Das Ziel dieser Bachelorarbeit war es, rekombinante Proteine (α -1,2-Fucosyl- bzw. α -2,3-Sialyltransferase) zu exprimieren, die Expression zu optimieren und die Proteine anschließend bestmöglich aufzureinigen.

Transformation und Expressionsüberprüfung

Die Gensequenzen der α -1,2-Fucosyltransferase und der α -2,3-Sialyltransferase wurden in pET-Vektoren per Hitzeschock in die Zellen transformiert. Durch das pET-System lässt sich die Expression von Proteinen in *E.coli* kontrollieren. Durch die Anwesenheit der T7-RNA Polymerase wird die Expression ermöglicht und erst durch Zugabe von IPTG oder Laktose zu der Zellkultur induziert und kontrolliert (Merck, 2011). Um zu sehen ob die Transformation erfolgreich war und somit das pET-System arbeitet, wurde eine Expressionskontrolle durchgeführt. Durch die Expressionskontrolle anhand der Kolonienauswahl Abbildung 4 und Abbildung 15 wurde bestätigt, dass die Transformation des Vektors in die Zelle erfolgreich war und die *E.coli* Zellen die beiden Enzyme durch Zugabe von IPTG exprimieren. Nur bei einer erfolgreichen Transformation konnten die Zellen in dem mit Antibiotika versetzten Medium wachsen. Dies war nur möglich, da sie durch die Aufnahme des Vektors eine Antibiotikaresistenz erlangt haben. Wie die Bandendicke der Kolonie 15 auf der rechten Membran der Abbildung 4 und die Kolonien 3 und 7 auf der Membran in Abbildung 15 zeigt gibt es kleine Unterschiede in der Expressionsaktivität der einzelnen Zellkolonien. Von der Kolonie 4 der α -1,2-Fucosyltransferase und von der Kolonie 3 der α -2,3-Sialyltransferase wurde ein Zellstock angesetzt und gelagert.

Expressionsoptimierung der α -1,2-Fucosyltransferase

Die Expression von Enzymen mit dem pET-System kann durch die Zugabe von IPTG zur Zellkultur induziert und kontrolliert werden. Bei einigen Enzymen führt die vollständige Induktion, sprich die höchste IPTG-Endkonzentration, zum besten Expressionsergebnis und bei anderen Enzymen kann eine unvollständige Induktion zu der größten Menge löslicher Enzyme führen. Die Expressionstemperatur ist ein weiterer Faktor, der die Expression löslicher Enzyme beeinflusst (Merck, 2011). Aus

diesem Grund mussten die IPTG-Konzentration und die Expressionstemperatur für die α -2,3-Sialyltransferase und die α -1,2-Fucosyltransferase optimiert werden. Wie aus mehreren Literaturquellen entnommen, wurde ein IPTG-Konzentrationsbereich zwischen 0,1 mM und 1 mM und für die Expression ein Temperaturbereich zwischen 18°C und 30°C bzw. 37°C gewählt (Lee et al, 2012; Shell et al, 2002). Durch die Ergebnisse der einzelnen Schritte der Expressionsoptimierung bei der α -1,2-Fucosyltransferase ist zu sehen, dass es am praktischsten ist die Expressionstemperatur und IPTG-Konzentration zur gleichen Zeit zu optimieren. Bei den Ergebnissen der Temperaturoptimierung sind in Abbildung 7 und Abbildung 8 bei allen Proben der Überstände eine Bande zwischen 10 und 15 kDa. Diese Banden können daraufhin deuten, dass ein Teil des Zielproteins zerfällt. Eine Ursache für das Zerfallen des Zielproteins kann sein, dass das Protein während des Zellaufschlusses nicht ausreichend oder nicht durchgängig gekühlt war. Diese Banden sind bei der gleichzeitigen Optimierung der Expressionstemperatur und IPTG-Konzentration in den Abbildung 9 bis Abbildung 12 nicht mehr vorhanden. Die optimalen Werte, die für die α -1,2-Fucosyltransferase durch die Expressionsoptimierung ermittelt wurden, sind eine Expressionstemperatur von 25°C und eine IPTG-Konzentration von 0,75 mM. Die Banden bei den Pellets auf den Membranen der Expressionsoptimierung können wie schon im entsprechenden Abschnitt der Ergebnisse (Temperaturoptimierung, IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung der α -1,2-Fucosyltransferase) erwähnt durch Überladen der SDS-Geltaschen oder einen Pipettierfehler hervorgerufen worden sein. Es kann jedoch bei den verwendeten *E.coli* BL21 (DE3) Zellen in seltenen Fällen auch zu einer uninduzierten Expression kommen (New England Biolabs).

Aufreinigung der α -1,2-Fucosyltransferase

Die Ergebnisse der Aufreinigung der α -1,2-Fucosyltransferase (Abbildung 13) und der Expressionsüberprüfung (Abbildung 14) haben gezeigt, dass sich das gesamte Enzym bei 50 ml Kulturen im Pellet befindet. Es kann mehrere Gründe für dieses Verhalten geben. Möglich wäre es, dass die optimierten Expressionsbedingungen im 2 ml-Maßstab nicht die besten Expressionsbedingungen für 50 ml oder größere Maßstäbe sind. Bei Proteinen kommt es zudem immer auf deren Stabilität an. Daher kann es vorkommen, dass die Expression von löslicher α -1,2-Fucosyltransferase nur direkt und einige Tage nach der Transformation des Vektors in die Zellen möglich ist

und die Vektoren bei einer längeren Lagerung bei 4 °C oder -80 °C nicht stabil bleiben und somit keine löslichen Proteine mehr exprimiert werden. Die Unbeständigkeit bei der Expression der α -1,2-Fucosyltransferase könnte auch an den ausgewählten Zellen liegen. Eventuell sind die *E.coli* BL21 (DE3) Zellen nicht optimal für die Expression der α -1,2-Fucosyltransferase des verwendeten *Helicobacter pylori* J99 Stammes geeignet. Dass sich das gesamte Protein im Pellet befindet lässt auf sogenannte inclusion bodies (Einschlusskörper) schließen. Inclusion bodies sind unlösliche Aggregate, die aus falsch gefalteten Proteinen bestehen und sich bei Über-Expression bilden können. Eine verringerte Wachstumsrate vermindert die Bildung von inclusion bodies und erhöht somit die Expression löslicher Proteine (GE Healthcare Bio-Sciences AB. 2007). Durch weitere und erneute Optimierungsschritte kann die Bildung von inclusion bodies reduziert werden. Die Optimierungsschritte für die 2 ml Kulturen sollten wiederholt und so verbessert werden, dass sie auch auf größere Kulturen angewandt werden können.

Expressionsoptimierung der α -2,3-Sialyltransferase

Bei der α -2,3-Sialyltransferase wurde von vornherein die gleichzeitige Optimierung von Temperatur und IPTG-Konzentration durchgeführt. (Abbildung 16 bis Abbildung 18) In der Abbildung 17 ist deutlich zu sehen, dass bei einer Expressionstemperatur von 18 °C und einer IPTG-Konzentration von 0,5 mM die Banden der Überstände größer sind als die der Pellets. Bei einer Expressionstemperatur von 18 °C und einer IPTG-Konzentration von 0,25 mM sind die Banden, wie in Abbildung 18 zu sehen, der Überstände genauso groß wie die der Pellets. Aus diesem Grund wurde mit diesen beiden Varianten je eine 50 ml Kultur angesetzt.

Vergleicht man die beiden Ergebnisse der beiden 50 ml Kulturen, ist deutlich sichtbar, dass die 50 ml Kultur mit einer Expressionstemperatur von 18 °C und einer IPTG-Konzentration von 0,5 mM (Abbildung 20) eine wesentlich dickere Bande im Eluat aufweist als die 50 ml Kultur mit der Expressionstemperatur von 18 °C und einer IPTG-Konzentration von 0,25 mM (Abbildung 19). Daraus lässt sich schließen, dass die optimalen Expressionsbedingungen für die α -2,3-Sialyltransferase sowohl bei 2 ml als auch größeren Kulturen eine Expressionstemperatur von 18 °C und eine IPTG-Konzentration von 0,5 mM entsprechen. Die IPTG-Konzentration entspricht somit einer in einer Literatur verwendeten IPTG-Konzentration bei Raumtemperatur

(Shell et al, 2002). Die Optimierungsschritte für die α -2,3-Sialyltransferase sollten zur Überprüfung der Ergebnisse wiederholt werden.

Aufreinigung der α -2,3-Sialyltransferase

Die Durchführung der Aufreinigung wurde nach Empfehlungen des Säulenmaterialherstellers durchgeführt und optimiert (Clontech Laboratories, Inc. 2007). In allen Abbildungen der Aufreinigung ist zu sehen, dass außer der 70 kDa Bande der α -2,3-Sialyltransferase noch eine weitere Bande bei etwas über 40 kDa trotz der Waschschrte mit im Eluat ist. Die 40 kDa Bande kann ein Zellbestandteil oder ein Zellprodukt sein, welches genau wie die α -2,3-Sialyltransferase eine Affinität zu Cobalt hat. Wie in GE Healthcare Bio-Sciences AB. (2012) beschrieben werden His-tag Proteine durch die hohe selektive Affinität zu Metallionen bei der Aufreinigung selektiv an das mit Metallionen beladene Säulenmaterial gebunden. Andere zelluläre Proteine werden hingegen nicht oder nur schwach an die Säule gebunden, dies kann bei freien oberflächenaktive Histidinreste oder anderen komplexbildende Aminosäuren der Fall sein. Die Bindungsaffinität dieser unspezifisch gebunden Zellproteine ist meistens geringer als die des Zielproteins, wodurch die unerwünschten Zellproteine durch waschen der Säule mit einem Waschpuffer, der eine geringere Konzentration Imidazol enthält als für die Elution des Zielproteins nötig ist, weitgehend entfernt werden können (GE Healthcare Bio-Sciences AB. 2012). Die Affinität der α -2,3-Sialyltransferase ist wie oben beschrieben sichtbar stärker, da sich die 40 kDa Bande durch eine geringere Imidazolkonzentration von der Säule waschen lässt als die α -2,3-Sialyltransferase.

Bei der Aufreinigung der 500 ml Kultur (Abbildung 22) wurden drei Waschschrte durchgeführt, wobei bei jedem Waschschrte die Imidazolkonzentration etwas erhöht wurde. Diese Imidazolkonzentrationserhöhung macht deutlich, dass es möglich ist, die unerwünschte Bande bei 40 kDa von der Säule zu waschen ohne, dass die Probe mit von der Säule gewaschen wird. Die genaue Imidazolkonzentration für die vollständige Entfernung der unerwünschten Bande muss allerdings noch ermittelt werden, da bei 40 mM Imidazol nach wie vor eine ganz schwache Bande zu erkennen ist.

Vergleicht man die Aufreinigung der 250 ml Kultur (Abbildung 21) und die der 500 ml Kultur (Abbildung 22), so ist der Einfluss der Inkubationszeit der Probe auf der Säule deutlich sichtbar. Bei der 250 ml Kultur hatte die Probe eine Inkubationszeit von

30 min, wohingegen die 500 ml Kultur keine Inkubationszeit hatte. Es ist zu sehen, dass bei der 500 ml Kultur der Verlust an der Probe viel größer ist als bei der 250 ml Kultur. Dies ist bei dem Vergleich der Banden von den jeweiligen Überständen, Durchflüssen und Eluaten festzustellen. Die Banden des Überstandes und Durchflusses sind bei der 500 ml Kultur nahezu gleich groß, wohingegen die Bande des Durchflusses bei der 250 ml Kultur um einiges kleiner ist als die des Überflusses.

7. Ausblick

Für die Arbeit mit Enzymen wie α -2,3-Sialyltransferase und α -1,2-Fucosyltransferase sind solche Kenntnisse wie sie in dieser Arbeit gewonnen wurden wichtig. Um so viele Informationen wie möglich über diese Enzyme zu bekommen und diese somit zu charakterisieren, wäre es von Vorteil, bei beiden Enzymen an unterschiedlichen Stellen wie nach der Expression, nach der Aufreinigung und nach unterschiedlichen Lagerungsstadien einen Aktivitätstest durchzuführen. Dadurch bekommt man einen Einblick in die Stabilität und Lagerungsfähigkeit der Enzyme. Um solche Versuche durchführen zu können muss natürlich für die α -1,2-Fucosyltransferase die Expression für 50 ml und größere Kulturen optimiert werden, um anschließend mit beiden Enzymen auf eine Fermentation im 1 l – 10 l Maßstab umsteigen zu können.

Die Aufreinigung der α -1,2-Fucosyltransferase könnte, wie von Stein et al. (2008) beschrieben, per Nickel-Affinitätschromatographie mit Elution durch Imidazol und anschließender Entsalzung per HiPrep 26/10 durchgeführt werden. Des Weiteren ist beschrieben, dass α -1,2-Fucosyltransferase in flüssigem Stockstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden kann. (Stein et al., 2008). Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass bei Stein et al. (2008) die α -1,2-Fucosyltransferase zwar auch aus *Helicobacter pylori* jedoch von einem anderen Stamm stammt.

Die Aufreinigung der α -2,3-Sialyltransferase kann eventuell durch weitere Optimierungsschritte wie weitere Änderungen in der Imidazolkonzentration oder durch die Änderung der verwendeten Metallionen in z.B. Ni^{2+} noch verbessert werden. Die Stärke der Bindung hängt von der Art des Histidins als auch dem Metallionen ab (GE Healthcare Bio-Sciences AB. 2012).

Mit den gesammelten Informationen wäre es dann möglich größere Mengen der Enzyme für den Verkauf herzustellen und das Wissen über diese Enzyme auf einen Zellorganismus zu übertragen, der nicht nur α -1,2-Fucosyltransferase und α -2,3-Sialyltransferase herstellt, sondern diese sofort zur weiteren Synthese von Sialyllactose und Fucosyllactose verwendet. Die damit gewonnen Milchzucker könnten so wiederrum kostengünstiger produziert werden als es zu diesem Zeitpunkt möglich ist und als Nahrungsmittelergänzung zu Säuglings- und Kleinkindernahrung hinzugefügt werden.

8. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, Vektoren mit den Gensequenzen für α -2,3-Sialyltransferase und für α -1,2-Fucosyltransferase in *E.coli* Zellen zu transformieren, die beiden Enzyme zu exprimieren, die Expression zu optimieren und im Anschluss die Enzyme bestmöglich aufzureinigen.

Das Plasmid pET16, welches das Gen für die α -1,2-Fucosyltransferase trägt, wurde per Hitzeschock in *E.coli* BL21 (DE3) Zellen und das Plasmid pET24a, welches das Gen für die α -2,3-Sialyltransferase trägt, wurde auch per Hitzeschock in *E.coli* SHuffle[®] T7 Zellen transformiert.

Sowohl für die α -1,2-Fucosyltransferase als auch für die α -2,3-Sialyltransferase waren die Transformation und die Optimierung der Expression im 2 ml-Maßstab in dem gewählten Bereich erfolgreich. Für die α -1,2-Fucosyltransferase wurden die drei Expressionstemperaturen 18 °C, 25 °C und 37 °C und für die α -2,3-Sialyltransferase 18 °C, 25 °C und 30 °C für die Optimierung gewählt. Der Optimierungsbereich der IPTG-Konzentration lag zwischen 0,1 mM und 1,0 mM.

Die optimalen Expressionsbedingungen in den gewählten Bereichen für die α -2,3-Sialyltransferase sind eine Expressionstemperatur von 18 °C und eine IPTG-Konzentration von 0,5 mM. Für die α -1,2-Fucosyltransferase liegen die optimalen Expressionsbedingungen bei einer Expressionstemperatur von 25 °C und einer IPTG-Konzentration von 0,75 mM.

Für die α -1,2-Fucosyltransferase wurden mehrere 50 ml Zellkulturen kultiviert. Durch die Aufreinigung einer Kultur und eine Expressionsüberprüfung der anderen Kulturen hat sich gezeigt, dass die Expressionsbedingungen für den 2 ml Maßstab nicht für größere Kulturen geeignet sind.

Für die α -2,3-Sialyltransferase wurden 50 ml, 250 ml und 500 ml Kulturen kultiviert. Bei den Aufreinigungen zeigte sich bei allen Kulturen in den Eluat zu der Bande der α -2,3-Sialyltransferase noch eine weitere Bande bei etwa 40 kDa. Diese zusätzliche Bande ließ sich durch die Erhöhung der Imidazolkonzentration im Waschpuffer fast komplett entfernen. Das Variieren der Inkubationszeit hat gezeigt, dass durch eine längere Inkubationszeit von 30 min die Proteinmenge im Durchfluss verringert und im Eluat erhöht.

9. Literaturverzeichnis

- Busch, U. (2010). *Molekularbiologische Methoden in der Lebensmittelanalytik*. Heidelberg, Berlin: Springer Verlag.
- Campbell, N. A., Reece, J., & Markl, J. (2006). *Biologie*. München: Pearson Studium.
- Chmiel, H. (2011). *Bioprozesstechnik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Drlica, K. (1995). *DNA und Genklonierung*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Eckert, W., & Kartenbeck, J. (1997). *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*. Heidelberg: Springer Verlag.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB. (2007). *Purifying Challenging Proteins, Principles and Methods*. Sweden.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB (2012) *Recombinant Protein Purification, Principles and Methods*. Schweden
- Gilbert, M., Bayer, R., Cunningham, A.-M., DEFrees, S., Gao, Y., Watson, D. C., Young, N.M., Wakarchuk, W. W. (1998). The Synthesis of sialylated oligosaccharides using a CMP-Neu5Ac synthetase/sialyltransferase fusion. *Nature Biotechnology* volume 16, S. 769-772.
- Jansohn, M., & Rothhämel, S. (2012). *Gentechnische Methoden Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Janson, J.-C. (2011). *Protein Purification Principles, High Resolution Methods, and Applications*. USA: Wiley.
- Knippers, R. (2006). *Molekulare Genetik*. stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., & Strobel, S. (2000). Oligosaccharides in Human Milk: Structural, Functional, and Metabolic Aspect. *Annu Rev. Nutr.*, S. 20:699-722.
- Lee, W.-H., Pathanibul, P., Quarterman, J., Jo, J.-H., Han, N. S., Miller, M. J., Jin, Y-S., Seo, J-H. (2012). Whole cell biosynthesis of a functional oligosaccharide, 2' -fucosyllactose, using engineered Escherichia coli. *Microbial Cell Factories*.
- Munk, K. (2001). *Genetik*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Palcic, M. M. (1. 12 1999). Current Opinion in Biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, S. 616-624.
- Palcic, M. M. (19. Februar 2011). Glycosyltransferases as biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, S. 226-233.

- Rehm, H., & Letzel, T. (2006). *Der Experimentator Proteinbiochemie/ Proteomics*. München: Spektrum Akademischer Verlag.
- Schär, J. (2006). Molekulare Charakterisierung der Response-Regulatoren ArsR (HP0166), HP1043 und HP1021 von *Helicobacter pylori*. *Dissertation*. Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Schwörer, R. (2004). *Sialyltransferase-Inhibition*. Göttingen: Cuvillier Verlag Göttingen.
- Shell, D. M., Chiles, L., Judd, R. C., Seal, S., & Rest, R. F. (Juli 2002). The Neisseria Lipooligosaccharide-Specific α -2,3-Sialyltransferase is a Surface-Exposed Outer Membrane Protein. *INFECTION AND IMMUNITY*, S. 3744–3751.
- Stein, D. B., Lin, Y.-N., Lin, C.-H. (2008) Characterization of *Helicobacter pylori* α 1,2-Fucosyltransferase for Enzymatic Synthesis of Tumor-Associated Antigens. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 350, S. 2313-2321
- Thieman, W. J., & Palladino, M. A. (2007). *Biotechnologie*. München: Pearson Studium.
- Twyman, R., & Primose, S. (2006). *Principles of Gene Manipulation an Genomics*. Blackwell Publishing.
- Ünlügil, U. M., & Rini, J. M. (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, S. 510-517.
- Wang, G., Rasko, D. A., Sherburne, R., & Taylor, D. E. (31. 4 1999). Molecular genetic basis for the variable expression of Lewis Y antigen in *Helicobacter pylori*: analysis of the α (1,2) fucosyltransferase gene. *Molecular Microbiologie*, 31(4) S. 1265-1274.

9.1 Internetliteratur

- Carl Roth GmbH + Co. KG. (07 2012). *Carl Roth Technische INFO*. Abgerufen am 11. 6. 2013 von <http://www.carlroth.com/website/de-de/pdf/PAGE.pdf>
- Merck. (2011). *Novagen® pET System Manual 11th Edition*. Abgerufen am 20. 6. 2013 von www.merckmillipore.com:
http://www.merckmillipore.com/chemicals/en_US/Merck-IN-Site/INR/ViewProductDocuments-File?ProductSKU=EMD_BIO-

- 70561&DocumentType=USP&DocumentId=%2Femd%2Fbiosciences%2Fuser
protocols%2Fen-US%2FTB055.pdf&DocumentSource=GDS.
- New England Biolabs. (kein Datum). *BL21 (DE3) Competent E.coli*. Abgerufen am
10. 6. 2013 von [http://www.neb.com/~media/Catalog/All-
Products/0B28021B9A36470BB46B318DAD19ED4F/Datacards%20or%20Ma
nuals/C2527I-18.pdf](http://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/0B28021B9A36470BB46B318DAD19ED4F/Datacards%20or%20Manuals/C2527I-18.pdf)
- New England Biolabs. (kein Datum). *Shuffle T7 Competent E.coli*. Abgerufen am
25. 6. 2013 von [https://www.neb.com/~media/Catalog/All-
Products/F524E4E9C2434BC6B34C66BC60565D40/Datacards%20or%20Ma
nuals/C3026H-2.pdf](https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/F524E4E9C2434BC6B34C66BC60565D40/Datacards%20or%20Manuals/C3026H-2.pdf)
- Novagen. (1999). *Benzonase® Nuclease*. Abgerufen am 6. 8 2013 von
[http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/DNA_Removal/NOVAGEN_Benzonas
e.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/DNA_Removal/NOVAGEN_Benzonas
e.pdf)
- Novagen®. (2008). BugBuster® Protein Extrraction Reagent. Abgerufen am
6. 8. 2013 von [http://www.merckmillipore.de/chemdat/en_CA/Merck-US-
Site/USD/ViewProductDocuments-File?ProductSKU=EMD_BIO-
71456&DocumentType=USP&DocumentId=/emd/biosciences/userprotocols/e
n-US/TB245.pdf&DocumentSource=GDS](http://www.merckmillipore.de/chemdat/en_CA/Merck-US-
Site/USD/ViewProductDocuments-File?ProductSKU=EMD_BIO-
71456&DocumentType=USP&DocumentId=/emd/biosciences/userprotocols/e
n-US/TB245.pdf&DocumentSource=GDS)
- Clontech Laboratories, Inc.(2007). TALON® Metal Affinity Resins User Manual.
Abgerufen am 28. 8. 2013 von
http://wolfson.huji.ac.il/expression/local/Talon_Products.pdf

Anhang

Sequenzen der verwendeten Proteine

In diesem Abschnitt werden die Sequenzen der α -2,3-Sialyltransferase und der α -1,2-Fucosyltransferase aufgezeigt. Anhand der Sequenzen wurden die Basisdaten wie das Molekulargewicht der Enzyme ermittelt.

α -1,2-Fucosyltransferase Sequenz

Helicobacter pylori J99, alpha-1,2-fucosyltransferase

```
GCTTTTAAAGTGGTGCAAATTTGCGGGGGGCTTGGGAATCAAATGTTCCAATACGCTTTC
GCTAAAAGTTTGCAAAAACACTCTAATACGCCCGTGCTATTGGATATCACTTCTTTTGAT
GGGAGCAATAGGAAAATGCAATTAGAGCTTTTCCCTATTGATTTGCCCTATGCGAGCGCA
AAAGAAATCGCTATAGCTAAAATGCAACACCTCCCCAAGCTAGTAAGAGACGCGCTCAA
TACATGGGGTTTGATAGGGTGAGTCAAGAAATCGTTTTTGAATACGAGCCTAAATTATTA
AAGCCAAGCCGCTTGACTTATTTTTATGGCTATTTTCAAGATCCACGATATTTTGATGCT
ATATCCTCTTTAATCAAGCAAACCTTCACCTACCCCCCCCCCGAAAATGGAATAAT
AAAAAAAAAGAGGAAGAATACCACCGCAAGCTTCTTTGATTTTAGCCGCTAAAAACAGC
GTATTTGCGCATATAAGAAGAGGGGATTATGTGGGGATTGGCTGTCAGCTTGGTATTGAC
TATCAAAAAAGGCTGTTGAGTATATGGCAAAGCGCGTGCCAAACATGGAGCTTTTTGTA
TTTTGTGAAGACTTAAAATTCACGCAAAACCTTGATCTTGGCTACCCTTTTATGGACATG
ACCACTAGGGATAAAGACGAAGAGGCGTATTGGGACATGCTGCTCATGCAATCTTGCAAG
CATGGCATTATCGCTAACAGCACTTATAGCTGGTGGGCGGCTTATTTGATAAACAATCCA
GGAAAAATCATCATTGGCCCCAAACACTGGCTTTTTGGGCATGAAAACATCCTTTGTAAG
GAATGGGTGAAAATAGAATCCATTTTGAGGTGAAATCCCAAAAGTATAACGCTTAG
```

protein sequence

```
AFKVVQICGGLGNQMFQYAFKSLQKHSNTPVLLDITSFDGNSNRKMQLLEFPIDLPHYASA
KEIAIAKMQHLPKLVLDALKYMGFDRVSQEIVFEYEPKLLKPSRLTYFYGYFQDPRYFDA
ISSLIKQFTFLPPPPENGNKKKKEEYHRKLSLILAAKNSVFAHIRRGDYVIGCQLGID
YQKKAVEYMAKRVPNMFVFCEDLKFTQNLDLGYPFMDMTRDKDEEAYWDMLLMQSCK
HGIIANSTYSWWAAYLINNPGKIIIGPKHWLFGHENILCKEWVKIESHFVKSQKYN
```

Sequenzen der einzelnen Fusionsproteine der α -2,3-Sialyltransferase

N-acylneuraminate cytidyltransferase catalyzes the following reaction:

CTP + N-acylneuraminate \rightleftharpoons diphosphate + CMP-N-acylneuraminate

gb|AEQF01000004.1|:19129-19815 Neisseria meningitidis M6190 nmm6190c.contig.3, whole genome shotgun sequence reverse complement with NANA

```
ATGGAAAAACAAAATATTGCGGTTATACTTGC GCGCCAAAACCTCAAAGGATTGCCATTTAA
AAATCTCCGGAAAATGAATGGCATATCATTACTTGGT CATACAATTAATGCTGCTATATCAT
CAAAGTGTTTTGACCGCATAATTGTTTCGACTGATGGCGGGTTAATTGCAGAAGAAGCTAA
AAATTTGCGGTGTCGAAGTCGTCTACGCCCTGCAGAGCTGGCCTCCGATACAGCCAGCTC
```

TATTTGAGGTGTAATACATGCTTTAGAAACAATTGGCAGTAATTCCGGCACAGTAACCCTAT
TACAACCAACCAGTCCATTACGCATAGGGGCTCATATTCGTGAAGCTTTTTCTCTATTTGAT
GAGAAAATAAAAGGATCCGTTGTCTCTGCATGCCAATGGAGCATCATCCACTAAAAACCC
TGCTTCAAATCAATAATGGCGAATATGCCCCATGCGCCATCTAAGCGATTTGGAGCAGCC
TCGCCAACAATTACCTCAGGCATTTAGGCCTAATGGTGCAATTTACATTAATGATACTGCTT
CACTAATTGCAAATAATTGTTTTTTATCGCCCCAACCAACTTTATATTATGTCTCATCAAG
ACTCTATCGATATTGATACTGAGCTTGATTTACAACAGGCAGAAAACATTCTTAATCACAAG
GAAAGCTAA

Beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase catalyzes the following reaction:

CMP-N-acetylneuraminate + beta-D-galactosyl-1,3-N-acetyl-alpha-D-galactosaminyl-
R \rightleftharpoons CMP + alpha-N-acetylneuraminy-2,3-beta-D-galactosyl-1,3-N-acetyl-alpha-D-
galactosaminyl-R

>gj|77358697:934788-935903 *Neisseria meningitidis* MC58 chromosome, complete genome
corresponding to 2,3 sialyltransferase

ATGGGCTTGAAAAAGGCTTGTGGACCGTGTTGTGTTGATTGTTTTTTGTTTCGGGATATT
TTATACAT
TTGACCGGGTAAATCAGGGGGAAAGGAATGCGGTTTCCCTGCTGAAGGAGAACTTTTCA
ATGAAGAGGG
GGAACCGGTCAATCTGATTTTCTGTTATACCATATTGCAGATGAAGGTGGCGGAAAGGATT
ATGGCGCAG
CATCCGGGCGAGCGGTTTTATGTGGTGCTGATGTCTGAAAACAGGAATGAAAATACGATT
ATTATTTCA
ATCAGATAAAGGATAAGGCGGAGCGGGCGTACTTTTTCCACCTGCCCTACGGTTTGAACAA
ATCGTTTAA
TTTTATTCCGACGATGGCGGAGCTGAAGGTAAGTCGATGCTGCTGCCGAAAGTCAAGCG
GATTTATTTG
GCAAGTTTGGAAAAAGTCAGCATTGCCGCTTTTTGAGCACTTACCCGGATGCGGAAATCA
AAACCTTTG
ACGACGGGACAGGCAATTTAATTCAAAGCAGCAGCTATTTGGGCGATGAGTTTTCTGTAAA
CGGGACGAT
CAAGCGGAATTTTGGCCGGATGATGATCGGAGATTGGAGCATCGCCAAAACCCGCAATGC
TTCCGACGAG
CATTACACGATATTCAAGGGTTTAAAAACATTATGGACGACGGCCGCCGCAAGATGACTT
ACCTGCCGC
TGTTGATGCGTCCGAACTGAAGACGGGGACGAAACGGGCGGCACGGTGCGGATACTT
TTGGGTTCCGCC
CGACAAAGAGATGAAGGAAATTTGCGAAAAGGCGGCAAAAACTTCAAATACAATATGTC
GCGCCGCAT
CCCCGCCAACCTACGGGCTTTCCGGCGTAACACATTAAATTCGCCCTATGTCATCGAAG
ACTATATTT
TGCGCGAGATTAAGAAAAACCCGCATACGAGGTATGAAATTTATACCTTTTTTCAGCGGCGC
GGCGTTGAC
GATGAAGGATTTTCCAATGTGCACGTTTACGCATTGAAACCGGCTTCCCTCCGGAAGAT
TATTGGCTC
AAGCCGGTGTATGCCCTGTTTACCCAATCCGGCATCCCGATTTTGACATTTGACGATAAAA
ATTAA

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen	V
Tabelle 2: Geräteliste	12
Tabelle 3 Chemikalienliste	13
Tabelle 4 Materialienliste.....	14
Tabelle 5 IPTG Konzentration für die IPTG-Optimierung	18
Tabelle 6 IPGT-Konzentration für die IPTG-Temperatur-Optimierung	19
Tabelle 7 Pipettierschema für SDS-Gele mit einer Konzentration von 12,5%.	26
Tabelle 8 Probenpuffer-Ansatz.....	31

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aufbau der Gelkammer.....	25
Abbildung 2 SDS-Page Aufbau	27
Abbildung 3 Western Blot Stapelschema der Filterpapiere, des Gels und der Membran	29
Abbildung 4 Western Blot Ergebnis der Kolonienauswahl Membran 1 und 2.....	36
Abbildung 5 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrationsoptimierung bei 37 °C; Membran 1 und 2	37
Abbildung 6 Western Blot Ergebnis von der IPTG-Konzentrationsoptimierung bei 37 °C; Membran 3 und 4'	37
Abbildung 7 Western Blot Ergebnis der Temperaturoptimierung mit einer IPTG- Konzentration von 1 mM; Membran 1 und 2	38
Abbildung 8 Western Blot Ergebnis der Temperaturoptimierung mit einer IPTG- Konzentration von 1 mM; Membran 3	39
Abbildung 9 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 1 und 2.....	40
Abbildung 10 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 3.....	40
Abbildung 11 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 4.....	41
Abbildung 12 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 5 und 6.....	41
Abbildung 13 SDS-PAGE und Western Blot Ergebnis von der Aufreinigung der 50 ml Kultur 25 °C/0,75 mM.....	42
Abbildung 14 Western Blot Ergebnis der Expressionsüberprüfung der 50 ml Kulturen 18 °C/0,5 mM und 25 °C/0,75 mM.....	43
Abbildung 15 Western Blot Ergebnis der Kolonienauswahl von der Sialyltransferase	44
Abbildung 16 Western Blot Ergebnis der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 1 und 2.....	45
Abbildung 17 Western Blot Ergebnisse der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 3 und 4	45

Abbildung 18 Western Blot Ergebnisse der IPTG-Konzentrations- und Temperaturoptimierung; Membran 5 und 6	46
Abbildung 19 SDS-Page Ergebnis der Aufreinigung der 50 ml Kultur 18 °C/0,25 mM	47
Abbildung 20 SDS-Page und Western Blot Ergebnis der Aufreinigung der 50 ml Kultur 18 °C/0,5 mM.....	48
Abbildung 21 Western Blot Ergebnis der Aufreinigung der 250 ml Kultur 18 °C/0,5 mM	48
Abbildung 22 Western Blot Ergebnis der Aufreinigung der 500 ml Kultur 18 °C/0,5 mM	49