



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie der Fakultät Life Sciences

# Entwicklung einer Screeningmethode in Mikrotiterplatten für Produkt-Vektor-Stamm- Kombinationen unter Berücksichtigung von drei Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts

vorgelegt von  
**Sarah Corinna Lender**

Matrikelnummer: 2001663  
Hamburg am 22. August 2013

Gutachter: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)  
Gutachter: Dr. Bettina Diederich (Richter-Helm BioLogics)

Diese Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Firma Richter-Helm BioLogics GmbH CoKG

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Grundlagen der Biotechnologie . . . . .	1
1.2. Richter-Helm BioLogics . . . . .	2
1.3. Zielsetzung . . . . .	2
<b>2. Theoretische Grundlagen</b>	<b>4</b>
2.1. Stämme . . . . .	4
2.1.1. Escherichia coli . . . . .	4
2.1.2. NEB-Stämme für T7-Expression . . . . .	6
2.1.3. ATCC-Stämme ohne T7-System . . . . .	8
2.1.4. Klonierungsstamm . . . . .	9
2.2. Vektoren . . . . .	9
2.2.1. Allgemeiner Aufbau . . . . .	9
2.2.2. pHI . . . . .	10
2.2.3. pIPTG_T5 . . . . .	11
2.2.4. pET26b(+) . . . . .	11
2.3. Produkte . . . . .	13
2.3.1. Hormon . . . . .	14
2.3.2. Prähormon . . . . .	15
2.3.3. Zytokin . . . . .	15
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
3.1. Allgemeine Materialien . . . . .	16
3.2. Klonierung . . . . .	16
3.2.1. pDNA-Preparation . . . . .	16
3.2.2. Restriktionsverdau . . . . .	18
3.2.3. Gelextraktion . . . . .	18
3.2.4. Ligation . . . . .	19
3.2.5. Transformation . . . . .	19
3.3. Analysenmethoden . . . . .	20
3.3.1. Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	20
3.3.2. OD-Messung . . . . .	21
3.3.3. BTM-Bestimmung . . . . .	22

3.3.4.	SDS-PAGE . . . . .	23
3.3.5.	Coomassie-Färbung . . . . .	24
3.3.6.	Quantifizierung . . . . .	24
3.3.7.	Western Blot . . . . .	25
3.4.	Expressionstest . . . . .	27
3.4.1.	Expressionstest . . . . .	27
3.4.2.	Cryo Stock Ablage . . . . .	28
<b>4.</b>	<b>Vorversuche</b>	<b>29</b>
4.1.	Klonierungen und Transformationen . . . . .	29
4.1.1.	pET26b(+) . . . . .	29
4.1.2.	pHI . . . . .	30
4.1.3.	pIPTG_T5 . . . . .	31
4.2.	OD-Messung mit dem Multireader . . . . .	31
4.3.	Wachstumskurven . . . . .	36
4.3.1.	Vergleich der verschiedenen Stämme im Schüttelkolben . . . . .	36
4.3.2.	Vergleich des Wachstums in unterschiedlichen Formen von Mikro- titerplatten und zum Schüttelkolben . . . . .	37
4.3.3.	Einfluss des Kanamycins auf das Wachstum . . . . .	41
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse der Hauptversuche und Diskussion</b>	<b>42</b>
5.1.	Prähormon . . . . .	42
5.1.1.	Expression . . . . .	42
5.1.2.	Insertnachweis bei fehlender Expression . . . . .	45
5.1.3.	Produktnachweis mittels Western Blot . . . . .	45
5.1.4.	Plattenvergleich mit Quantifizierung . . . . .	47
5.2.	Zytokin . . . . .	49
5.2.1.	Expression . . . . .	49
5.2.2.	Insertnachweis bei fehlender Expression . . . . .	52
5.2.3.	Produktnachweis mittels Western Blot . . . . .	52
5.2.4.	Plattenvergleich mit Quantifizierung . . . . .	53
5.3.	Hormon . . . . .	55
5.3.1.	Expression . . . . .	55
5.3.2.	Insertnachweis bei fehlender Expression . . . . .	57
5.3.3.	Temperaturverlauf bei Hitzeinduktion . . . . .	57
5.3.4.	Produktnachweis mittels Western Blot . . . . .	58
5.3.5.	Plattenvergleich mit Quantifizierung . . . . .	59
5.4.	Reproduzierbarkeit mit neuem Produkt . . . . .	61
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>66</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>
	<b>Bilderverzeichnis</b>	<b>69</b>

<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>74</b>
A.1. <i>Restriktionsanalysen</i> . . . . .	74
A.2. <i>OD-Werte der Beispielrechnung</i> . . . . .	76
A.3. <i>Expressionstest PräHOR</i> . . . . .	77
A.4. <i>Expressionstest ZYT</i> . . . . .	79
A.5. <i>Expressionstest HOR</i> . . . . .	81
A.6. <i>Reproduzierbarkeit</i> . . . . .	84

# Danksagung

Die vorliegende Bachelorarbeit entstand in der Hamburger Betriebsstätte der Firma Richter-Helm BioLogics. Für die Möglichkeit diese Arbeit durchzuführen möchte ich mich bei Richter-Helm BioLogics herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. Bettina Diederich für die hervorragende fachliche Betreuung dieser Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein weiterer Dank gilt dem gesamten Team der Prozessentwicklung für die hilfreiche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Frau Prof. Dr. Gesine Cornelissen danke ich für die Betreuung seitens der Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg.

Abschließend bedanke ich mich herzlich bei allen, die mich in der Zeit meiner Abschlussarbeit unterstützt haben, ganz besonders bei meinen Eltern, die mir stets helfend zur Seite gestanden und mein Studium erleichtert haben.

# Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, den 22. August 2013

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abk.:</b>	<b>Beschreibung:</b>	<b>Einheit:</b>
$\beta$	Massenkonzentration	$\left[\frac{g\ BTM}{l}\right]$
$\mu_{max}$	Maximale Wachstumsrate	$\left[\frac{1}{s}\right]$
$y_{p/x}$	Produktausbeutekoeffizient	$\left[\frac{g\ Produkt}{g\ BTM}\right]$
ATCC	American Type Culture Collection	
BSA	Bovine Serum Albumin	
BTM	Biotrockenmasse	
CIP	Collection of Institut Pasteur	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
GMP	Good Manufacturing Practice	
HOR	Hormon	
IFN	Interferon	
MCB	Master Cell Bank	
MCS	Multiple Cloning Site	
NEB	New England Biolabs	
OD	Optische Dichte	
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	
PräHOR	Prähormon	
RHB	Richter-Helm BioLogics	
RT	Raumtemperatur	
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	
Test-HOR	Testhormon	
WCB	Working Cell Bank	
ZYT	Zytokin	
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
pDNA	Plasmid-DNA	

# 1. Einleitung

## 1.1. Grundlagen der Biotechnologie

Der Begriff Biotechnologie bezeichnet „die Verwendung von lebenden Organismen für Industrielle Prozesse“ (Clark u. Pazdernik, 2009, S. 2).

Leider ist der Begriff Biotechnologie im Bewusstsein der Öffentlichkeit meist negativ behaftet. Dies rührt vor allem aus der Medienpräsenz her, wenn bspw. über die Zerstörung von Versuchsfeldern für genmanipulierten Mais, oder den Streit um die Kennzeichnungspflicht für gentechnisch veränderte Lebensmittel berichtet wird. Dabei reicht die Nutzung der Biotechnologie tausende Jahre zurück. In der Phase der empirischen Biotechnologie, ca. 7000 vor Christus, wurden bereits allgemeine Verfahren zur alkoholischen Gärung, sowie zur Sauerteigherstellung oder Käse- und Joghurtverarbeitung entwickelt und angewendet. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts erfolgte der Übergang in die Epoche der klassischen Biotechnologie. Die steigenden Anforderungen der Bevölkerung führten zu industrieller Milchsäuregewinnung und Backhefeherstellung, aber auch die biotechnologische Abwasserreinigung gewann mehr und mehr an Bedeutung. Nicht nur die Entdeckung der Enzyme 1897 und die biotechnologische Produktion von z. B. Zitronensäure in der Lebensmittelindustrie brachten die Entwicklung der Biotechnologie weit voran. In der Pharmazie stellte die Entdeckung des Penicillins und die fermentationstechnische Gewinnung von Antibiotika Meilensteine der Entwicklung dar. Die Entdeckung der Doppelhelix als universeller Erbsubstanzträger wird als Beginn der modernen bzw. neuen Biotechnologie bezeichnet. Durch bewusste Modifikation der DNA können eukaryotische Produkte wie Hormone oder Enzyme von Prokaryoten produziert werden (Zuber, 2008, S. 29-31).

Diese Verwendung molekularbiologischer Methoden in der Medizin beinhaltet die sogenannte rote Biotechnologie. Zum Ende des Jahres 2009 waren 188 solcher biotechnologisch hergestellten Biopharmaka verfügbar, wovon den Hauptteil Impfstoffe, Insuline und monoklonale Antikörper ausmachen. Diese Medikamente werden hauptsächlich in den Behandlungsfeldern Immunologie, Onkologie und Stoffwechselerkrankungen eingesetzt. Sie erzielten im Jahre 2009 einen Umsatz von 4,7 Milliarden Euro in Deutschland, was 16 Prozent des gesamten Pharmamarktes entspricht. Und gut ein Drittel der 2009 neu zugelassenen Medikamente wurden biotechnologisch hergestellt (Hoffbauer, 2011, S. 52-53).

Die Möglichkeit der schnellen und kostengünstigen Produktion von z. B. Enzymen durch Mikroorganismen sind entscheidende Vorteile der Biopharmaka. Aber auch die von Standort, Jahreszeit und Umgebungsbedingungen unabhängige Erzeugung in großen Mengen



lässt das Interesse und die Nutzung steigen.

Nahezu jeder ist bereits mit biotechnologischen Produkten in Berührung gekommen und hat von ihnen profitiert. Denn nicht nur Medikamente, sondern auch alltägliche Dinge wie z. B. die im Waschmittel enthaltenen Enzyme zum Lösen von Flecken bei niedrigen Temperaturen, sind Produkte der Biotechnologie (Renneberg, 2006, S. 37).

## 1.2. Richter-Helm BioLogics

Die vorliegende Arbeit wurde bei Richter-Helm BioLogics in der Abteilung Forschung und Entwicklung des Hamburger Standortes angefertigt. Richter-Helm BioLogics ist ein Biotechnologie-Unternehmen, das in den Betriebsstätten Hamburg, Hannover und Bovenau biopharmazeutische Arzneimittel unter GMP-Bedingungen entwickelt und herstellt. Auch die Entwicklung der Produktionsstämme für optimale Expression des gewünschten Produktes, wie rekombinanter Proteine oder Plasmid-DNA, kann bei Richter-Helm BioLogics beauftragt werden. Unter Umgebungsbedingungen der höchsten Reinheitsklasse kann dann Zellbankmaterial hergestellt werden. Eine MCB stammt von einer einzigen Kolonie ab, WCBs werden aus MCBs abgeleitet und können als Inokulum für Fermentationsprozesse dienen. Dieser kann bei Richter-Helm BioLogics in GMP-Produktionsanlagen von 1500 l durchgeführt werden. Ebenfalls bietet Richter-Helm BioLogics verschiedene Methoden zur Analyse produkt- und prozessbezogener Verunreinigungen, sowie Freigabeanalysen gemäß Arzneimittelgesetz an (Richter-Helm, 2013).

## 1.3. Zielsetzung

In dieser Arbeit soll eine Screeningmethode in Mikrotiterplatten entwickelt werden, mit der die Möglichkeit besteht, viele verschiedene Produkt-Vektor-Stamm-Kombinationen sehr rationell zu testen. Dafür werden die drei Proteine unterschiedlichen Molekulargewichtes in jeweils drei Vektoren kloniert und in je sechs Stämme transformiert. Anschließend soll pro Produkt ein "Best-Off-Candidate" identifiziert werden. Dieses Screening in Mikrotiterplatten stellt im Vergleich zu Versuchen im Schüttelkolben einen viel geringeren Arbeitsaufwand dar und ist daher deutlich lukrativer für ein kommerziell arbeitendes Unternehmen.

In der unten stehenden Abbildung 1.1 ist der Arbeitsablauf für eine Produkt-Vektor-Stamm-Kombination dargestellt. Falls die DNA noch nicht kloniert vorliegt, werden der Klonierungsvektor, sowie das im Transportvektor integrierte Insert mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut. Nach der Auftrennung im Agarosegel erfolgt die Extraktion der entsprechenden Banden aus dem Gel. Die isolierte, linearisierte DNA wird anschließend zu einem intakten, zirkulären Plasmid ligiert und in kompetente DH10B-Zellen transformiert. Die erfolgreiche Klonierung wird mittels pDNA-Isolierung und anschließender Restriktionsanalyse bestätigt, und die positive DNA dann in die jeweiligen Expressionsstämme transformiert.

Anhand der durchgeführten Expressionstests lässt sich dann eine Aussage über die Expressionsleistung der jeweiligen Kombinationen treffen. Ist keine Expression erkennbar, erfolgt die Fehlersuche um einen möglichen Verlust des Expressionsplasmids auszuschließen. Weitere Tests sollen eine Ursache auf analytischer Ebene ausschließen, so dass der Grund für fehlende Expression aus der Kombination resultieren muss.

Um rekombinante Proteine mit hoher Ausbeute produzieren zu können, werden also geeignete Kombinationen aus Produkt, Vektor und Stamm benötigt. In der folgenden Arbeit sollen die Eigenschaften der Stämme (Genotypen), Vektoren (Promotor) und Produkte (Molekulargewicht) in Bezug auf die Expressionsleistung beurteilt werden. Spielen diese Eigenschaften eine Rolle? Lässt sich vorhersagen, welches System oder welcher Faktor für eine Produktgröße besonders gut geeignet oder ungeeignet ist?

Desweiteren wird die Reproduzierbarkeit eines Ergebnisses getestet. Weitere Parameter wie die Geometrie der Wells oder das Wachstumsverhalten werden auch untersucht. Um die Expressionsleistung besser beurteilen zu können wird eine Quantifizierung durchgeführt. Daraus lässt sich der Produktausbeutekoeffizient  $y_{p/x}$ , sowie die auf die End-OD des Expressionskultur bezogene absolute Ausbeute berechnen.

Ebenfalls soll durch diese Arbeit gezeigt werden, ob solch eine Screening-Methode notwendig und sinnvoll ist. Gibt es bei dieser Methode Hindernisse oder Optimierungsmöglichkeiten?

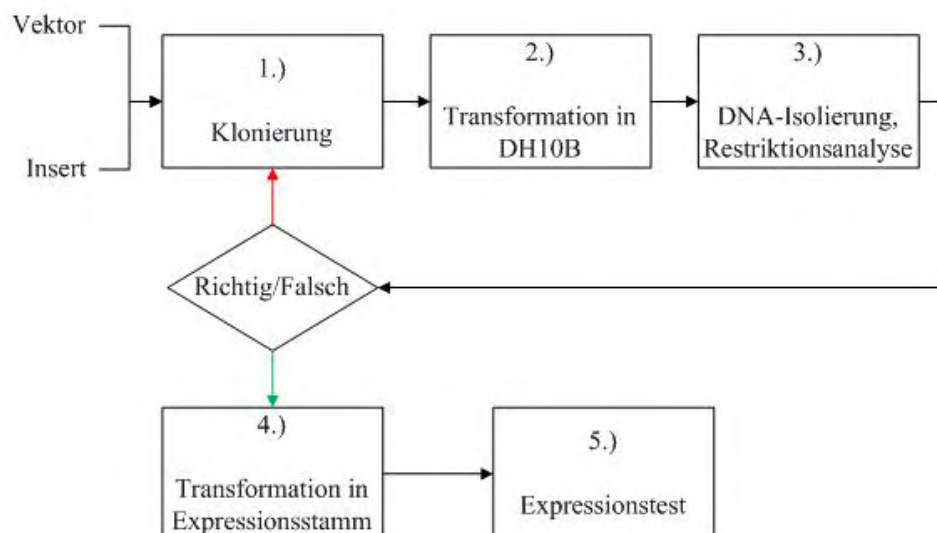


Bild 1.1.: Fließdiagramm des Arbeitsablaufs

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Stämme

#### 2.1.1. Escherichia coli

Bakterien sind die Arbeitspferde in molekularbiologischen und biotechnologischen Laboren. Am häufigsten wird dabei das stäbchenförmige Bakterium *Escherichia coli* (*E.coli*) verwendet. Es ist ein gramnegatives, zwischen 1 und 2  $\mu\text{m}$  langes und ca. 0,6  $\mu\text{m}$  breites Bakterium, welches normalerweise im Darm von Säugetieren vorkommt. Es gehört zu den Prokaryoten und besitzt daher weder Zellkern noch Kernhülle, sein Genom liegt frei zugänglich im Cytoplasma vor. Für die Fortbewegung besitzt es ca. 10 Flagellen auf der äußeren Zelloberfläche, neben den zahlreichen Pili, welche der Oberflächenhaftung dienen.

Bakterien haben viele, für die Forschung vorteilhafte Eigenschaften. Dazu zählt z. B. die unkomplizierte und leichte Anzucht einer Bakterienkultur. Sie lässt sich innerhalb weniger Stunden bis zu einer Zellkonzentration von  $10^9$  Bakterienzellen pro Milliliter anziehen, wobei sich das Wachstum über die Menge und Art der Nährstoffe, sowie die Temperatur, Wachstumszeit und den Sauerstoffeintrag genau einstellen lässt. Die Flüssigkulturen lassen sich problemlos über einen langen Zeitraum hinweg bei ca.  $-80^\circ\text{C}$  lagern, so dass ein Vorrat verschiedener Produkt-Vektor-Stamm-Kombinationen ständig zur Verfügung stehen kann. In der Zellsuspension weisen alle Bakterien ein identisches Genom auf, da die Tochtergenerationen Kopien der Elterngenerationen darstellen. Das ringförmige Chromosom mit ca. 4000 Genen liegt also in jeder Zelle vor. Aber auch die enthaltenen Plasmide werden vor der Zellteilung verdoppelt und dann an die Tochterzelle weitergegeben (Clark u. Pazdernik, 2009, S. 8-10).

Eine Kultivierung in Schüttelkolben oder Mikrotiterplatten, bei der keine Zufütterung von Substrat erfolgt, wird als Batch-Kultur bezeichnet. Eine typische Wachstumskurve solch einer Kultivierung lässt sich von Zellen wie *E.coli* in verschiedene Phasen unterteilen (siehe Abbildung 2.2). Zu Beginn ist der Metabolismus der Zellen herunter reguliert und nicht benötigte Stoffwechsellzyme sind abgebaut. In der so genannten lag-Phase setzen dann die Regulationsprozesse ein. Die Bakterien passen sich in dieser Phase an die vorhandenen Umgebungsbedingungen an und bilden die für den Transport und die Verwertung der angebotenen Substrate benötigten Enzyme. Dadurch kommt es nur in geringem Maße zur Zellteilung und Zunahme von Biomasse.

Haben sich die Zellen an die Medienkomponenten und Wachstumsbedingungen adaptiert, findet der Übergang in die exponentielle Phase statt, in der sich die Zellen mit konstanter und maximaler Wachstumsrate  $\mu_{max}$  vermehren (Cypionka, 2010, S. 110).

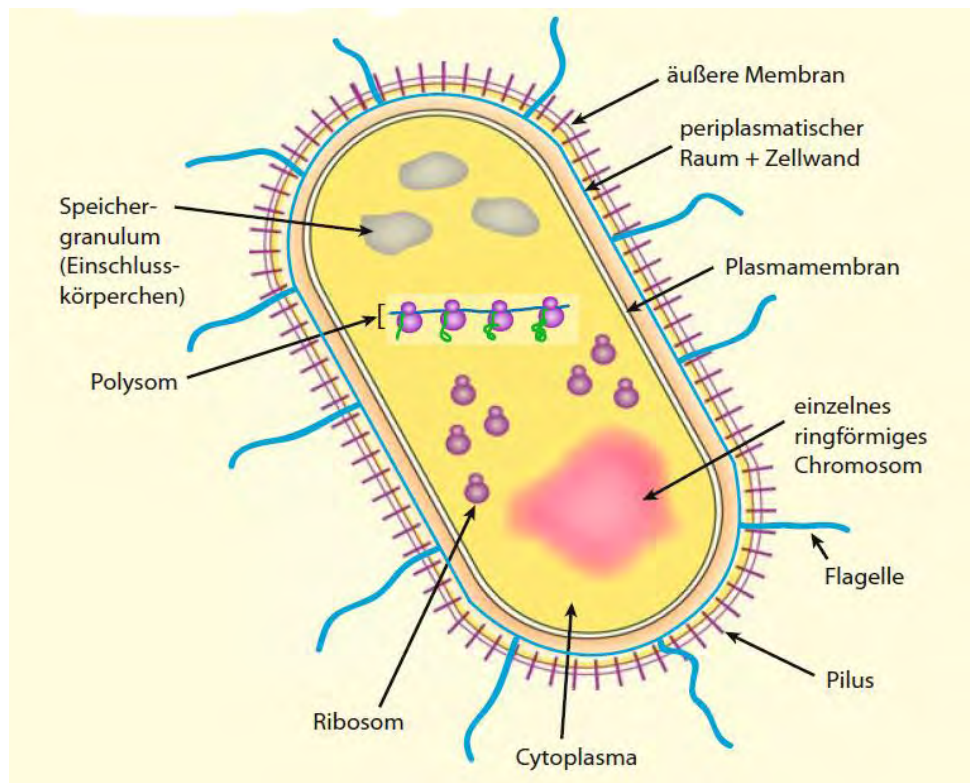


Bild 2.1.: Aufbau einer E.coli Zelle. Aus (Clark u. Pazdernik, 2009, S. 9)

Diese Vermehrungsrate hängt sowohl von der Art des Organismus, als auch von äußeren Umgebungsbedingungen ab. Dazu zählen z.B. Nährstoffangebot wie Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle, Temperatur, pH-Wert und die Sauerstoffkonzentration im Medium. Unter optimalen Bedingungen können sich manche Bakterien alle 20-30 Minuten verdoppeln (Chmiel, 2011, S. 16).

Realistischer ist jedoch eine Verdopplungszeit von ca. 45 Min im Schüttelkolben.

Durch Einsetzen einer Limitierung oder Metaboliteninhibierung kommt es am Ende der exponentiellen Phase zu einem verringerten Anstieg der Biomassekonzentration. Dabei stellen sich die Zellen auf eine erneute Periode des Hungerns ein, wenn sie merken, dass Substrat zur Neige geht.

In der anschließenden stationären Phase bleibt die Zellkonzentration konstant, da die Anzahl der neu gebildeten Zellen identisch ist mit der Zahl der Abgestorbenen. Darauf würde eine Absterbephase folgen (hier nicht abgebildet), in der die Zellteilung zum Erliegen kommt und die Anzahl lebensfähiger Zellen somit negativ exponentiell abnimmt (Cypionka, 2010, S. 110), (Antranikian, 2006, S. 241).

Die nachfolgend genannten Stämme, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, stellen Derivate vom *E.coli* Wildtyp dar. Durch Veränderungen der Genotypen erzielen verschiedene Stämme unterschiedliche Expressionsleistungen. Bei der Verwendung des Vektors

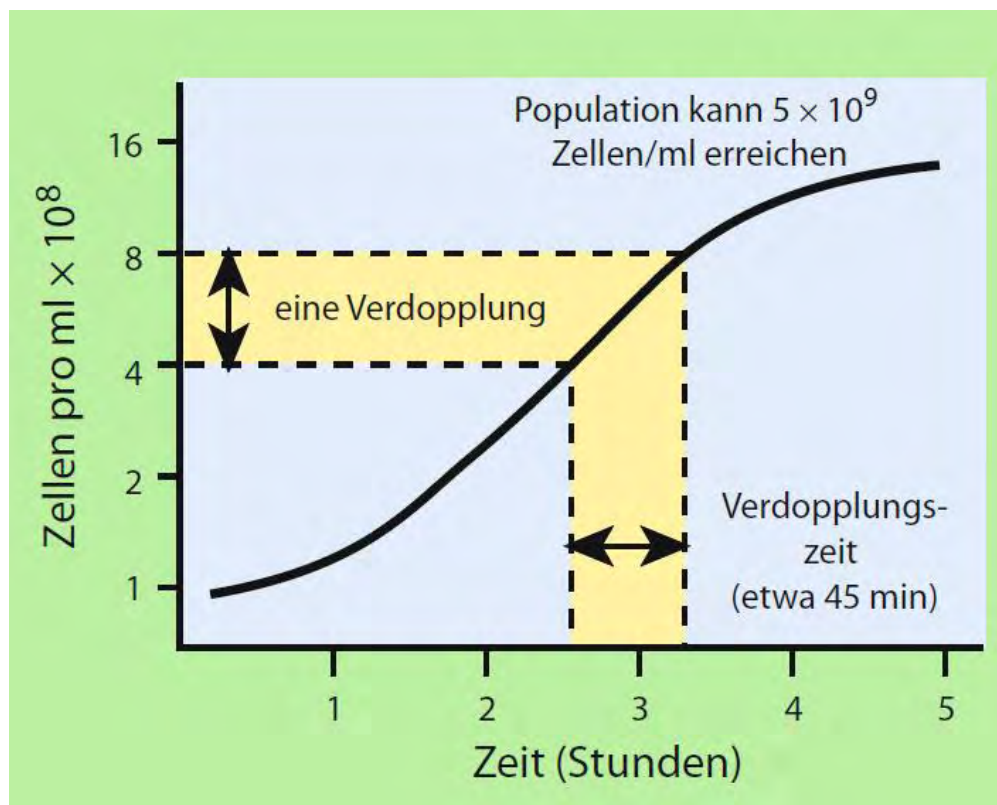


Bild 2.2.: Typische Wachstumskurve von Bakterien. Aus (Clark u. Pazdernik, 2009, S. 10)

ist auf die Kompatibilität mit dem jeweiligen Wirtsstamm zu achten.

### 2.1.2. NEB-Stämme für T7-Expression

Für das T7-Expressionssystem wurden folgende Stämme verwendet:

- C2566
- C3010
- C3029
- C3030

Nachfolgend werden die modifizierten Gene der verwendeten Zelllinien beschrieben, welche für die Expression relevant sind. Die jeweiligen Kombinationen der Genotypen für die einzelnen Stämme sind in der Tabelle 2.1 dargestellt.

- **lacZ::T7 gene1**

Das Gen der T7 RNA Polymerase ist im *E.coli* Chromosom integriert und wird unter Kontrolle des lac-Promotors exprimiert. Diese Anordnung ermöglicht die Kontrolle über die Polymerase und somit über die stromabwärts der von ihr erkannten T7 Promotoren auf dem Plasmid gelegenen Gene.

- **[lon] ompT**  
Falsch gefaltete Proteine werden durch die Ion-Protease abgebaut und gleichzeitig schützt sie spezifische Zellzyklusproteine vor dem Akkumulieren. Die Omp-Protease befindet sich auf der Oberfläche von Wildtyp-*E.colis* und ist vermutlich am Ableiten von Aminosäuren aus der Umgebung beteiligt. Zellen, die bezüglich beider Proteasen defizient sind, sind empfänglicher für die Produktion rekombinanter Proteine, da sie durch die Proteasen nicht abgebaut werden können.
- **lysY**  
Dieser Stamm exprimiert das T7-Lysozym, welches die Fähigkeit besitzt, die T7-Polymerase zu inhibieren. Die Expression des Zielgens ist dadurch minimiert, solange keine IPTG-Induktion stattgefunden hat. Das lysY Gen wird auf einem single-copy miniF Plasmid übertragen.
- **DsbC**  
Zur Verbesserung der Proteinfaltung hilft zusätzlich die Isomerase DsbC. Diese begünstigt die Korrektur von falschen Disulfidbrücken in Proteinen in ihre richtige Faltung. Darüberhinaus fungiert die cytoplasmatische DsbC auch als Chaperon, und hilft dabei, Proteine zu falten, die keine Disulfid-Brücken benötigen.
- **$\Delta$ gor und  $\Delta$ trxB**  
Normalerweise sorgen Reduktasen im Cytoplasma für ein reduzierendes Milieu, so dass die Cysteine keine Disulfidbrücken ausbilden können. In diesem Stamm wurden die Glutaredoxin Reduktase sowie die Thioredoxin Reduktase deletiert, was eine Ausbildung der Disulfidbrücken im Cytoplasma ermöglicht. Dadurch kommt es zur Produktbildung in löslicher Form.

(New England Biolabs GmbH, 2013)

Tabelle 2.1.: Genotypenübersicht der NEB-Stämme

Genotyp	C2566	C3010	C3029	C3030
lacZ::T7 gene1	+	+	+	+
[lon] ompT	+	+	+	+
lysY	-	+	-	+
DsbC	-	-	+	+
$\Delta$ gor und $\Delta$ trxB	-	-	+	+

Desweiteren wurden folgende, von Richter-Helm BioLogics entwickelten Stämme verwendet.

- RHB T7<sub>wt</sub>
- RHB T7<sub>red1</sub>

Beide haben ein chromosomal integriertes T7-RNA-Polymerasegen 1 und sind somit für die T7-Expression geeignet. Desweiteren sind die defizient in der ompT-Protease. Der RHB T7<sub>red1</sub> unterscheidet sich vom Wildtyp durch eine defiziente Reduktase.

### 2.1.3. ATCC-Stämme ohne T7-System

Für die Expression ohne T7-System sind die verwendeten Stämme nachfolgend aufgelistet, sowie die relevanten Genotypen beschrieben.

- BL21
- JM109
- MM294
- HMS174

In der Tabelle 2.2 werden die Kombinationen der Genotypen für die einzelnen Stämme gezeigt.

- **hsdS**( $r_b^-$ ,  $m_b^-$ )  
Dies stellt Defekte im EcoKI- Restriktionssystem dar, wodurch die Methylierung und Restriktion bestimmter Sequenzen verhindert wird.
- **ompT**  
In der äußeren Zellmembran ist die Serinprotease ompT (outer membrane protein T) lokalisiert. Wird beim Zellaufschluss die Zellintegrität zerstört, gelangen rekombinante Proteine in ihren Wirkungsbereich und können dadurch abgebaut werden. Daher tragen viele Expressionstämmen eine ompT-Mutation, was die Ausbeute an intakten, rekombinanten Proteinen steigert.
- **F-**  
Durch diese Mutation besitzt der Stamm kein F-Plasmid und ist somit nicht in der Lage zur Konjugation.
- **recA**  
Durch ein defektes Rekombinationssystem findet keine homologe Rekombination statt. Dies ist wichtig für das Einschleusen von DNA mit Sequenzwiederholungen.
- **relA1**  
Zellen bilden keinen stringenten Faktor, was dazu führt, dass die RNA Synthese auch bei blockierter Proteinsynthese stattfinden kann.

(Antranikian, 2006, S. 85-88), (Jansohn u. Rothhämel, 2012, S. 20)

Tabelle 2.2.: Genotypenübersicht der ATCC

Genotyp	BL21	JM109	MM294	HMS174
hsdS( $r_b^-$ , $m_b^-$ )	+	-	-	-
ompT	+	-	-	-
F-	+	-	+	+
recA1	-	+	-	+
relA1	-	+	-	-

Bei den ebenfalls verwendeten Wildtypstämmen *Escherichia coli* ATCC® 23226 und *Escherichia coli* ATCC® 23848 sind alle verwendeten Wildtypmerkmale vorhanden und keine Gene mutiert oder deletiert. Im Folgenden werden Stämme nur noch wt23226 und wt23848 genannt.

#### 2.1.4. Klonierungsstamm

Zur Amplifikation der klonierten DNA wurde der gängige Klonierungsstamm DH10B (*E.coli*) verwendet. Dieser enthält eine Reihe von Mutationen, welche die Aufreinigung qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA ermöglichen. Dadurch ist er für die Vervielfältigung von pDNA gut geeignet, spielt bei den Expressionstests sonst aber keine Rolle.

## 2.2. Vektoren

### 2.2.1. Allgemeiner Aufbau

Prokaryoten besitzen neben dem Chromosom oft auch ein oder mehrere Plasmide. Das sind kleinere, ebenfalls ringförmige DNA-Moleküle, auf denen zusätzliche Informationen, die für die Vermehrung der Zellen nicht essentiell sind, codiert sind. Dabei könnte es sich beispielsweise um Resistenzen gegen Antibiotika (Cypionka, 2010, S. 19) oder um die Fähigkeit zur Colicin-Bildung handeln (Clark u. Pazdernik, 2009, S. 11).

Im Labor werden so genannte Klonierungsvektoren verwendet, welche modifiziert wurde und daher in sich mehrere Vorteile vereinigen: Sie sind leicht zu isolieren, lassen sich mit hoher Effizienz transformieren, besitzen geeignete Marker zur Selektion positiver Klone und sie lassen sich für die Klonierung von bis zu 8kb großen Fragmenten verwenden.

Jedes Plasmid besitzt eine DNA-Sequenz, welche als Replikationsursprung fungiert. Dies ermöglicht der Zelle, das Plasmid unabhängig vom Chromosomen zu kopieren. Je nach Anzahl der Kopien unterscheidet man dann zwischen low und high copy plasmid.

Desweiteren besitzen Klonierungsvektoren meist eine oder mehrere Antibiotikaresistenzen, welche als Marker für Zellen verwendet werden, die das Plasmid enthalten. Außerdem dient ein Selektionsdruck dem Schutz vor Abbau des Plasmides, und verhindert gleichzeitig Kontaminationen mit nicht resistenten Keimen.



Die für Klonierungen verwendeten Vektoren enthalten ebenfalls eine Region namens Polylinker oder Multiple Cloning Site (MCS), wobei es sich um eine kurze Sequenz aus einer Reihe von Restriktionsschnittstellen handelt. Somit lässt sich das Plasmid mit mehreren verschiedenen Restriktionsenzymen schneiden und erhöht die Möglichkeit der Anwendung.

In einem Expressionsvektor stellt der Promotor den wichtigsten Teil dar. Er ermöglicht die Genregulation, da er nach Induktion die Transkription und anschließende Translation in Gang setzt. Desweiteren bestimmt er auch über die Transkriptionsgeschwindigkeit. Bei der Genregulation werden zwei Formen unterschieden, die Positive und die Negative. In diesem Fall wird ein Expressionssystem mit negativer Genregulation verwendet. Dabei bindet ein Repressor an die DNA, welcher sich durch ein von außen kommendes Signal löst und somit die Transkription ermöglicht. Der Repressor könnte aber auch in Gegenwart des Signals an die DNA binden und sich lösen, wenn das Signal verschwindet, so dass dann die Transkription erfolgen kann. Durch das chemische/physikalische Induktionssignal verändert sich die Konformation des Repressors, so dass seine Bindung an die DNA verhindert wird. Aus dem Einfluss auf den Promotor durch die Wechselwirkungen von Repressor/Operator, resultiert der Einfluss auf das Produkt.

Bei den in Laboratorien verwendeten Klonierungsvektoren handelt es sich um nichtkonjugative Plasmide, das heißt sie können keine natürliche Konjugation durchführen und sind daher nicht mehr in der Lage für ihren Transport in eine andere Bakterienzelle zu sorgen. Dadurch können keine rekombinanten Moleküle in andere Wildpopulationen von *E.coli* übergehen und beispielsweise Antibiotikaresistenzen verbreiten (Brown, 2011, S. 12, 80-83, 2008-2009).

### 2.2.2. pHI

Der pHI ist ein 3288 bp großer Vektor, mit einem hitzeinduzierbaren Promotor. Dazu zählt zum Beispiel der Lambda-Promotor.

Dieser stammt aus dem Lambda-Phagen und ist normalerweise nur während des lytischen Zyklus des Phagen aktiv. Während des lysogenen Zyklus wird er durch ein Produkt des Phagengens (Repressor Hitze) reprimiert. Ein Teil des Gens wurde so verändert, dass bei 28°C ein intaktes und bei 42°C ein defektes, also inaktives Repressorprotein vorliegt. Somit kann durch eine Temperaturerhöhung auf ca. 42°C induziert werden und die Transkription am Promotor und nachfolgender Gene erfolgen (Prave u. a., 1994, S. 865). Dabei handelt es sich nach (Brown, 2011, S. 210-211) um einen sehr starken Promotor.

Der Replikationsursprung Ori stammt aus einem der ersten entwickelten Klonierungsvektor pBR322. Desweiteren enthält der pHI eine Resistenz gegen Kanamycin zur Selektion der positiven Transformanten. In der Plasmidkarte 2.3 enthält der Vektor ebenfalls das 830 bp große Insert für das Hormon. Außerdem enthält er Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme.

Bei dem pHI handelt es sich um eine Eigenentwicklung von Richter Helm BioLogics

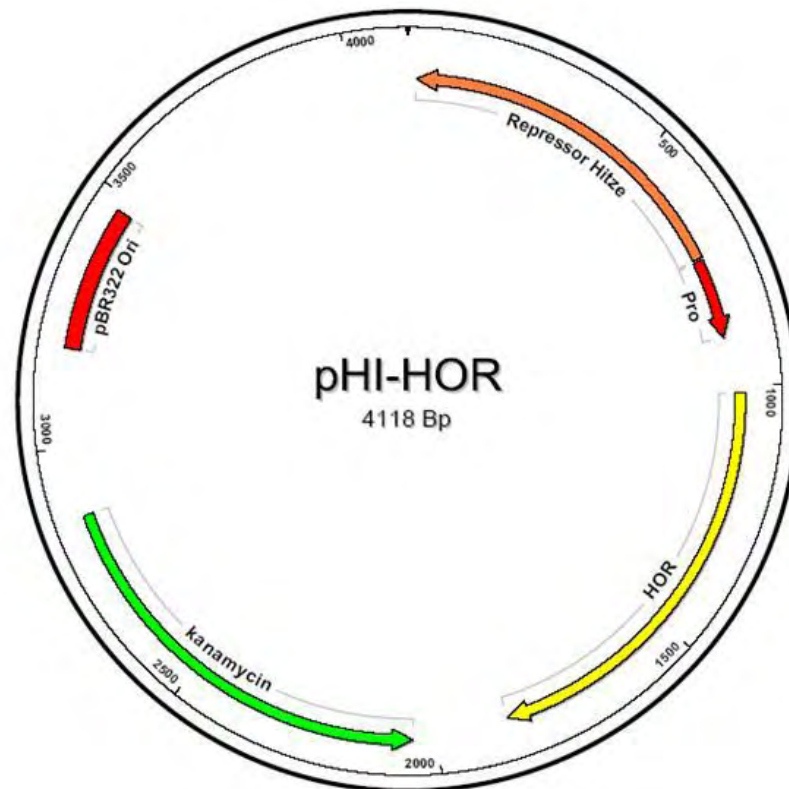


Bild 2.3.: Plasmidkarte von pHI mit Hormon.

### 2.2.3. pIPTG\_T5

Der pIPTG\_T5 ist ebenfalls eine Eigenentwicklung aus dem Hause Richter Helm BioLogics und stellt einen 3857 bp großen Vektor dar, welcher mit Hilfe von IPTG induziert wird. Bei dem Promotor handelt es sich um einen T5-Promotor aus dem Coliphagen T5.

Neben dem ebenfalls aus pBR322 stammenden Ori enthält dieser Klonierungsvektor auch eine Kanamycinresistenz, sowie zum Klonieren geeignete Restriktionsschnittstellen.

### 2.2.4. pET26b(+)

Der Klonierungsvektor pET26b(+) ist ein Produkt der Firma Novagen bzw. Merck Millipore und besteht aus 5360 Basenpaaren.

Auch dieser Vektor enthält eine Resistenz gegen Kanamycin, den Ori aus pBR322, sowie eine MCS. Der entscheidende Unterschied ist der T7-Promotor.

Voraussetzung für dieses Expressionssystem ist das Vorhandensein des Gens für die vom Bakteriophagen T7 codierte T7-RNA-Polymerase. Diese ist im Chromosom der mit dem Expressionssystem kompatiblen Stämmen integriert. Oberhalb dieses Gens befindet sich z.B. ein lac-Promotor. Durch die Zugabe von IPTG wird die Synthese der T7-Polymerase aktiviert. Der pET26b(+)-Vektor enthält einen RNA-Polymerase spezifischen

Promotor. Das heißt, an dessen Bindungsstelle für die RNA-Polymerase bindet nur die chromosomal integrierte RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7.

Wird mit IPTG die Synthese der T7 RNA-Polymerase aktiviert, kommt es durch ihre Anwesenheit ebenfalls zur Transkription und nachfolgenden Translation des Inserts (Brown, 2011, S. 211). Es handelt sich somit um eine indirekte Induktion des Gens, welches in den T7 Expressionsvektor kloniert wurde .

(Merck KGaA, 2013)

In der in Abbildung 2.4 dargestellten Plasmidkarte enthält der Vektor zusätzlich das Gen für das Zytokin und ist somit ca. 400 bp größer.

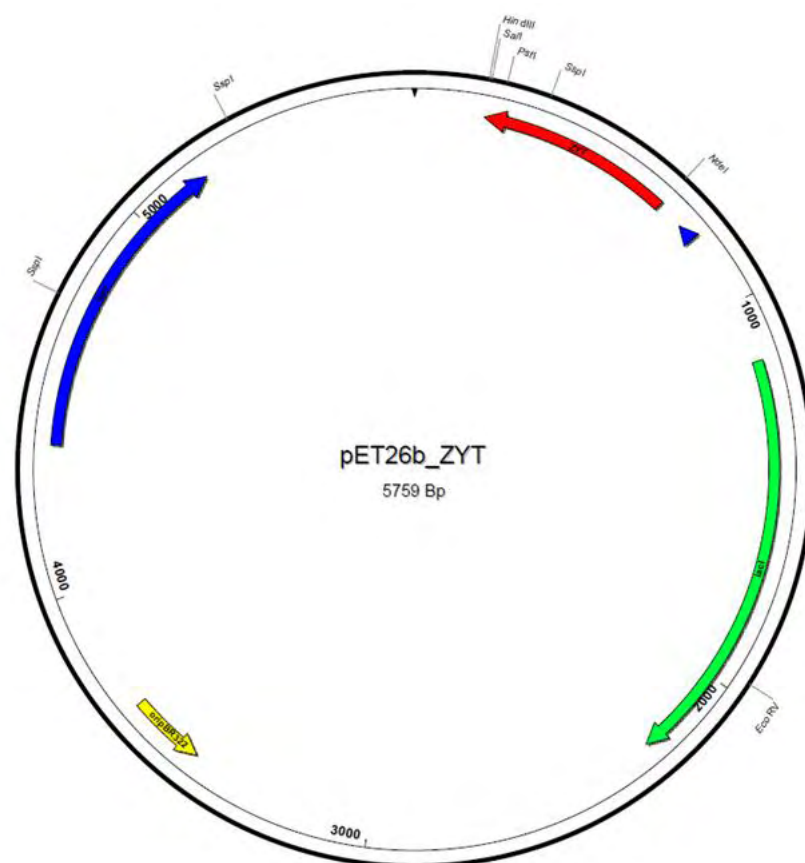


Bild 2.4.: Plasmidkarte von pET mit Zytokin.

## 2.3. Produkte

Unter Rekombination versteht man die Umordnung von Genen oder Genteilen, welche aus zwei oder mehr Organismen stammen (Renneberg, 2006, S. 60).

Viele Erkrankungen des Menschen sind auf die fehlerhafte Funktion oder die Abwesenheit von Proteinen zurückzuführen. Die Zufuhr des Proteins (in richtiger Form) stellt meist die Therapie dieser Krankheiten dar, wofür das Protein jedoch in recht großen Mengen verfügbar sein muss. Daher spielen rekombinante Proteine in der Arzneimittelproduktion eine entscheidende Rolle. Es werden nicht nur Proteine zur Krankheitsbehandlung produziert, welche fehlerhafte Moleküle ersetzen oder ergänzen, sondern auch eine Reihe anderer Produkte. Dazu zählen bspw. Wachstumsfaktoren welche in der Krebstherapie Verwendung finden, aber auch Impfstoffe werden aus rekombinanten Proteinen hergestellt (Brown, 2011, S. 224-230).

Die nachfolgende Tabelle 2.3 liefert einen kleinen Ausschnitt von menschlichen, rekombinant hergestellten Proteinen und ihre Behandlungsfelder.

Tabelle 2.3.: Rekombinant hergestellte Proteine und ihre Anwendungsgebiete. Verändert nach (Brown, 2011, S. 229)

Protein	Behandlungsgebiet
Follikelstimulierendes Hormon	Unfruchtbarkeit
Insulin	Diabetes
Fibroblastenwachstumsfaktor	Magengeschwür
Interleukine	Krebs, Immunstörungen
Interferon alpha	Leukämie und andere Krebsformen
Erythropoietin	Anämie

Bei der Produktion eukaryotischer Proteine in Prokaryoten sind einige Regeln zu beachten, da sonst zahlreiche Probleme auftreten können.

1. *E.coli* ist nicht in der Lage mRNA zu spleißen, so dass das fremde Gen keine Introns enthalten darf.
2. Enthält das Insert eine Sequenz, die der Terminationssequenz von *E.coli* ähnelt, kommt es zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und es findet keine Genexpression mehr statt.
3. Der genetische Code ist zwar bei allen Lebewesen praktisch gleich, jedoch bevorzugen verschiedene Organismen für dieselbe Aminosäure unterschiedliche Codons. Beispielsweise codieren sowohl AAA als auch AAG die Aminosäure Lysin, wobei in *E.coli* 75% AAA und nur 25% AAG Verwendung finden. Durch den Gebrauch des selteneren Codons herrscht unter Umständen ein Mangel an tRNA, wodurch die Proteinsynthese deutlich verlangsamt wird.
4. Proteine höherer Lebewesen durchlaufen nach der Translation noch eine chemische Modifikation, damit sie ihre biologische Funktionalität gewinnen. Dazu zählen z. B.

Glykosylierungen, bei der Zuckerketten angefügt werden. *E.coli* ist dazu jedoch nicht im Stande und verarbeitet daher rekombinante Proteine meist nicht richtig weiter.

5. Außerdem werden rekombinante Proteine in *E.coli* Zellen oft nicht richtig gefaltet und die Disulfidbrücken bilden sich nicht aus. Dadurch bleiben die Proteine meist unlöslich und bilden so genannte Einschlusskörper. Diese müssen daraus dann isoliert und die richtige Faltung der Proteine nachgeholt werden.
6. In *E.coli* findet manchmal ein Abbau rekombinanter Proteine statt, da sie als fremd erkannt werden.

(Brown, 2011, S. 221-215), (Clark u. Pazdernik, 2009, S. 299)

Bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen werden häufig Fusionsproteine verwendet, was viele Vorteile mit sich bringt. Für so ein Fusionsprotein werden die codierenden Sequenzen zweier Proteine unter Berücksichtigung des Leserasters verknüpft, woraus nach der Translation ein einzelnes längeres Polypeptid entsteht. Dieses beinhaltet dann das Zielprotein an welches die Fusion gekoppelt ist.

Durch so eine Fusion lassen sich nicht nur die Probleme der Stabilität oder Reinigung bewerkstelligen, sie kann auch den Transport aus der Zelle ermöglichen. Handelt es sich bei der Fusion am N-terminalen Ende um ein Protein, welches normalerweise sezerniert wird, so wird auch das Fusionsprotein ausgeschieden.

Viele eukaryotische Proteine wie Wachstumsfaktoren, Hormone oder regulatorische Peptide sind in Bakterien instabil, da sie zu klein sind um eine beständige, dreidimensionale Form anzunehmen. Befindet sich jedoch am N-Terminus ein stabiles Bakterienprotein, wird das ganze Fusionsprotein vor dem Abbau geschützt (Clark u. Pazdernik, 2009, S. 304).

Der bakterielle Abschnitt des Fusionsproteins kann auch die Reinigung erleichtern, wenn er wie z. B. mit einem His-Tag, die Isolierung des Proteins mittels Affinitätschromatographie ermöglicht. Nach der Aufreinigung muss die Fusion jedoch wieder vom Zielprotein entfernt werden (Brown, 2011, S. 212).

### 2.3.1. Hormon

Hormone sind biochemische Signalstoffe, die von spezialisierten Körperzellen produziert und abgegeben werden. Sie gelangen und binden an Rezeptoren, die auf oder in der Zielzelle befindlich sind, wodurch eine zelluläre Antwort ausgelöst wird. Hormone dienen also dazu, Informationen im Körper zu transportieren und eine Signaltransduktion auszulösen (Königshoff u. Brandenburger, 2007, S. 195).

Das in dieser Arbeit verwendete Hormon ist zusammen mit einer Fusion ein verhältnismäßig großes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa.

### 2.3.2. Prähormon

Als Prähormon wird eine inaktive Vorstufe eines Hormons bezeichnet, welche modifiziert werden muss, um seine Funktionalität zu erhalten. Die Sequenz des Prähormons beinhaltet z. B. zusätzlich zur Hormonsequenz weitere Sequenzen, welche nach der Expression entfernt werden (Ganten u. Ruckpaul, 2008, S. 489), (Freissmuth u. a., 2012, S. 153).

In dieser Arbeit handelt es sich um ein kleines Protein mit einer Größe von lediglich ca. 10 kDa.

### 2.3.3. Zytokin

Zytokine stellen eine Gruppe von hormonähnlichen Peptiden/Proteinen dar. Sie wirken als Botenstoffe zwischen verschiedenen Zellen und dienen somit der Signaltransduktion. Aufgrund ihrer Funktion werden sie in vier verschiedene Gruppen unterteilt.

Die *Interleukine* werden von Zellen sezerniert und nehmen bei der Kommunikation zwischen den Zellen eine zentrale Stellung ein. Sie dienen somit der Regulation des Immunsystems.

Nahe Verwandte der Interleukine sind die *Interferone*, welche durch Bindung an Zellrezeptoren eine immunstimulierende, hauptsächlich antivirale und -tumorale Wirkung hervorrufen (Königshoff u. Brandenburger, 2007, S. 340-341).

Die *Chemokine* stellen eine Gruppe von Faktoren dar, welche bei Zellen eine Migration, also Wanderungsbewegung auslösen, und an verschiedenen Phasen der Immunantwort beteiligt sind (Freissmuth u. a., 2012, S. 160).

Die *Wachstumsfaktoren* sind nicht nur im Immunsystem involviert, sondern wirken auch außerhalb. Bspw. bei der Hämatopoese, wo sich pluripotente Stammzellen weiter entwickeln (Königshoff u. Brandenburger, 2007, S. 296, 341).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Zytokin handelt es sich um ein ca. 20 kDa großes Protein, welches daher ein mittelgroßes Protein darstellt.

## 3. Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die angewendeten Methoden kurz theoretisch beschrieben, sowie die verwendeten Stoffe, Geräte und Materialien genannt. Desweiteren erfolgt eine genaue Beschreibung der Durchführung.

### 3.1. Allgemeine Materialien

Die bei den folgenden Methoden verwendeten allgemeinen Materialien und Einwegartikel sowie ihre Hersteller werden nachfolgend aufgelistet.

Tabelle 3.1.: Allmeine Materialien und Geräte

Material	Hersteller
1,5 m lReaktionsgefäße	Sarstedt
0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
1,8 ml Cryoröhrchen	nunc
13 ml PP Röhrchen	Sarstedt
Pipettenspitzen 10-1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen mit Filter 10-1000µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 20-1200µl	Rainin
Serologische Pipetten 5-25 ml	Sarstedt
Einmal-Drigalskyspatel	VWR
Einmal-Impfnadel	Sarstedt
96 Well-Platte	nunc
10-1000 µl Kolbenhub-Pipetten	Eppendorf
20 µl Kolbenhub-Pipetten	Rainin
Tischzentrifuge	Eppendorf
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus

### 3.2. Klonierung

#### 3.2.1. pDNA-Preparation

Die in Abschnitt 2.2 beschriebenen Vektoren stellen ein wichtiges Werkzeug in der Gentechnologie dar. Für die Durchführung von Klonierungen, aber auch zur Kontrolle und

Auswahl richtiger Klone, müssen Plasmide aus ihren Wirtszellen isoliert werden. Dies erfolgt mit den in Tabelle 3.3 genannten Komponenten.

Tabelle 3.2.: Zusammensetzung LB-Medium

Substanz	Konzentration	Hersteller
Hefeextrakt	0,5 %	OXOID
Natriumchlorid	1 %	Merck
Soja-Pepton	1 %	RHB

Tabelle 3.3.: Materialien für pDNA-Preparation

Substanz/ Gerät/ Material	Konzentration	Hersteller
LB-Medium	-	RHB
Kanamycin	50 µg/ml	Sigma-Aldrich
Gibco bidest. Wasser	-	invitrogen
QIAprep Spin Mini Kit	-	QIAGEN
Ethanol	100 %	Merck

Für optimale Ergebnisse bei der Isolierung von High-copy Plasmiden sollten 1,5 ml einer *E.coli* Kultur in LB-Medium (siehe Tabelle 3.2) mit einer maximalen Zelldichte von  $OD_{600} = 10$  verwendet werden. Die Kultivierung sollte unter Selektionsdruck erfolgen um zu verhindern, dass das Plasmid verloren geht.

1,5 ml einer 3 ml Übernachtskultur wird durch Kippen in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen transferiert. Die Zellen werden in der Tischzentrifuge bei 13000 rpm und Raumtemperatur für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Bei niedrigerer OD kann auch der Rest der *E.coli* Suspension in dasselbe Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert werden. Das Pellet wird in 250 µl Resuspendierungspuffer P1 (mit RNase A) mit einer Pipette vollständig resuspendiert. Anschließend erfolgt eine Zugabe von 250 µl Lysepuffer P2 und das Reaktionsgefäß wird 4-6 mal invertiert, um die Lösungen zu vermischen. Die Inkubation sollte nicht länger als 5 min erfolgen. Zur Neutralisation werden 350 µl Neutralisierungspuffer N3 hinzugegeben der ein chaotropes Salz in einer Konzentration enthält, welche die Adsorption von Nucleinsäuren an die Säule gewährleistet. Durch 4-6 maliges Invertieren werden die Lösungen gemischt. Das Lysat wird bei 13000 rpm und Raumtemperatur für 5 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der klare Überstand auf die Säule gegeben. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm wird das Abfallgefäß geleert und die Säule wieder hinein gestellt. Danach werden 750 µl Waschpuffer PE auf die Säule gegeben und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach Entleerung des Abfallgefäßes wird die leere Säule erneut für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um alle Reste des Ethanols zu entfernen. Die Säule wird in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und 50 µl aqua bidest wird für die Elution in die Mitte der Säule gegeben und diese 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Säule wird für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die eluierte DNA befindet sich danach gelöst im Reaktionsgefäß.



### 3.2.2. Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau wird mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Diese Restriktionsenzyme vom Typ II sind in der Lage DNA-Sequenzen zu erkennen und innerhalb dieser Erkennungssequenz immer an einer ganz bestimmten Stelle zu schneiden. Bei versetztem Schnitt innerhalb einer palindromen Sequenz entstehen klebrige Enden, die sich später leichter ligieren lassen. Dies ist für die Klonierung besonders wichtig, um DNA-Fragmente zu rekombinieren.

Tabelle 3.4.: Materialien für Restriktionsverdau

Substanz/ Gerät/ Material	Konzentration	Hersteller
FastDigest NdeI	-	Thermo Scientific
FastDigest Sall	-	Fermentas
10x FastDigest Green Buffer	-	Fermentas
Gibco bidest. Wasser	-	invitrogen
thermoStat plus	-	Eppendorf

Für die Restriktion sollte der genaue pDNA-Gehalt der Probe bekannt sein und pro Restriktionsansatz 500 ng Plasmid-DNA und 10 U Enzym eingesetzt werden. Ist die DNA-Konzentration jedoch nicht bekannt, wird die höchstmögliche Menge DNA-Lösung eingesetzt.

Daraus ergibt sich folgender Ansatz:

16 µl DNA + 2 µl 10x Green Buffer + 2 µl NdeI + 2 µl Sall

Der Ansatz wird durch Schnippen an die Gefäßwand gemischt und anschließend abzentrifugiert. Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgt für 1 h bei 37°C.

### 3.2.3. Gelextraktion

Eine Gelextraktion wird durchgeführt, wenn die DNA im Agarosegel aufgetrennt wurde und eine Bande daraus wieder isoliert werden soll. Die zu isolierende Bande wird möglichst exakt unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und in ein vorbereitetes Reaktionsgefäß gegeben. Beim Ausschneiden sollte man zügig vorgehen und die UV-Exposition so gering wie möglich halten um DNA-Schädigungen zu vermeiden. Die Ex-

Tabelle 3.5.: Materialien für Gelextraktion

Substanz/ Gerät/ Material	Konzentration	Hersteller
Gibco bidest. Wasser	-	invitrogen
thermoStat plus	-	Eppendorf
MinElute Gel Extraction Kit (250)	-	QIAGEN
Isopropanol	-	Merck
UV-Tisch INTAS	-	science imaging

traktion wird mit den oben in Tabelle 3.7 aufgelisteten Komponenten nach Anleitung des Kits durchgeführt. Bei Verwendung eines 1 %igen Agarosegels wird das dreifache Volumen des Gelfragments an QG Puffer zugegeben und 10 min lang bei 50°C und 300 rpm inkubiert, bis sich das Agarosefragment aufgelöst hat. Nach Zugabe von einem Gelvolumen Isopropanol wird das Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und die Lösung auf die MinElute Säule gegeben. Diese wird 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Erneut werden 500 µl QG-Puffer zum Waschen auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Der Durchfluss wird entsorgt und 750 µl Waschpuffer PE auf die Säule gegeben. Nach der Zentrifugation wird der Durchfluss verworfen und die leere Säule nochmals zentrifugiert, um die Reste des Puffers zu entfernen. Die MinElute Säule wird in ein sauberes Reaktionsgefäß gegeben und ca. 10 µl Wasser auf die Mitte der Membran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wird wieder zentrifugiert. Die gereinigte DNA befindet sich dann im Eluenten.

### 3.2.4. Ligation

Um die DNA-Moleküle des Vektors und des Inserts zu verbinden wird eine Ligation mit Hilfe der DNA-Ligase durchgeführt. Dieses Enzym kommt natürlicher Weise in Zellen vor, wo es z. B. Brüche in DNA-Strängen repariert. Durch die von den Restriktionsenzymen hervorgerufenen klebrigen Enden lagern sich die passenden Sequenzen zusammen. Die DNA-Ligase verknüpft die Stränge durch Bildung von Phosphodiesterbindungen.

Die Ligation erfolgt mit dem Rapid DNA Dephos Ligations Kit von Roche.

Da das Insert im Überschuss eingesetzt werden muss, wird folgender Ligationsansatz pipettiert, obwohl die DNA-Konzentrationen von Vektor und Insert nicht bekannt sind: 1 µl Ligase-Puffer + 8 µl Insert + 1 µl Vektor + 1 µl Ligase

Ebenfalls erfolgt eine Religationskontrolle mit Wasser statt Insert, um das Verhältnis von positiven Klonen zu Klonen mit religiertem Vektor beurteilen zu können.

Die Inkubation der beiden Ansätze erfolgt 5-60 min bei Raumtemperatur.

### 3.2.5. Transformation

Unter Transformation versteht man das Einschleusen fremder DNA in eine lebende Zelle. Nachfolgend wird die Methode der chemischen Transformation mittels Hitzeschock beschrieben.

Tabelle 3.6.: Zusammensetzung LB-Agar

Substanz	Konzentration	Hersteller
Hefeextrakt	0,5 %	OXOID
Natriumchlorid	1 %	Merck
Agar	1,5 %	Merck
Soja-Pepton	1 %	RHB

Die kompetenten Bakterien werden unmittelbar nach der Entnahme aus der Lagerstätte auf Eis aufgetaut. In ein vorgekühltes 1,5 ml-Reaktionsgefäßen werden dann 1-2 µl DNA oder der komplette Ligationsansatz mit ca. 70 µl kompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubieren. Der Transformationsansatz wird für den Hitzeschock für 45 s in den auf 42°C vorgeheizten Thermoblock gestellt und nach dem Hitzeschock sofort für 2 min auf Eis inkubiert. Zur Regeneration der Zellen erfolgt eine Zugabe von 600 µl LB-Medium, was für 30 - 60 min bei 37°C im Thermoblock bei ca. 800 rpm schüttelnd inkubiert wird. Die transformierten, regenerierten *E.coli* Zellen werden anschließend auf Selektions-Agarplatten (siehe Tabelle 3.6) ausgestrichen und bei 37°C für 18 - 24 h inkubiert.

Tabelle 3.7.: Materialien für Transformation

Substanz/ Gerät/ Material	Konzentration	Hersteller
thermoStat plus	-	Eppendorf
Brutschrank Omnilab	-	Heraeus
Isopropanol	-	Merck
LB-Agar	-	RHB
LB-Medium	-	RHB
Kompetente DH10B	-	CIP
Kompetente BL21	-	Novagen
Kompetente JM109	-	DSMZ
Kompetente MM294	-	ATCC
Kompetente HMS174	-	Novagen
Kompetente wt23226	-	ATCC
Kompetente wt23848	-	ATCC
Kompetente C2566	-	NEB
Kompetente C3010	-	NEB
Kompetente C3029	-	NEB
Kompetente C3030	-	NEB
Kompetente RHB T7 <sub>red1</sub>	-	RHB
Kompetente RHB T7 <sub>wt</sub>	-	RHB

## 3.3. Analysenmethoden

### 3.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, bei der DNA-Fragmenten nach ihrer Länge bzw. Größe aufgetrennt werden. Durch das Anlegen einer Gleichspannung an das Gel wird die negativ geladene DNA zum positiven Pol bewegt. Kleine DNA-Fragmente migrieren schneller durch die Poren des Gels als große DNA-Fragmente, welche im Agarosenetz hängen bleiben. Die DNA Proben werden mit Probenpuffer vorbereitet, der zum

Einen durch Zugabe einer Substanz wie Glycerin die Dichte der Probe erhöht, damit sich das Gel leichter beladen lässt. Zum Anderen, enthält er einen Farbstoff, durch den die Probe sichtbar wird und wodurch sich der Verlauf der Elektrophorese verfolgen lässt. Zur Identifikation der Banden werden die Gele mit einem interkalierenden Farbstoff gefärbt, welcher die DNA unter UV-Licht sichtbar macht.

Tabelle 3.8.: Materialien für Agarose-Gelelektrophorese

Substanz/ Gerät/ Material	Konzentration	Hersteller
Rotiphorese 50x TAE Puffer	1x	Roth
Gelkammer Sub Cell GT	-	BIO RAD
Stromquelle Power PAC 300/200	-	BIO RAD
Gelscanner ChemiDoc	-	BIO RAD
TAE Ready Mini Gels, 1 % Agarose plus Et-Br	-	BIO RAD
TAE Ready Wide Mini Gels, 1 % Agarose plus EtBr	-	BIO RAD
6 x Loading Dye Solution	-	Fermentas
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	-	Fermentas

Das Agarose-Fertigel wird mit dem Gel-Schlitten in die Elektrophoresekammer gelegt, wobei die Probenaschen zur Kathode zeigen. Der 1x TAE-Puffer wird bis zur Markierung in die Laufkammer gefüllt. Der DNA-Marker liegt bereits in Loading-Puffer vor und kann direkt auf das Agarosegel aufgetragen werden (ca. 5 µl). Das Volumen der Probenaschen beträgt bis 20 µl, so dass ein Restriktionsansatz pro Tasche komplett aufgetragen werden kann. Dieser enthält bereits einen Puffer, welcher die Aufgaben des Loading Dye erfüllt, so dass keine weitere Zugabe erfolgen muss. Gewöhnliche DNA-Proben werden mit mindestens 1/5 Volumen Loading-Puffer (6x-Puffer) gemischt. In der Regel werden pro Probenasche DNA-Mengen bis zu 1 µg aufgetragen. Beim Aufsetzen des Deckels ist auf den richtigen Anschluss von Kathode und Anode zu achten. Die elektrophoretische Trennung erfolgt je nach Fragestellung und Fragmentgrößen bei 90 V für ca. 60 min. Da Fertiggele bereits Ethidiumbromid enthalten, können sie ohne Färbung direkt ausgewertet werden.

### 3.3.2. OD-Messung

Nachfolgend wird die Bestimmung der Optischen Dichte (OD) an einem Aliquot einer Bakteriensuspension durch die Extinktion beschrieben. Diese, auf der Ermittlung der Trübung beruhende Methode, dient der Bestimmung der Zelldichte.

Die OD wird für Bakterienzellen bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Zunächst wird bei dieser Wellenlänge ein Nullabgleich durchgeführt, indem eine, mit dem verwendeten Medium gefüllte Küvette, als Referenz genutzt wird. Die zu messende Bakteriensuspension wird vor der Entnahme des Aliquots gemischt und in eine neue Einmal-Küvette gegeben. Sollte die Probe nicht sofort nach dem Einfüllen in die Küvette gemessen

Tabelle 3.9.: Materialien für OD-Messung

Substanz/ Gerät/ Material	Konzentration	Hersteller
Ultrospec 100 pro	-	Amersham Biosciences 100 pro
Multireader iEMS Reader MF	-	Labsystems

sen werden, muss sie vor der Messung nochmals resuspendiert werden. Desweiteren ist die Suspension vor der Messung auf die Freiheit von Luftblasen oder störende Partikel zu prüfen. Wird die Extinktion von 0,6 überschritten, so wird die Probe mit dem verwendeten Medium in geeigneter Weise verdünnt und die gemessene OD mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Die OD-Messung mit dem Multireader verläuft nach dem gleichen Prinzip, wobei in Mikrotiterplatten und nicht in Küvetten gemessen wird. Die genaue Durchführung mit Beispielrechnung wird in Kapitel 4.2 beschrieben.

### 3.3.3. BTM-Bestimmung

Tabelle 3.10.: Materialien für BTM-Bestimmung

Substanz/ Gerät/ Material	Konzentration	Hersteller
Ultrospec 100 pro	-	Ultrospec 100 pro
Trockenschrank	-	Köttermann
Waage AT 261 Delta Range	-	Mettler Toledo

Zur Bestimmung der BTM werden 1,5 ml Reaktionsgefäße beschriftet und mindestens 12 h bei 80°C getrocknet. Anschließend werden die 1,5 ml Reaktionsgefäße gewogen und ihr Gewicht notiert ( $Gewicht_{leer}$ ).

Das Ausgangsmaterial für die Bestimmung der Biotrockenmasse sind Bakteriensuspensionen. Diese wird mit definierter OD in 1 ml in die vorbereiteten Reaktionsgefäße pipetiert, die Zellen 10 min bei 13000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen.

Die Probengefäße mit dem Zellpellet werden für 24 h bei 80°C im Trockenschrank getrocknet und sofort nachdem Trocknen geschlossen. Anschließend werden sie im abgekühlten Zustand gewogen ( $Gesamtgewicht_{trocken}$ ).

Mit Hilfe folgender Formel wird die BTM berechnet:

$$BTM = (Gesamtgewicht_{trocken} - Gewicht_{leer}) \cdot 1000 \quad (3.1)$$

Mit: $BTM$	Biotrockenmasse	$\left[ \frac{g}{l} \right]$
$Gesamtgewicht_{trocken}$	Gesamtgewicht mit trockenem Zellpellet	$[g]$
$Gewicht_{leer}$	leeres Reaktionsgefäß	$[g]$

### 3.3.4. SDS-PAGE

Proteine tragen keine einheitliche Ladung und würden daher im elektrischen Feld zur Anode oder Kathode wandern. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine zunächst denaturiert und entfaltet. Das SDS bildet Micellen und maskiert damit die unterschiedliche Ladung des Proteins, so dass eine negative Nettoladung proportional zur Molekülgröße entsteht. Somit ist der Faktor Ladung ausgeschaltet und die Proteine können lediglich nach ihrer Größe getrennt werden.

Tabelle 3.11.: Zusammensetzung Solubilisierungspuffer

Substanz	Konzentration	Hersteller
Harnstoff	8 M	Merck
1,4-Dithiothreitol	50 mM	Merck
Tris-HCl	1 M	RHB

Die Zellpellets werden in einer bestimmten Menge Solubilisierungspuffer (Tabelle 3.11) resuspendiert, so dass die Probe auf OD = 10 eingestellt ist. Das Zellpellet einer Probe mit OD 3 in einem Milliliter benötigt für OD 10 also 300 µl Solubilisierungspuffer. Durch die Normierung wird das Gelbild einheitlicher und Überexpressionen lassen sich deutlicher erkennen.

Tabelle 3.12.: Materialien für SDS-PAGE

Substanz	Konzentration	Hersteller
Solubilisierungspuffer	-	RHB
NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X)	1x	Invitrogen
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	1x	Invitrogen
NuPAGE Sample Reducing Agent (10X)	1x	Invitrogen
NuPAGE Antioxidant	-	Invitrogen
NuPAGE Bis-Tris Midi Gel 4-12%	-	Invitrogen
NuPAGE Midi Gel Adapter	-	Invitrogen
protein molecular weight standards	-	Invitrogen
Gelkammer CRITERION	-	BIO RAD
Electrophoresis Power Supply	-	Amersham pharmacia biotech
Multipette plus	-	Eppendorf
Thermomixer comfort	-	Eppendorf

Vor Beginn der Untersuchung ist ein Pipettierschema zu erstellen, nach dem die Proben verdünnt und mit dem entsprechenden Solubilisierungspuffer sowie gegebenenfalls mit Reduktionsmittel versetzt werden. Zudem wird die Beladung des Gels mit den vorbereiteten Proben festgelegt. Je nach Art der Untersuchung ist mindestens ein Proteinstandard mitzuführen.

Die Proben werden nach erstelltem Pipettierschema mit entsprechenden Mengen Solubilisierungspuffer und Reduktionsmittel vermischt. Anschließend werden die Proben im Thermoblock für 10 min bei 95°C inkubiert. Die abgekühlten Proben werden danach für 1min bei 13000 rpm abzentrifugiert.

Das Bis-Tris Gel wird vorbereitet und in die Laufkammer gestellt. Diese wird mit 1x MES-Laufpuffer bis zur Markierung befüllt. Soll die Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt werden, so werden 0,5 ml Antioxidant in den mit Puffer gefüllten Adapter gegeben. Die Proben, sowie der Proteinstandard werden entsprechend des Beladungsplans in die Geltaschen pipettiert und der Deckel unter Berücksichtigung der Elektroden richtig aufgesetzt. Die Elektrophorese wird mit einer konstanten Spannung von 200 V für ca. 40 min durchgeführt bis sich die blaue Lauffront kurz vor dem unteren Gelende befindet.

### 3.3.5. Coomassie-Färbung

Tabelle 3.13.: Materialien für Coomassie-Färbung

<b>Substanz/ Gerät/ Material</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Simply Blue Safe Stain	-	invitrogen
Wipptisch ST5 CAT	-	Hassa Laborbedarf
Mikrowelle CMG 2893DW	-	Candy
Färbeschalen	-	Hassa Laborbedarf

Nach der Elektrophorese werden die Gele einer Coomassie-Färbung unterzogen. Dafür werden sie in ca. 200 ml Reinstwasser 1 min bei 800 Watt in der Mikrowelle erhitzt und anschließend für 1 min bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch gewaschen. Das Wasser wird dekantiert und der Waschvorgang noch zwei weitere Male mit frischem Reinstwasser wiederholt. Anschließend werden die Gele in ca. 40 ml Coomassie-Färbelösung überführt und 45 s bei 800 W erneut in der Mikrowelle erhitzt. Nach 10-30 minütigem Färben auf dem Wipptisch wird die Färbelösung entfernt und die Gele für 4-24 h in Reinstwasser entfärbt.

### 3.3.6. Quantifizierung

Tabelle 3.14.: Materialien für Quantifizierung

<b>Substanz/ Gerät/ Material</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
BSA Standard	-	Thermo Scientific
IFN-Standard	-	RHB
Gelscanner View Pix 900	-	Epson

Um eine Aussage über die Ausbeute des Zielproteins treffen zu können, ist es notwendig eine Quantifizierung durchzuführen. Dafür wird eine SDS-PAGE durchgeführt, wobei

das Volumen des Pellets bei der Normierung auf z. B. OD = 10 mit berücksichtigt wird. Dafür wird es erst in einem geringeren Volumen Solubilisierungspuffer resuspendiert und die Probe anschließend auspipettiert. Daraufhin wird das fehlende Volumen hinzugegeben und die Probe wie bei der SDS-PAGE weiter behandelt. Außerdem werden für die Quantifizierung Standards mitgeführt, welche aus einer Stammlösung mit bekannter Konzentration hergestellt werden. Die 3-6 unterschiedlichen Konzentrationen sollten so gewählt werden, dass der erwartete Mengenbereich der Proben abgedeckt wird und keine außerhalb des Kalibrierbereiches liegen. Desweiteren sollten verschieden konzentrierte Proben aufgetragen werden, damit die Banden nicht zu stark oder zu schwach für eine Quantifizierung im gewählten Bereich sind.

Da die Quantifizierung auf der Intensität der Bande beruht, welche durch die Färbung mit Coomassie entsteht, sollten als Standard möglichst ähnlich große Proteine verwendet werden. Dadurch enthält das Vergleichsprotein dann wahrscheinlich annähernd genauso viele basische Aminosäurenreste, an die sich der Farbstoff anlagert und das Ergebnis wird nicht zu sehr verfälscht. Die Quantifizierung erfolgt dann mit der Software des Gelscanners.

### 3.3.7. Western Blot

Nach der SDS-Page können beim Blotten die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen werden. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran erfolgt mittels Milchpulver oder BSA. Die Membran wird dann mit einem anti-Antigen Antikörper (Erstantikörper) inkubiert, der direkt an das jeweilige Zielprotein bindet. Nach mehreren Waschschritten, durch die ungebundene Antikörper entfernt werden, erfolgt eine Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper, der wiederum an den Erstantikörper bindet. Es bildet sich hierbei ein Sandwich aus Antigen, Erstantikörper sowie Zweitantikörper aus. Nach erneuten Waschschritten zum Abspülen von nicht gebundenem Zweitantikörper wird die Blotmembran mit einem luminolhaltigen Chemilumineszenz-Substrat inkubiert. Das Luminol wird durch die Peroxidase oxidiert. Dadurch kommt es an den Positionen auf der Membran zu einer Emission von Licht, an denen sich der Antigen-Antikörper-Komplex befindet. Die Lichtsignale werden mit Hilfe der Geldokumentationanlage detektiert und visualisiert. Die Signalintensität des emittierten Lichtes korreliert mit der Menge an Protein auf der Blotmembran.

Nach dem Blotten besteht die Möglichkeit, das Gel noch mit Coomassie anzufärben. Dadurch kann nachgewiesen werden, ob der Transfer funktioniert hat.

Tabelle 3.15.: Zusammensetzung PBS-T

Substanz	Konzentration	Hersteller
PBS (Phosphate Buffered Saline)	1x	Sigma
Tween 20 (Polysorbat)	0,1 %	Merck

Das Gel wird wie bei der SDS-PAGE beladen und laufen gelassen, allerdings sollte ein auf dem Blot sichtbarer Marker verwendet werden. Ist das Gel fertig gelaufen, wird die Fo-



Tabelle 3.16.: Materialien für Western Blot

Substanz/ Gerät/ Material	Konzentration	Hersteller
PBS-T	-	RHB
Milchpulver	-	BIO RAD
Peroxidase	-	Thermo Scientific
MagicMark XP Western Protein Standard	-	invitrogen
iBlot Transferstacks	-	Invitrogen
iBlot Dry blotting system	-	Invitrogen
Geldokumentations- anlage	-	BIO RAD
Blotschalen	-	Hassa
Wipptisch ST5 CAT	-	Hassa Laborbedarf
Antikörper gegen Prähormon	-	ABBIOTEC
Antikörper gegen Zytokin	-	Acris Antibodies
Antikörper gegen Hormon	-	RHB
Antikörper Ziege gegen Kaninchen	-	Jackson Immuno- Research Laborato- ries
Antikörper Ziege gegen Maus	-	RHB

lie vom Kupfer-Anoden-Tray abgezogen und mit Plastikunterseite direkt auf die offene iBlot-Apparatur gelegt. Das SDS-Gel wird aus der Kassette genommen und luftblasenfrei auf die Membran des Anoden-Trays gelegt. Dann kommt ebenfalls luftblasenfrei das Kupfer-Kathoden-Tray mit der Gelmatrix auf das SDS-Gel. Der Schwamm wird mit dem Metallkontakt oben rechts in den Deckel der iBlot-Apparatur geklemmt, das Gerät geschlossen und angeschaltet. Nach dem Blotten werden Schwamm und Kupfer-Kathoden-Tray entfernt und die Membran in 1x PBS-T Waschlösung gelegt.

Blockierlösung wird mit 5 % Milchpulver 1x PBS-T angesetzt und die Membran 1 h bis über Nacht darin inkubiert. Eine über Nacht Inkubation muss bei 4°C erfolgen, ansonsten bei RT. Die Antikörperlösung wird in der Blockierlösung mit einer bestimmten Konzentration angesetzt, welche abhängig von dem produktspezifischen Antikörper ist. Inkubation kann ebenfalls flexibel gewählt werden (1 h bis über Nacht), wobei eine über Nacht Inkubation auch bei 4°C erfolgen muss. Der Blot wird 3x in 1x PBS-T für je 10 min auf dem Wipptisch gewaschen. Der 2. Antikörper wird in der Blockierlösung oder der Waschlösung mit einer bestimmten Konzentration angesetzt. Diese ist ebenfalls abhängig von dem produktspezifischen Antikörper. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wird der Blot erneut 3x in PBS-T für je 10 min gewaschen. Für die Detektion wird das Substrat in einem Verhältnis 1:1 auf die Membran gegeben und für ca. 1 min auf dem Blot inkubiert. Der Blot wird zwischen zwei Folien gelegt und der Rest der Flüssigkeit ausgestrichen. Die Detektion erfolgt mit der Geldokumentationsanlage.

## 3.4. Expressionstest

### 3.4.1. Expressionstest

Tabelle 3.17.: Zusammensetzung Komplet-Medium

Substanz	Konzentration	Hersteller
Gemüsepepton	2,7 %	OXOID
Hefeextrakt	1,4 %	OXOID
Natriumchlorid	0,5 %	Merck
di-Kaliumhydrogen- phosphat	0,6 %	Merck
Kaliumdihydrogen- phosphat	0,3 %	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,024 %	Merck
Glycerin > 99,5 %	2,5 %	Merck

Zur Herstellung einer Über-Nacht-Kultur wird ein Klon von der Transformationsplatte gepickt oder eine kleine Menge (15 µl) aus einem Glycerolstock entnommen und in ca. 2 bis 3 ml Kompletmedium-Medium (Tabelle 3.17) überführt. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten erfolgt außerdem eine Zugabe von 50 µg/ml Kanamycin. Die Kultur wird dann für 12-18 h im Schüttelbrutschrank bei 220 rpm inkubiert, wobei die Temperatur abhängig von dem Expressionsvektor ist.

Zum Animpfen der Hauptkultur wird die OD<sub>600</sub> der Vorkultur photometrisch bestimmt und dann die Hauptkultur mit einer Start OD<sub>600</sub> von 0,1 mit oder ohne Antibiotikum angeimpft. Das Volumen der Kultur beträgt je nach Mikrotiterplatte 3 ml. Die Inkubation erfolgt im Schüttelbrutschrank bei 30-37°C, je nach Expressionsvektor.

Sowohl die ÜN- als auch die Expressionskultur wird in der jeweiligen Mikrotiterplatte durchgeführt. Dadurch können sich die Zellen bereits frühzeitig an die Wellform und den daraus resultierenden Sauerstoffeintrag anpassen. Um Kontaminationen zwischen den Wells zu vermeiden, werden sie mit einer sauerstoffdurchlässigen Klebefolie zugeklebt.

Die OD<sub>600</sub> wird nach zweistündigem Wachstum gemessen bis die Kultur einen Wert von 0,5-0,8 erreicht hat. Zu diesem Zeitpunkt wird 1 ml Kultur als  $t_0$  entnommen 10 min bei 13000 rpm pelettiert. Der Rest der Kultur wird entweder mit 1mM IPTG oder durch einen Temperaturshift auf 42°C induziert. Auch die Induktion ist abhängig vom Expressionsvektor.

Nach einem Wachstum über 3 Stunden wird die OD<sub>600</sub> der Kultur bestimmt, sowie 1 ml Kultur entnommen. Die  $t_3$  Probe wird ebenfalls abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Tabelle 3.18.: Materialien für Expressionstest

<b>Substanz/ Gerät/ Material</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Komplett-Medium	-	RHB
Kanamycin	50 µg/ml	Sigma-Aldrich
IPTG	1 mM	RHB
Multireader iEMS Reader MF	-	Thermo Scientific
Ultrospec 100 pro	-	Ultrospec 100 pro
Schüttelinkubator innova refrigerated incubator shaker	-	New Brunswick scientific
24- Well-Platte	-	IUL Instruments
48- Well-Platte (konisch)	-	Corning
48- Well-Platte (flach)	-	GE Healthcare
Mehrkanalpipetten (5-50 µl, 20-200 µl, 100-1200 µl)	-	Rainin
Folie	-	IUL Instruments

### 3.4.2. Cryo Stock Ablage

Tabelle 3.19.: Materialien für Cryo Stock Ablage

<b>Substanz/ Gerät/ Material</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Glycerin	30 % (w/v)	Merck
flüssiger Stickstoff	-	RHB

Zur Lagerung der Zellen werden Cryo-Stocks angelegt. Dafür werden 500 µl 30 %iger Glycerol mit 1000 µl Kultur gemischt, wobei es sich wenn möglich um eine Über-Nacht-Kultur handeln sollte bei der die Zellen noch keine Expression ausgeführt haben, und welche eine hohe OD aufweist. Das Reaktionsgefäß wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder direkt bei -80°C eingefroren.

## 4. Vorversuche

### 4.1. Klonierungen und Transformationen

Bevor die Expressionstests durchgeführt werden konnten, mussten zunächst die benötigten Produkt-Vektor-Stamm-Kombinationen kloniert und transformiert werden. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen eine Übersicht über die untersuchten Kombinationen. Da einige Produkt-Vektor-Kombinationen bereits fertig vorlagen und nicht neu kloniert werden mussten, ergeben sich für die jeweilige Kombination unterschiedliche Startpunkte im Arbeitsablauf (Abbildung 1.1), welche ebenfalls eingezeichnet sind. Die zugehörigen Gelbilder befinden sich im Anhang.

#### 4.1.1. pET26b(+)

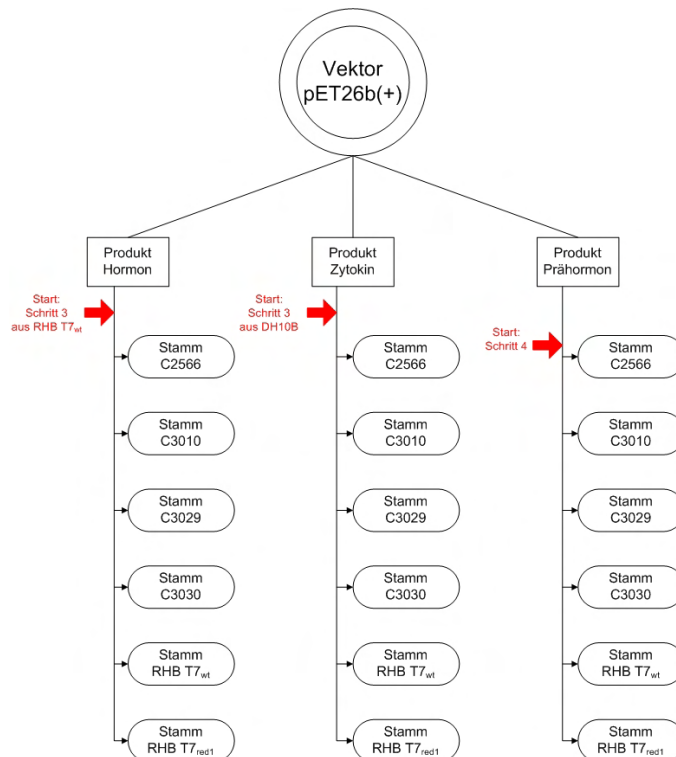


Bild 4.1.: Kombinationen des Vektors pET26b(+) und eingezeichnete Startpunkte.

Für die Versuche mit dem Vektor pET26b(+) lagen bereits Cryo-Stocks mit dem Vektor und Hormon in RHB T7<sub>wt</sub>, sowie mit Zytokin in DH10B vor. Daraus wurde die DNA isoliert, mittels Restriktionsanalyse verifiziert und in die Expressionsstämme transformiert. Die DNA des Vektors und dem Prähormon lag bereits in isolierter Form vor und konnte nach einem Kontrollverdau direkt zur Transformation eingesetzt werden.

### 4.1.2. pHI

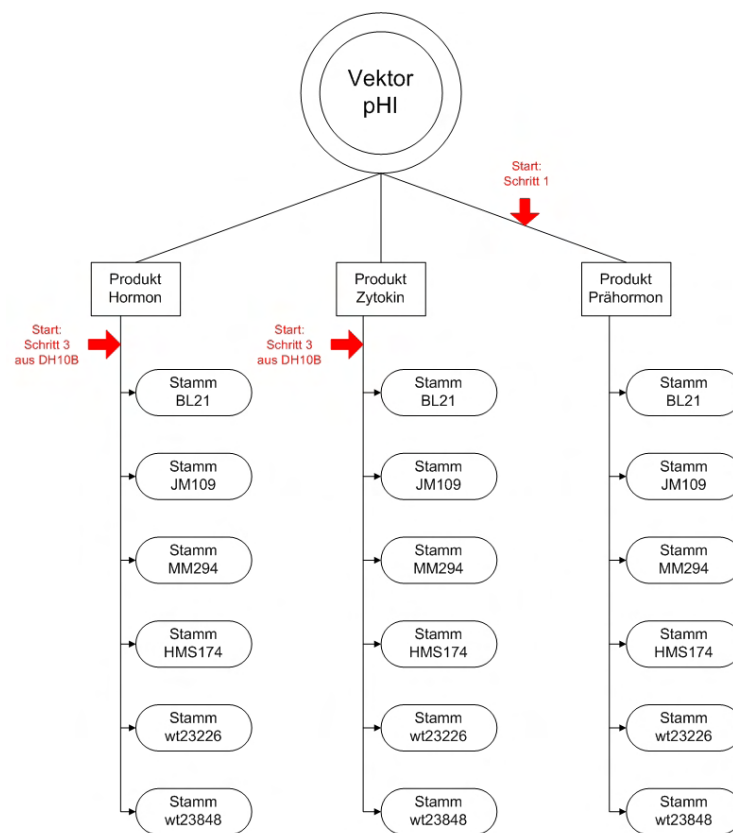


Bild 4.2.: Kombinationen des Vektors pHI und eingezeichnete Startpunkte.

Der pHI lag ebenfalls mit Hormon und Zytokin jeweils in DH10B als Cryo-Stock vor, so dass die pDNA isoliert und nach positiver Kontrolle zur Transformation eingesetzt werden konnte. Ganz neu musste die Kombination pHI mit Prähormon kloniert werden, so dass hierbei das Fließdiagramm des Arbeitsablaufs komplett durchlaufen wurde.

### 4.1.3. pIPTG\_T5

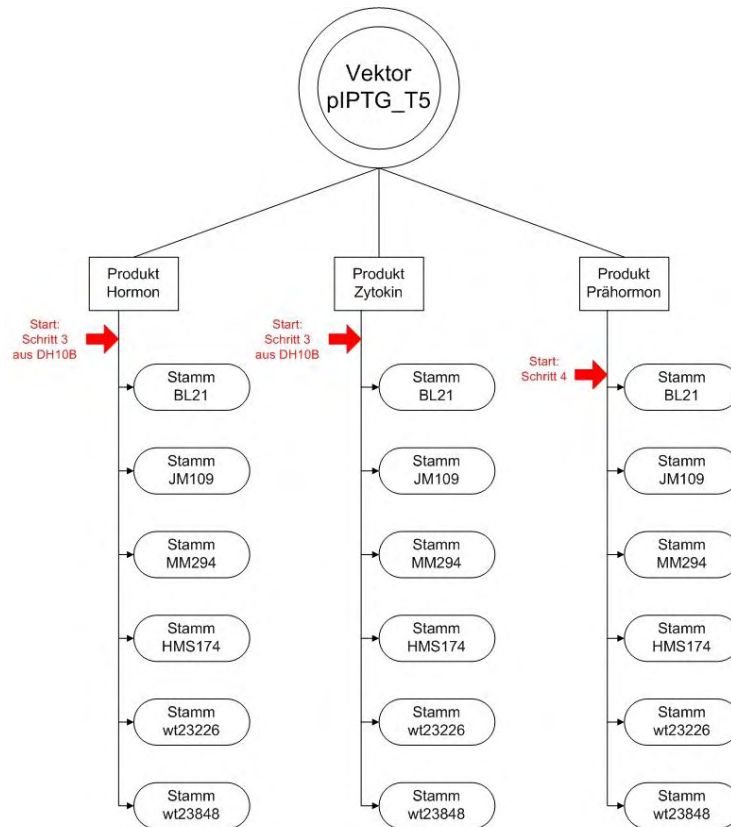


Bild 4.3.: Kombinationen des Vektors pIPTG\_T5 und eingezeichnete Startpunkte.

Auch die Kombination von pIPTG\_T5 mit Hormon und Zytokin standen jeweils in DH10B schon zur Verfügung, so dass mit ihnen wie mit den Vorigen verfahren werden konnte. Die DNA von pIPTG\_T5 und Prähormon lag schon fertig vor, womit direkt in die Expressionsstämme transformiert werden konnte.

## 4.2. OD-Messung mit dem Multireader

Für die OD-Messung der Zellsuspension wurde aus den 24-/48-Well-Platten der Kultivierung Proben in 96-Well-Platten pipettiert, ggf. verdünnt und dann mit dem Multireader vermessen. Da es sich dabei um ein älteres Gerät handelt, bei dem die Wellenlänge nicht stufenlos eingestellt werden kann, konnten die Messungen nicht exakt bei 600 nm erfolgen, sondern wurden bei 570 nm und 620 nm durchgeführt. Desweiteren sind die Werte eines Fotometers, bei dem eine Küvette mit 1 cm Schichtdicke verwendet wurde, nicht direkt mit den Werten des Multireaders vergleichbar. Durch das Probenvolumen von 200 µl entsteht eine, von der Schichtdicke der Küvette abweichende, Füllhöhe. Mit Hilfe des

Lambert-Beer'schen Gesetz lässt sich von der gemessenen Extinktion auf die Konzentration der Probe schließen. Dadurch, dass die Schichtdicke jedoch nicht konstant ist, lassen sich die Werte der unterschiedlichen Messsysteme nicht vergleichen, unabhängig von der leicht abweichenden Wellenlänge.

$$E_\lambda = \lg \left( \frac{I_0}{I_1} \right) = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (4.1)$$

Mit:	$E_\lambda$	Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda$	[-]
	$I_0$	Intensität des eingestrahnten Lichtes	[W·m <sup>-2</sup> ]
	$I_1$	Intensität des transmittierten Lichtes	[W·m <sup>-2</sup> ]
	$\varepsilon_\lambda$	dekadischer Extinktionskoeffizient	[cm <sup>2</sup> · mol <sup>-1</sup> ]
	$c$	Stoffmengenkonzentration	[mol · cm <sup>3</sup> ]
	$d$	Schichtdicke	[cm]

Zur Umrechnung der vom Multireader ermittelten Werte in eine OD<sub>600</sub> bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter wurden zwei Regressionsgeraden ermittelt. Dafür wurde die selbe Probe mit dem Fotometer und dem Multireader gemessen und die Werte in einem Diagramm aufgetragen. Leider konnte keine der beiden Regressionsgeraden eine deutlich geringere Abweichung zu den absoluten Werten aufweisen, so dass für die spätere OD-Berechnung von beiden gemessenen Wellenlängen die OD<sub>600</sub> berechnet und der Wert anschließend gemittelt wurde.

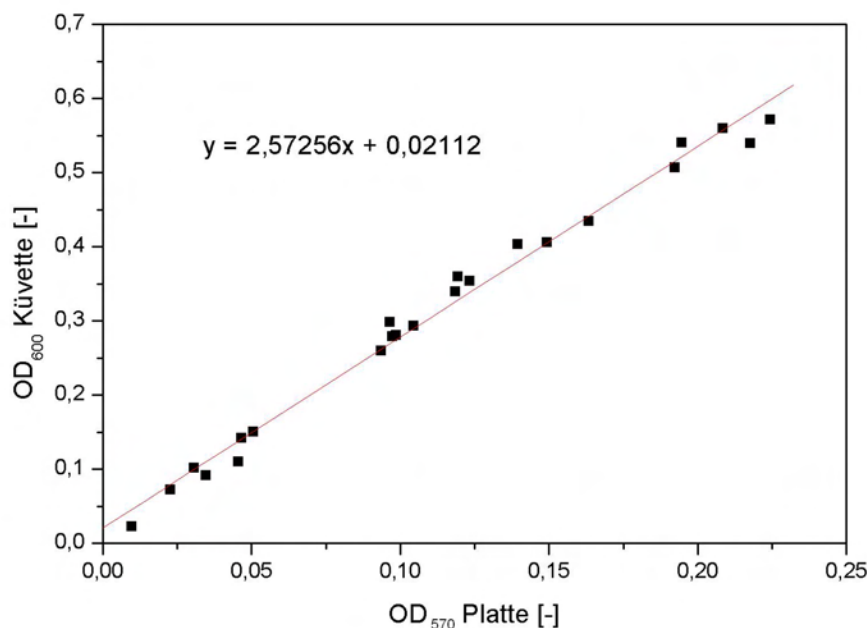


Bild 4.4.: Regressionsgerade zur Berechnung der OD<sub>600</sub> aus den gemessenen Werten bei 570nm

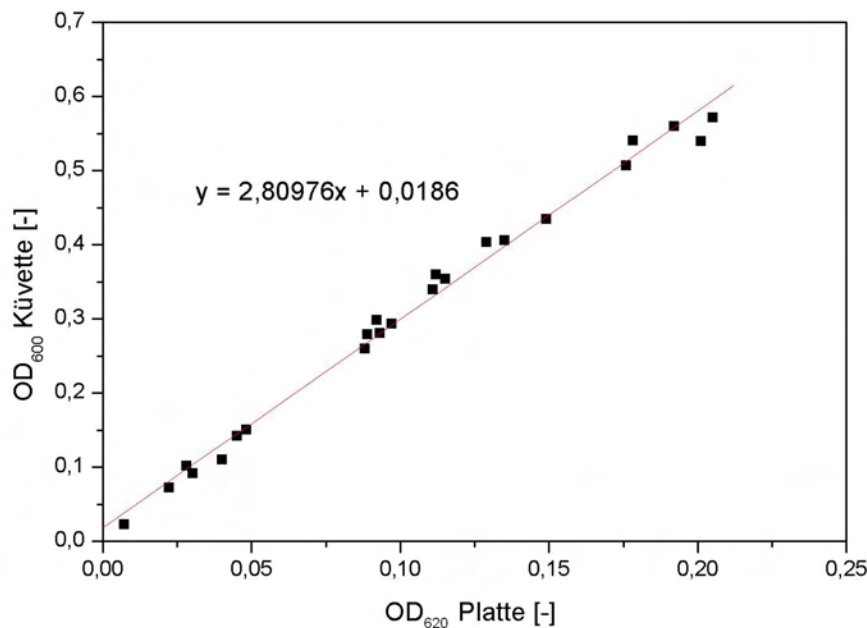


Bild 4.5.: Regressionsgerade zur Berechnung der  $OD_{600}$  aus den gemessenen Werten bei 620nm

Mit Hilfe des so berechneten OD-Wertes wird die benötigte Menge an Solubilisierungspuffer zur Resuspension berechnet, um ein Zellpellet auf  $OD=10$  einzustellen. Diese Normierung dient der besseren Vergleichbarkeit der Banden auf der SDS-PAGE. Aufgrund dessen ist keine exakte Berechnung der OD erforderlich, und sowohl dieser als auch der durch das Volumen des Pellets verursachte Fehler ist an dieser Stelle vertretbar.

Desweiteren gilt es den Messbereich des Multireaders zu beurteilen, da außerhalb des linearen Zusammenhangs zwischen Konzentration und OD schnell sehr große, inakzeptable Abweichungen auftreten. Dafür wurden OD-Werte in Abhängigkeit der Massenkonzentration  $\beta \left[ \frac{gBTM}{l} \right]$  in Abbildung 4.6 aufgetragen. Die Konzentration der Biomasse wurde aus der OD berechnet, da eine OD von 1 ca.  $\left[ \frac{0,3 gBTM}{l} \right]$  entspricht (Heidorn, 2002, S. 107).

Aus diesem Versuch wird deutlich, dass auch hier nur OD-Werte von 0,6 aussagekräftig sind und höhere Messwerte nicht verwendet, sondern die Proben weiter verdünnt werden sollten.



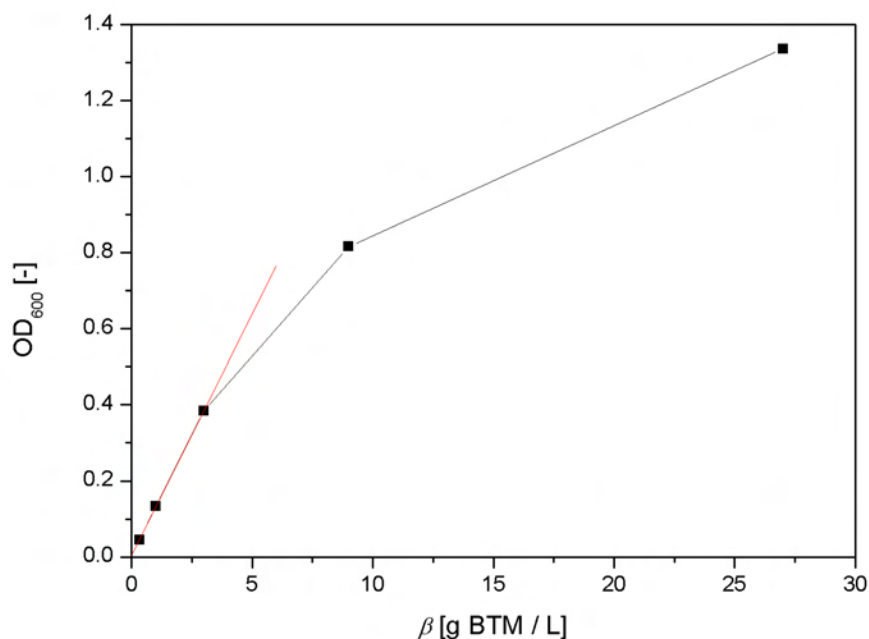


Bild 4.6.: Abhängigkeit der  $OD_{600}$  von der Zellkonzentration zur Beurteilung des Messbereichs

Nachfolgend wird eine Beispielrechnung der ÜN-Kultur von pHI mit HOR in BL21, Klon 1 durchgeführt. Die restlichen Werte befinden sich im Anhang. Zunächst erfolgte die Bestimmung des Blankwertes bei 570 und 620 nm . Dafür wurde eine Wellreihe mit dem verwendeten Medium gemessen und die Werte gemittelt.

Tabelle 4.1.: Blankwerte der Beispielrechnung

	570 nm	620 nm
<b>A</b>	0,143	0,102
<b>B</b>	0,142	0,101
<b>C</b>	0,141	0,101
<b>D</b>	0,144	0,103
<b>E</b>	0,142	0,102
<b>F</b>	0,142	0,102
<b>G</b>	0,141	0,100
<b>H</b>	0,139	0,099
<b>Mittelwert</b>	0,142	0,101

Von den Messwerten der Probe wurde dieser Blank für die jeweilige Wellenlänge abgezogen. Anschließend wurden diese Werte mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und mit Hilfe der Regression in  $OD_{600}$  umgerechnet. Diese, von beiden Wellenlängen

bestimmten Werte wurden arithmetisch gemittelt und für die Berechnung des Animpfvolumens verwendet.

Tabelle 4.2.: Beispielrechnung

	<b>570 nm</b>	<b>620 nm</b>
gemessener OD-Wert	= 0,407	= 0,352
– gemittelter Blank	= 0,265	= 0,251
· Verdünnungsfaktor (10)	= 2,653	= 2,508
Regression	= $2,653 \cdot 2,57256 + 0,02112$	= $2,508 \cdot 2,80976 + 0,0186$
	= 6,845	= 7,064
Mittelwert	= 6,95	

Da das Animpfen mit der Mehrkanalpipette erfolgte, wurde das mittlere Volumen pro Spalte berechnet. Somit wurden manche Expressionskulturen zwar mit einer etwas zu hohen oder zu niedrigen OD angeimpft, der Arbeitsaufwand ist jedoch viel geringer. Desweiteren besteht nicht so eine große Gefahr, Fehler beim Pipettieren von 48 Proben zu machen.

Für die erste Spalte der Mikrotiterplatte wurden folgende OD-Werte berechnet. Das jeweilige Animpfvolumen für eine OD von 0,1 in einer 3 mL Kultur, sowie der Mittelwert ist ebenfalls in Tabelle 4.3 angegeben. Die Abweichung dieser Methode liegt bei unter 10% und ist somit durchaus tolerabel.

Tabelle 4.3.: Berechnung des Animpfvolumens

Mittelwerte	Animpfvolumen in $\mu\text{L}$	Abweichung in %
6,95	43,14	-7,55
8,11	36,99	7,78
7,17	41,86	-4,35
7,49	40,03	0,21
7,74	38,77	3,35
7,55	39,75	0,89
7,50	40,00	0,29
7,43	40,35	-0,61

Die OD-Messung in Mikrotiterplatten mit dem Multireader ließ sich bis zu einer OD von 0,6 problemlos durchführen. Die Umrechnung in die  $\text{OD}_{600}$ -Werte war recht umständlich. Trotzdem kommt es mit dieser Methode zu einer großen Zeitersparnis im Vergleich zu Einzelmessungen mit dem Fotometer. Abhilfe würde ein moderneres Gerät schaffen, welches bei 600 nm messen und die Füllhöhe auf eine Schichtdicke von 1 cm hochrechnen kann.

### 4.3. Wachstumskurven

Im nachfolgenden Abschnitt wird das Wachstumsverhalten des ersten Klon der verwendeten Stämme beurteilt. Dafür wurden nur exemplarische die Stämme mit dem im pIPTG\_T5-Vektor enthaltenen Zytokingen verwendet.

#### 4.3.1. Vergleich der verschiedenen Stämme im Schüttelkolben

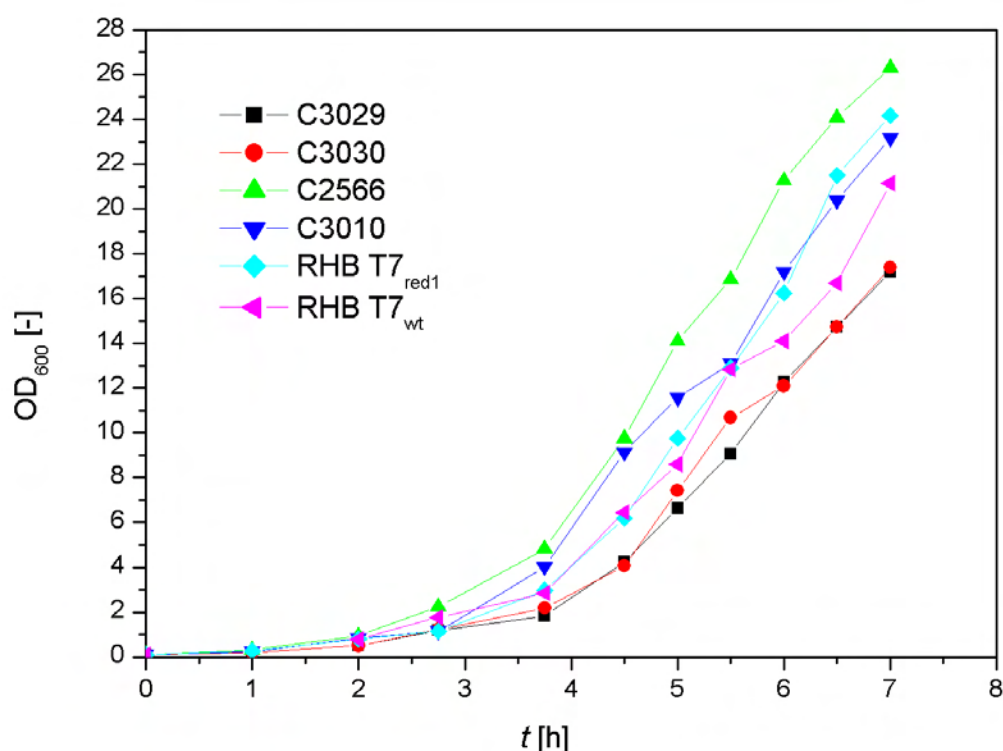


Bild 4.7.: Wachstumskurven der NEB-Stämme im Schüttelkolben

Die Wachstumskurven der NEB-Stämme, sowie von den RHB T7-Stämmen sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Das Wachstum fand in einem 100 mL Schüttelkolben aus Glas mit Schikanen statt, wobei das Verhältnis von Medium- zu Kolbenvolumen 1:10 betrug. Trotz optimaler Wachstumsbedingungen brauchen alle Stämme ca. 4 Stunden, um sich an die Umgebungsbedingungen anzupassen und gehen erst spät in die exponentielle Phase über. Deren Ende ist nach 7 stündigem Wachstum erst schwach angedeutet. Dort haben die Zellen eine  $OD_{600}$  zwischen ca. 17 (C2566) und 26 (C2566) erreicht.

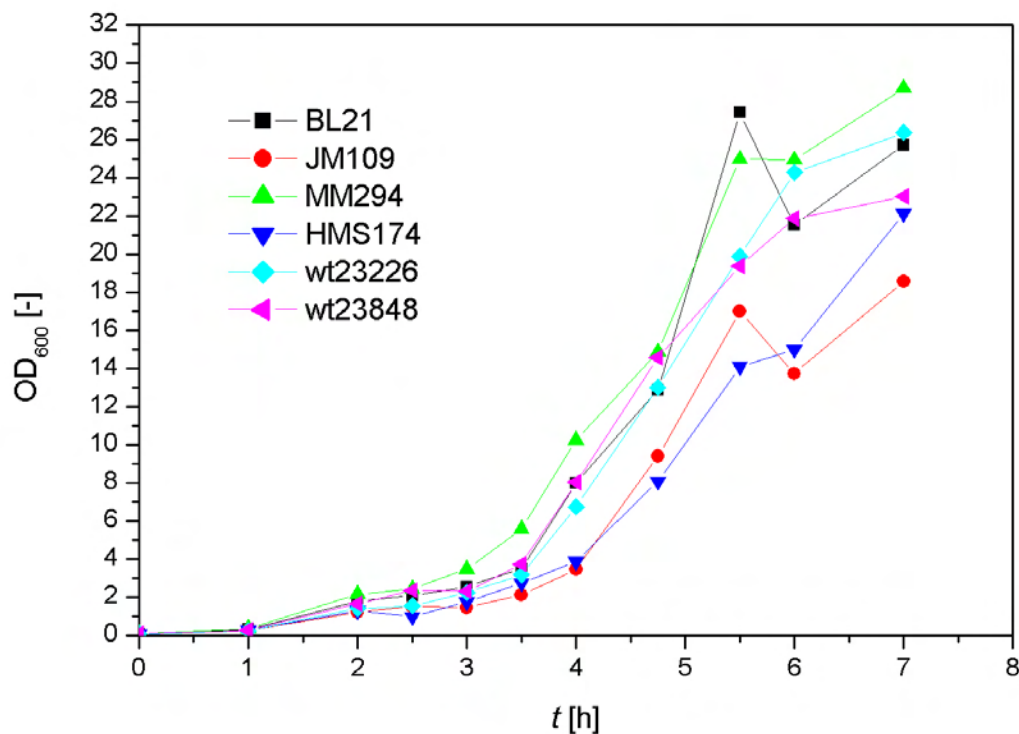


Bild 4.8.: Wachstumskurven der ATCC-STämme im Schüttelkolben

Auch die ATCC-Stämme (Abbildung 4.8) zeigen eine lange lag-Phase vor dem Übergang in die exponentielle Phase. Auffällig bei diesen Kurvenverläufen ist der Einbruch nach ca. 6 h. Bei allen Stämmen, bis auf die beiden Wildtypen, ist eine Abnahme, bzw. stark verminderte Zunahme der OD erkennbar. Dies könnte evtl. durch Pipettierfehler der Verdünnungsreihen entstanden sein, es spricht jedoch eher für eine Wachstumsminde- rung bei zu hoher Zelldichte. Trotzdem erreichen auch diese Stämme nach 7 h eine OD von ca. 18 (JM109) bis 29 (MM194).

Alle sechs verwendeten Stämme zeigen ein ähnliches Wachstumsverhalten und erreichen nach 7 Stunden eine OD zwischen 17 und 29. Für weitere Untersuchungen des Wachstumsverhaltens wurde der mittelmäßig gut wachsende Stamm RHB T7<sub>red1</sub> verwendet.

#### 4.3.2. Vergleich des Wachstums in unterschiedlichen Formen von Mikrotiterplatten und zum Schüttelkolben

Mit diesem Vorversuch sollen eventuelle Unterschiede im Wachstumsverhalten gezeigt werden, welche auf die Geometrie der Platten und den davon abhängigen Sauerstoffein- trag zurückzuführen sind. Verglichen werden die Wachstumskurven der Mikrotiterplat- ten mit dem Wachstum im Schüttelkolben. Dies dient der Auswahl der für die Expressi-

onstests verwendeten Platten. Zum Vergleich standen die in Abbildung 4.9 dargestellten Platte. Die Maße und Längenverhältnisse stimmen dabei nicht exakt überein.

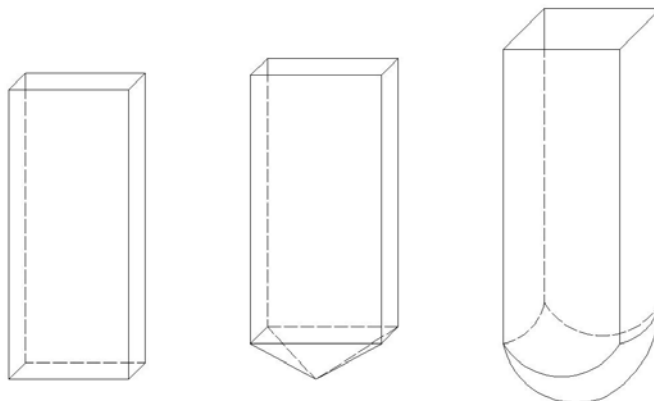


Bild 4.9.: Darstellung der verwendeten Wellformen

Die folgende Tabelle 4.4 liefert eine Übersicht der verwendeten Platten und ihre wichtigsten Merkmale.

Tabelle 4.4.: Übersicht der getesteten Mikrotiterplatten

Anzahl der Wells	Form der Grundfläche	Form des Bodens	Maximale Füllhöhe	Verwendetes Volumen	Verhältnis
48	rechteckig	konisch	5 mL	3 mL	0,6
48	rechteckig	flach	5 mL	3 mL	0,6
24	quadratisch	rund	10 mL	3 mL	0,3

Bei dem als Referenz dienenden Schüttelkolben handelte es sich wieder um einem 100 mL Schüttelkolben aus Glas mit Schikanen. Das Verhältnis von Medium- zu Kolbenvolumen betrug  $10:100 = 0,1$ . Dadurch kommt es im Kolben zu einer größeren Oberfläche, woraus ein erhöhter Sauerstoffeintrag resultiert. Somit wurde im Schüttelkolben eine End-OD von ca. 24 erreicht. In den Mikrotiterplatten hängt dieses Verhältnis von den Wellgrößen ab, wodurch sich die runde von der konischen und flachen Platte unterscheidet. Durch die geringere Anzahl an Wells bei der runden Platte haben diese ein größeres Fassungsvermögen von 10 ml. Da für einen Expressionstest jedoch nur 3 ml benötigt werden, hätte hier ein Verhältnis von 0,6 die Verwendung von 6 mL bedeutet. Dadurch hätten jedoch Komponenten wie Medium oder Antibiotikum verschwendet werden müssen, so dass ein besseres Verhältnis zustande gekommen ist.

Anhand der Abbildung 4.10 wird deutlich, dass sich die dreistündigen lag-Phasen nicht voneinander unterscheiden, egal ob das Wachstum in einem Kolben oder einer Platte stattfand. Somit wird die erforderliche Start OD zur Induktion in keinem System schneller erreicht, wodurch auch keine Zeitersparnis erreicht werden kann.

Da die Verläufe von konischer und flacher Mikrotiterplatte fast identisch sind, scheint die Form des Bodens keine Auswirkungen auf das Wachstum zu haben. In beiden Platten werden End-ODs zwischen 3 und 4 erreicht. Die Zellen in der runden 24-Well-Platte zeigen ein stärkeres Wachstum mit einer End OD zwischen 5 und 6. Dies liegt wahrscheinlich jedoch nicht an der Geometrie der Wells, sondern an dem besseren Verhältnis von Medium- zu Kolbenvolumen. Wird die End-OD der flachen/konischen Platte mit dem Faktor 6 multipliziert, welcher zwischen den beiden Verhältnissen liegt, so erhält man ebenfalls ungefähr eine OD von 24. Dies trifft auf die OD der runden Platte nicht zu. Multipliziert man deren End-OD mit dem Faktor 3, liegt die errechnete OD weit unterhalb der OD aus dem Kolbenversuch. Die OD der runden Platte müsste in Bezug auf ihr Verhältnis von Medium- zu Kolbenvolumen also bei ca. 8 liegen. Es könnte sich natürlich um eine einmalige Wachstumsminderung in der runden Platte handeln, da der Versuch nur ein Mal durchgeführt wurde, aber trotzdem erweist sich die runde Platte als unvorteilhaft. Sie enthält lediglich 24 Wells, so dass für die gleiche Anzahl an getesteten Klonen doppelt so viele Platten verwendet werden müssen.

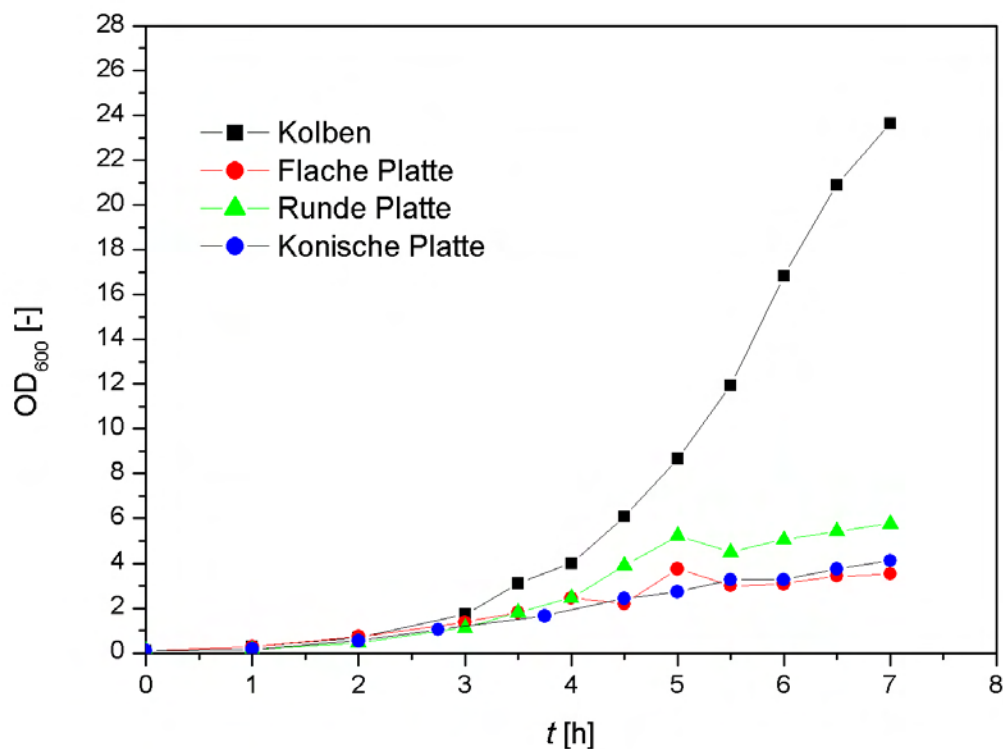


Bild 4.10.: Vergleich des Wachstums von RHB T7<sub>red1</sub> in unterschiedlichen Mikrotiterplatten und zum Schüttelkolben

In Abbildung 4.11 ist der Temperaturverlauf im Kolben und in einer Mikrotiterplatte dargestellt. Deutlich wird dabei, dass im Glaskolben bereits nach ca. 15 min 36°C erreicht

wurden, was nur 1°C unter der eingestellten Brutschranktemperatur liegt. In der Mikrotiterplatte wurden nach einer Stunde erst ca. 34°C erreicht, was nach einer weiteren Stunde nur noch um 1°C gesteigert werden konnte. Auch der Parameter Temperatur scheint also an dem großen Unterschied zwischen dem Wachstum im Kolben oder einer Mikrotiterplatte beteiligt zu sein. Allerdings reicht der Unterschied alleine nicht aus, um die Diskrepanz zu erklären. Die Faktoren Sauerstoffeintrag und Temperatur sind wahrscheinlich für die unterschiedlichen Wachstumskurven verantwortlich.

Desweiteren hat sowohl der bessere Sauerstoffeintrag, als auch die höhere Temperatur im Schüttelkolben keinen Einfluss auf das Wachstum. Die Zellen benötigen die gleiche Zeit um sich an die Umgebungsbedingungen zu adaptieren, unabhängig davon, worin sie kultiviert werden.

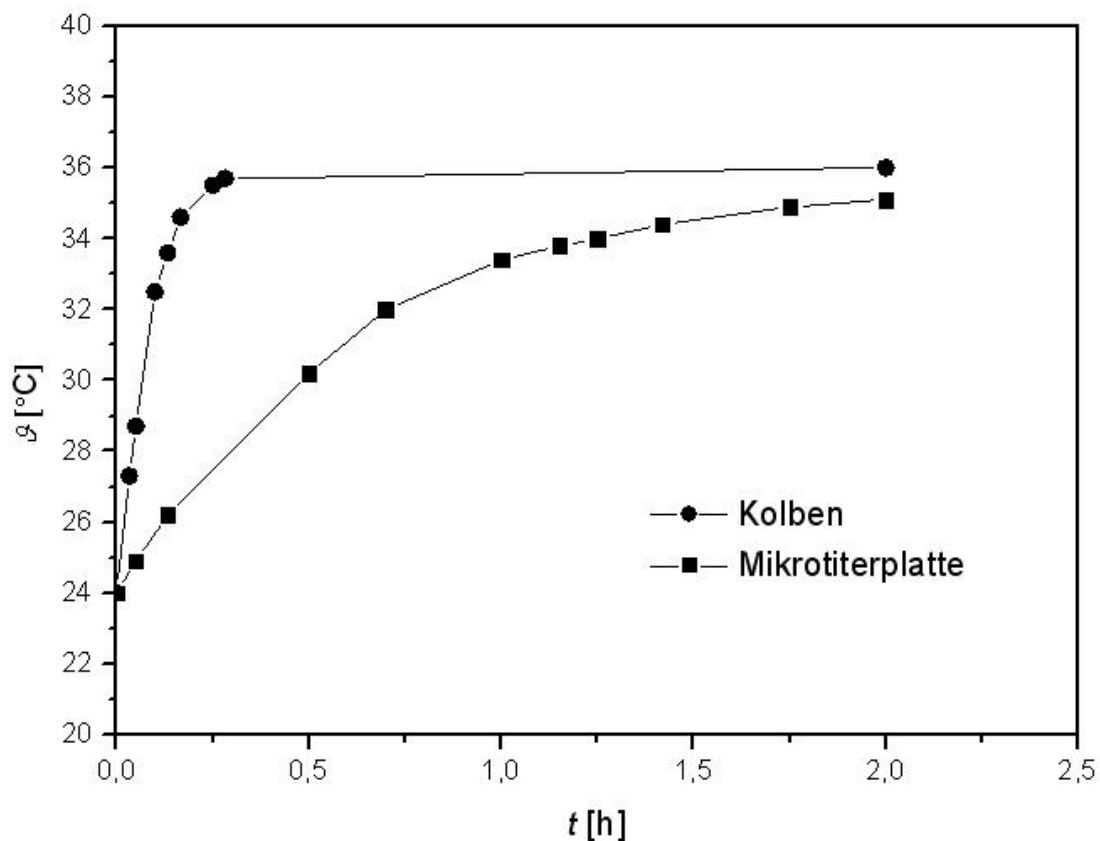


Bild 4.11.: Vergleich des Wärmeübergangs beim Kolben und Mikrotiterplatte

Die Wahl der weiter verwendeten Mikrotiterplatte fällt auf die mit der konischen Wellform. Das Wachstum ist in Bezug auf die Wellgröße besser und das Pipettieren ist durch die Form des Bodens hierbei angenehmer.

### 4.3.3. Einfluss des Kanamycins auf das Wachstum

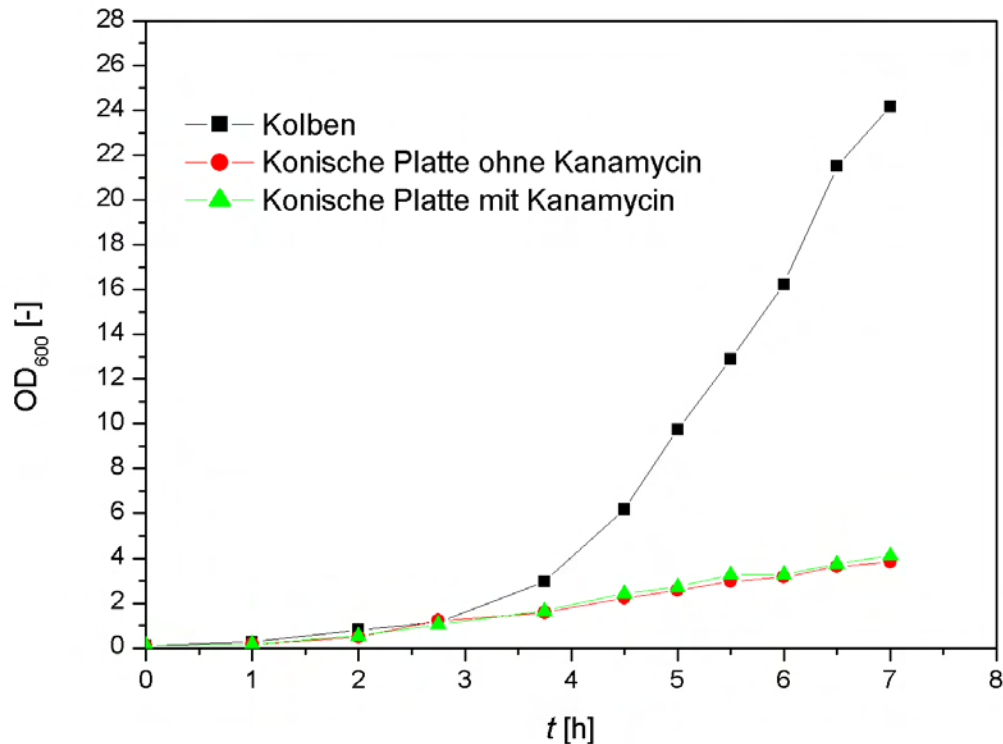


Bild 4.12.: Vergleich vom Wachstum im Schüttelkolben zu Wachstumskurven mit und ohne Kanamycin in konischer Mikrotiterplatte

Im folgenden Versuch soll der Einfluss des Kanamycins auf das Wachstumsverhalten des Stammes RHB T7<sub>red1</sub> beurteilt werden. Da die Expressionstests unter Selektionsdruck durchgeführt werden sollen, wird hierbei untersucht, ob die Anwesenheit von Antibiotika das Wachstum hemmt. Dafür sind in Abbildung 4.12 die Wachstumskurven aus der konischen Platte mit und ohne Kanamycin aufgetragen, im Vergleich zur Wachstumskurve im Kolben, welche als Kontrolle mitgeführt wurde. Anhand dieser Abbildung wird ersichtlich, dass die Anwesenheit von Kanamycin keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen hat, da die beiden Kurven fast identisch verlaufen. Dies wurde zwar nur exemplarisch für den Stamm RHB T7<sub>red1</sub> untersucht, lässt sich auf die anderen Stämme aber wahrscheinlich übertragen. Auch bei diesem Versuch liegt die End-OD der konischen Platte nach 7 Stunden bei ca. 4, was das Ergebnis des vorigen Versuchs reproduziert und bestätigt.



## 5. Ergebnisse der Hauptversuche und Diskussion

Im folgenden Kapitel werden nur exemplarisch einige Gelbilder gezeigt, alle anderen befinden sich im Anhang. Die Auswertung und Gewichtung der Expressionsleistung erfolgte visuell und ist daher nur als Richtwert zu betrachten. Expressionsbanden sind mit Pfeilen markiert, Bereiche in denen keine Expressionsbanden sind, sind mit einem Rahmen gekennzeichnet. Wurden Teile aus einem Gel herausgeschnitten, wird dies durch eine Schere kenntlich gemacht.

Aufgetragen ist jeweils eine  $t_0$  Probe, welche vor der Induktion entnommen wurde, sowie die nach dreistündiger Expression gezogene  $t_3$  Proben der drei untersuchten Klone pro Kombination.

### 5.1. Prähormon

#### 5.1.1. Expression

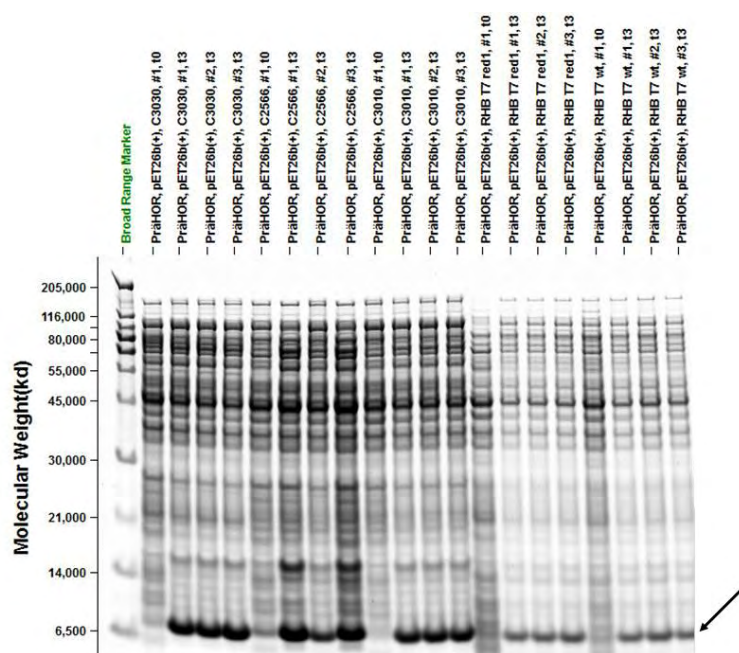


Bild 5.1.: SDS-Gel des Expressionstest von PrähOR in pET26b(+)

Anhand der Abbildungen 5.1 und 5.2 ist erkennbar, dass die Expression von Prähormon im T7-System zu starken Produktbanden führt, wohingegen das hitzeinduzierbare Expressionssystem keine Produktbildung verzeichnet. In der Tabelle 5.1 sind alle Ergebnisse des ersten Expressionstests der Kombinationen mit Prähormon dargestellt. Mit den Vektoren pHI und pIPTG\_T5 kommt es zu keiner Expression des Prähormons, wohingegen alle Stämme mit T7-Expressionssystem eine sehr hohe Expressionsleistung erzielen.

Außerdem treten innerhalb der drei getesteten Klone eines Stammes mit dem pET26b(+)-Vektor keine großen Unterschiede auf. Dadurch wird deutlich, dass es keinen Sinn machen würde, eine größere Anzahl an Klonen zu untersuchen und dass auch 2-3 Klone ein aussagekräftiges Ergebnis liefern.

Als bester Produzent wird der erste Klon der Kombination Prähormon-pET26b(+) in C3029 ausgewählt, welcher in der Tabelle rot dargestellt ist. Damit werden die weiteren Versuche durchgeführt.

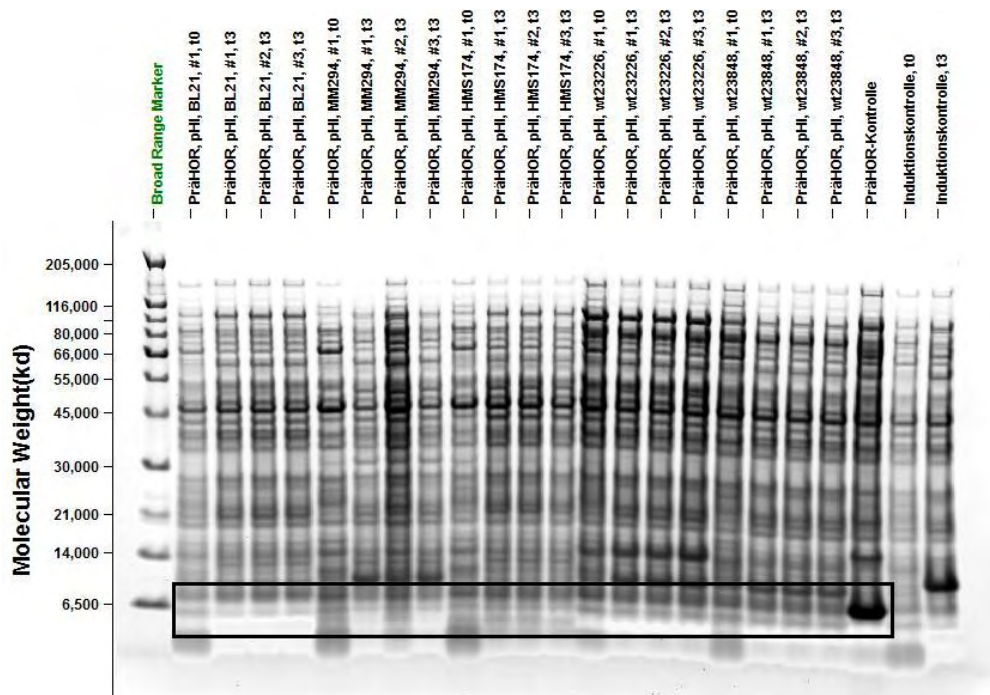


Bild 5.2.: SDS-Gel des Expressionstest von PrähOR in pHI

Die letzten Spuren auf dem Gel der Abbildung 5.2 stellen eine Positivkontrolle zum Vergleich der Laufhöhe, sowie eine Induktionskontrolle dar. Dabei wurden Zellen mit einem anderen Produkt im pHI als Kontrolle mitgeführt, um eventuelle Handlingfehler der Hitzeinduktion aufzudecken. Aus der gut sichtbaren Expressionsbande in der letzten Spur resultiert, dass kein Fehler im Handling die fehlende Expression verursacht hat.

Desweiteren wurde exemplarisch mit den drei Klonen des JM109 mit pHI untersucht, ob die mangelnde Expression durch die Anwesenheit vom Antibiotikum bedingt ist. Daher wurden Expressionstest vergleichsweise mit und ohne Kanamycin durchgeführt (siehe

Abbildung A.5). Das Kanamycin scheint die Expression jedoch nicht zu beeinträchtigen, so dass es auch nicht der Grund für die fehlende Expression sein kann.

Werden die Genotypen der exprimierenden Stämme betrachtet, so scheint sich das *lysY*-Gen negativ auf die Produktion des Prähormons auszuwirken. Die besten Stämme C2566 und C3029 wiesen diesen Genotyp beide nicht auf. Der Vorteil von C3029, die Isomerase DsbC, sowie die defizienten Reduktasen zu besitzen, spiegelt sich wahrscheinlich eher in der richtigen Faltung der Proteine als der Expressionsleistung wieder. Anhand der für die Expression relevanten Genotypen kann das Ergebnis des Expressionstest nicht eindeutig erklärt werden. Auch dadurch wird deutlich, wie wichtig ein umfassendes Screening für die Suche nach einer geeigneten Produkt-Vektor-Stamm-Kombination ist.

Tabelle 5.1.: Auswertungstabelle der Kombinationen mit PräHOR

Vektor	Stamm	Klon 1	Klon 2	Klon3
pHI	BL21	-	-	-
	JM109	-	-	-
	MM294	-	-	-
	HMS174	-	-	-
	wt23226	-	-	-
	wt23848	-	-	-
pIPTG_T5	BL21	-	-	-
	JM109	-	-	-
	MM294	-	-	-
	HMS174	-	-	-
	wt23226	-	-	-
	wt23848	-	-	-
pET26b(+)	C2566	+++++	+++	+++++
	C3010	+++++	+++++	+++++
	C3029	+++++	+++++	+++++
	C3030	+++++	+++++	+++++
	RHB T7 <sub>red1</sub>	+++++	+++++	+++++
	RHB T7 <sub>wt</sub>	+++++	+++++	+++++

Das kleine Protein Prähormon wird nur im pET26b(+)-Vektor in hoher Ausbeute exprimiert. Der pHI und pIPTG\_T5 können keine Produktbildung verzeichnen. Als Ursache dafür wurden Handlingfehler und die Anwesenheit des Kanamycins ausgeschlossen. Dies deutet auf die Überlegenheit des T7-Promotors hin, wodurch erneut der Bedarf eines umfangreichen Screenings von Kombinationen bestätigt wird.

### 5.1.2. Insertnachweis bei fehlender Expression

Um das Vorhandensein des Inserts zu belegen, was die Voraussetzung für eine Expression darstellt, wurde jeweils aus dem ersten Klon der pHI- und pIPTG\_T5-Kombinationen die pDNA isoliert und ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dabei wurde die DNA mit NdeI und Sall verdaut, welche das Insert aus dem Vektor herausschneiden. Da das Insert für das Prähormon in allen getesteten Klonen vorhanden ist (siehe Abbildung 5.3), kann die fehlende Expression daraus nicht herrühren, sondern muss aus den Kombination mit dem Expressionsstamm resultieren.

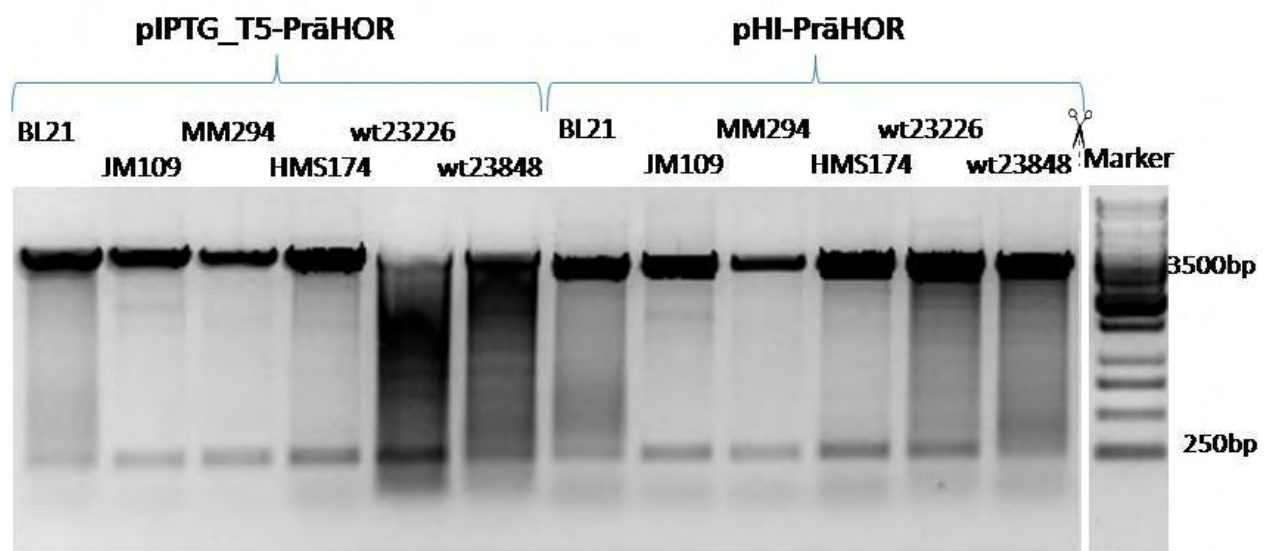


Bild 5.3.: Nachweis des PräHOR-Inserts mittels Restriktionsanalyse bei fehlender Expression

### 5.1.3. Produktnachweis mittels Western Blot

Um auszuschließen, dass Produkt gebildet wurde, obwohl es im Coomassiegel, z. B. auf Grund zu geringer Konzentration, nicht sichtbar ist, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dabei wird mit Hilfe von Antikörpern das Produkt sehr spezifisch detektiert. Es wurden dafür erneut die Proben des ersten Klons der pHI- und pIPTG\_T5-Kombinationen, samt Positivkontrolle aufgetragen. Auf dem Blot (Abbildung 5.4) ist die starke Produktbande der Kontrolle erkennbar, sowie weitere Banden in der Spur. Bei der über der Produktbande gelegenen Bande könnte es sich um ein Dimer des Prähormons handeln, in welchem ebenfalls die Sequenz enthalten ist, gegen die der Antikörper gerichtet ist. Bei den anderen, schwächeren Banden dieser Spur handelt es sich wahrscheinlich um unspezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers.

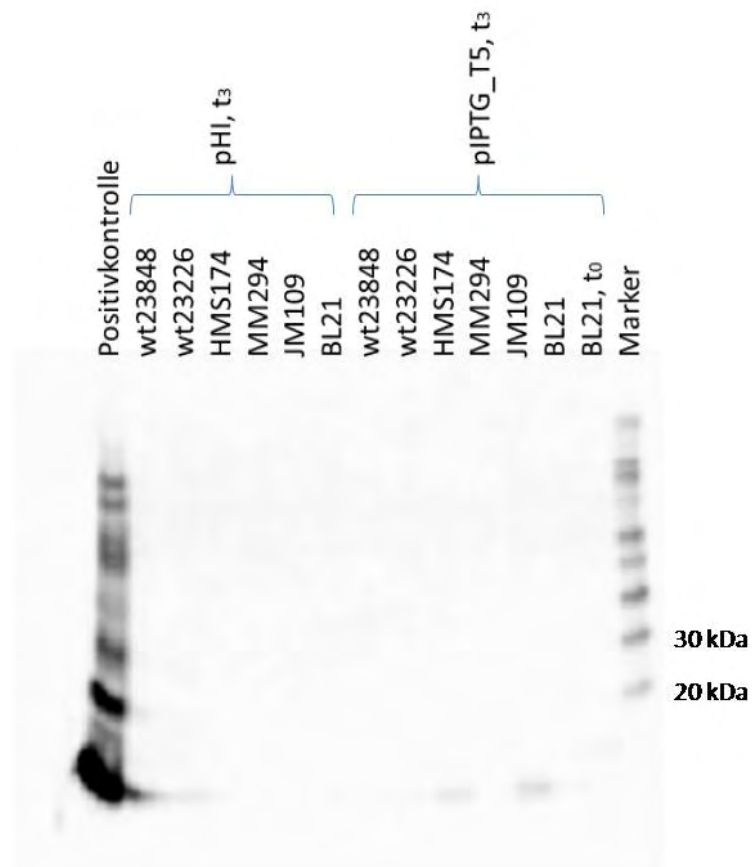


Bild 5.4.: Western Blot zum Nachweis von PräHOR in geringen Konzentrationen

Auch bei den Kombinationen pIPTG\_T5 in JM109 und HMS174 lassen sich sehr schwache Produktbanden erahnen. Diese sind jedoch so zart, dass die beiden Kombinationen an die mit dem pET26b(+) produzierte Menge nicht heranreichen, was ein weiterer Beleg für die Überlegenheit des T7-Systems im Vergleich zum T5-System ist. Der pIPTG\_T5 würde somit auch für eine industrielle Produktion niemals in Frage kommen, wohingegen das T7-System eine breite Verwendung in der Biotechnologie findet.

Durch den Western Blot wurde die Möglichkeit widerlegt, dass viel Produkt gebildet, im Coomassiegel aber nicht sichtbar ist. Es findet nachgewiesenermaßen keine nennenswerte Produktbildung mit pHI und pIPTG\_T5 statt.

### 5.1.4. Plattenvergleich mit Quantifizierung

Um die Expressionsleistung der besten Kombinationen (miteinander) vergleichen zu können wurden Quantifizierungen durchgeführt, und der jeweilige Produktausbeutekoeffizient  $y_{p/x}$  in  $\left[\frac{g \text{ Produkt}}{g \text{ BTM}}\right]$  ermittelt. Unabhängig vom Ergebnis der Wachstumskurven wurden die Expressionstests der besten Produzenten in den drei Platten mit unterschiedlicher Wellengeometrie durchgeführt und verglichen.

Um eine Standardbande mit z. B. 200 ng BSA zu bekommen, wurde eine Stammlösung mit der Konzentration von  $2 \left[\frac{mg}{ml}\right]$  1:10 verdünnt, so dass 1  $\mu$ l 200 ng BSA enthalten. Insgesamt wurde ein 24  $\mu$ l Reaktionsansatz erstellt, von dem die Hälfte auf das Gel aufgetragen wurde. Damit darin 200 ng BSA enthalten sind, muss der Reaktionsansatz 2  $\mu$ l der verdünnten Stammlösung enthalten. Alle anderen Standards wurden auf die gleiche Weise berechnet.

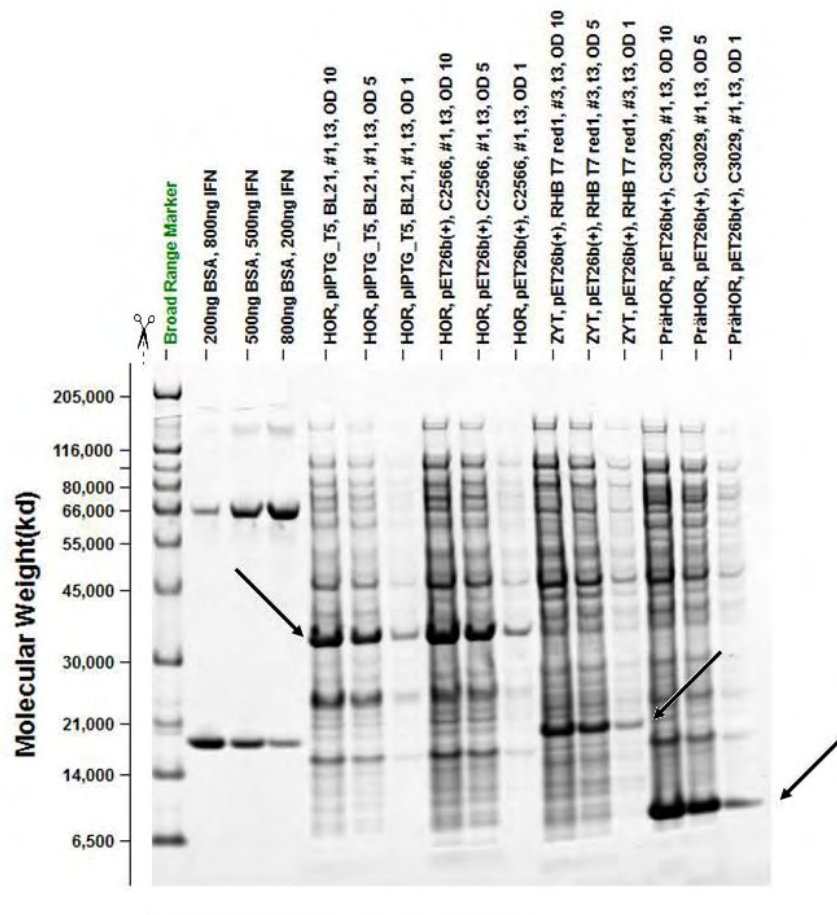


Bild 5.5.: Quantifizierung in der Mikrotiterplatte mit runden Wells

In der Abbildung 5.5 ist Prähormon in pET26b(+) in C3029 in den letzten Spuren aufgetragen. Die OD der Proben betrug 10, 5 und 1, damit auf jeden Fall eine Produktbande im Kalibrierbereich liegt. Ausgewertet wurden nur die Proben mit einer OD von 1, da nur sie innerhalb des Kalibrierbereiches lagen, die anderen Banden waren zu stark.

Außer bei dem schwach exprimierenden pHI kann auf die Auftragung einer auf OD 10 normierten Probe verzichtet werden.

Als Standard für eine Quantifizierung sollte ein ähnlich großes Protein verwendet werden, damit eine möglichst vergleichbare Anzahl basischer Aminosäuren enthalten ist. Die Intensität der Bande resultiert aus der Bindung des Coomassiefarbstoffs an die basischen Aminosäuren. Ein Referenzprotein mit stark abweichendem Molekulargewicht führt auch zu einem abweichenden Ergebnis. Um dies zu demonstrieren wurden zwei Standards aufgetragen, welche sich um ca. 20 kDa unterscheiden, und der eine mit Hilfe des anderen quantifiziert. Dabei wird für die 200 ng Bande des Referenzproteins Interferon eine Produktmenge von 307 ng ermittelt, was einer Abweichung von ca. 54% entspricht. Dieser Wert zeigt, dass die Quantifizierung auch nur einen Richtwert darstellt, wenn nicht mit dem Zielprotein kalibriert wurde.

Die Tabelle 5.2 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung mit dem Produkt Prähormon. Da dieses nur von dem Vektor pET26b(+) gebildet wird, können hier die unterschiedlichen Expressionssysteme nicht mit einander verglichen werden, sondern nur die Expressionsleistung in unterschiedlichen Formen der Mikrotiterplatten.

Anhand der konischen Platte wird eine Beispielrechnung des Produktausbeutekoeffizienten durchgeführt: Eine OD von 1 entspricht ca.  $\left[\frac{0,3 \text{ g BTM}}{l}\right]$ , d. h. in den 13  $\mu\text{l}$  welche in den Ansatz für die SDS-PAGE pipettiert werden, enthalten  $3,9 \cdot 10^{-6}$  g BTM. Davon werden nur drei Viertel aufgetragen, so dass eine Spur auf dem Gel die Proteine aus  $2,925 \cdot 10^{-6}$  g BTM enthält. Da die BTM aus ÜN-Kulturen bestimmt wurde, welche noch keine Expression ausgeführt haben, wird die sonst in den Zellen enthaltene Produktmasse nicht abgezogen. Entspricht die Bande einer Produktmasse von 298,91 ng, ergibt sich durch Division der Produktausbeutekoeffizient von 0,102.

Tabelle 5.2.: Ergebnisse der Quantifizierung mit PrähOR

Platte	Vektor	Stamm	Masse der Bande	OD der Probe	$y_{p/x}$ in $\frac{\text{g Produkt}}{\text{g BTM}}$	End-OD	Ausbeute in mg
konisch	pET	C3029	298,91 ng	1	0,102	2,57	0,236
flach	pET	C3029	296,41 ng	1	0,101	1,85	0,168
rund	pET	C3029	419,31 ng	1	0,143	2,00	0,257

Der Produktausbeutekoeffizient ist bei der konischen und flachen Platten nahezu identisch, so dass in keiner der beiden Platten eine besser Expressionleistung erzielt werden konnte. In beiden Platten bildet 1 g BTM ca. 0,1 g Produkt. Deutlich höher ist der Produktausbeutekoeffizient bei dem Versuch in der runden Mikrotiterplatte, dieser ist um fast 50 % besser. Dieser Sachverhalt könnte aus dem besseren Sauerstoffeintrag resultieren, wodurch auch die Kultur eine höhere OD erreicht.

Die End-OD nach dreistündiger Expression ist ebenfalls in der Tabelle aufgelistet. Unter der Annahme, dass eine OD von 1 gleich  $0,3 \left[ \frac{g \text{ BTM}}{l} \right]$  entsprechen, lässt sich die absolute Ausbeute in mg folgendermaßen berechnen:

$$0,102 \frac{g \text{ Produkt}}{g \text{ BTM}} \cdot 0,3 \frac{g \text{ BTM}}{l} \cdot 2,57 \cdot 0,003 l \cdot 1000 \frac{mg}{g} = 0,236 \text{ mg Produkt}$$

Die Quantifizierung wurde hierbei zwar nicht mit dem Zielprotein als Standard durchgeführt, der daraus resultierende Fehler ist jedoch bei allen Platten gleich. Trotz der recht ungenauen Methode, wird die Tendenz zur runden Platte deutlich, welche sowohl einen höheren Produktausbeutekoeffizienten als auch eine OD abhängige absolute Ausbeute vorweisen kann. Trotzdem überwiegt der Nachteil bei der runden 24-Well-Platte, da die leicht höhere Ausbeute die doppelte Arbeit für das Screening von 48 Proben nicht rechtfertigt. Bei diesem Versuch zeigt sich, dass die Platte mit flachen Wells am schlechtesten abschneidet. Die konische Platte birgt aufgrund der doppelten Anzahl an Wells die meisten Vorteile gegenüber der runden Platte.

## 5.2. Zytokin

### 5.2.1. Expression

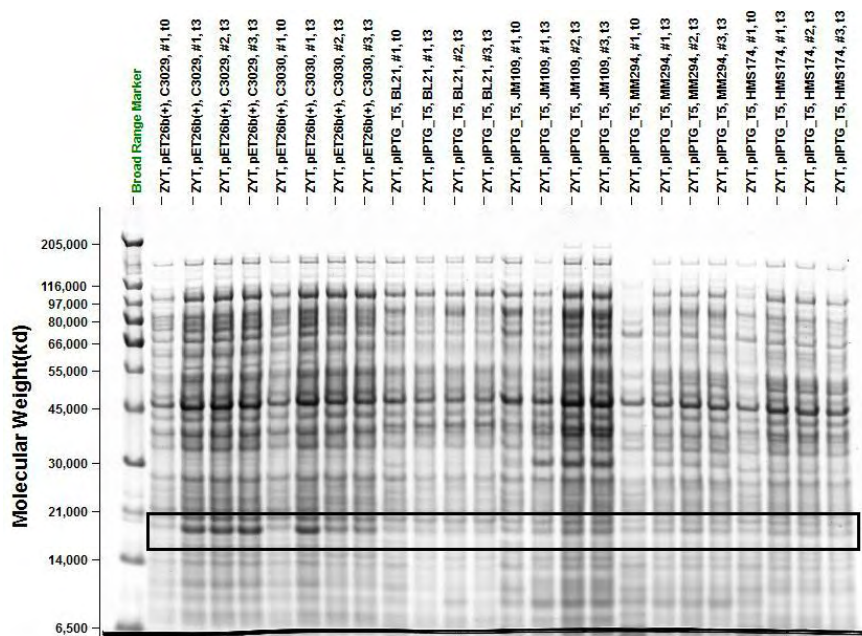


Bild 5.6.: SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pET26b(+) und pIPTG\_T5



Die Ergebnisse der Expressionstests mit Zytokin als Produkt sind in Tabelle 5.5 dargestellt. Auch hierbei hat wieder nur das T7-System gute Ergebnisse zu verzeichnen, in den anderen Expressionssystemen kommt es zu keiner Produktbildung (siehe Abbildung 5.6 und 5.7).

Um auch hier einen negativen Einfluss des Kanamycins auf die Expressionsleistung auszuschließen, wurden jeweils drei Klone mit pHI in BL21 und JM109 mit und ohne Kanamycin untersucht. Aber auch ohne Kanamycin kommt es zu keiner Expression, so dass weitere Gründe dafür untersucht werden mussten. Desweiteren wurde auch hier eine Induktionskontrolle mit einem anderen Produkt durchgeführt um Fehler in der Anwendung auszuschließen. Dabei wurde eine Expression des Proteins nachgewiesen, wodurch auch der Operator als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnte (siehe Abbildung A.11).

Deutlich wird auch, dass die Expressionsleistung im Vergleich zum Prähormon erkennbar schwächer ist, obwohl es sich um den gleichen Vektor und den gleichen Stamm handelt. Es spielen also auch andere, produktabhängige Faktoren eine Rolle bei der Expressionsleistung bzw. der Ausbeute eines Produktes.

Für weitere Versuche wurde der pET26b(+) in RHB T7<sub>red1</sub>, Klon 3 ausgewählt und in der Tabelle 5.5 rot markiert, da die Expressionsbanden etwas stärker sind als die des C3029.

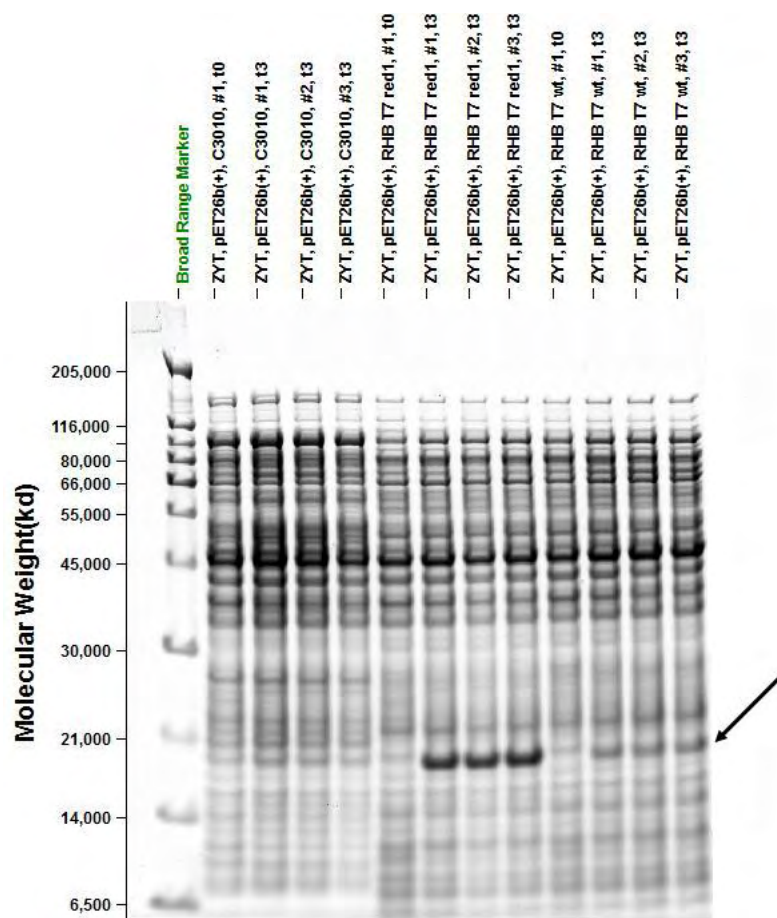


Bild 5.7.: SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pET26b(+)

In Bezug auf die Genotypen der verwendeten Stämme scheint die defiziente Reduktase des RHB T7-Stammes entscheidend zu sein. Außerdem macht es den Anschein, als würde sich die Kombination aus DsbC/defizienten Reduktasen und nicht vorhandenem lysY-Gen des Stammes C3029, im Unterschied zu C3030, positiv auf die Expression auswirken. Desweiteren weisen die drei Klone des C3030 keine ähnlich gute Expressionsleistung auf, was ebenfalls gegen ihre Verwendung spricht. Hierbei war es sinnvoll drei Klone zu testen, da hier Unterschiede aufgetreten sind. Ansonsten sind die Expressionsleistungen der Klone eines Stammes überall ähnlich.

Tabelle 5.3.: Auswertungstabelle der Kombinationen mit ZYT

Vektor	Stamm	Klon 1	Klon 2	Klon3
pHI	BL21	-	-	-
	JM109	-	-	-
	MM294	-	-	-
	HMS174	-	-	-
	wt23226	-	-	-
	wt23848	-	-	-
pIPTG_T5	BL21	-	-	-
	JM109	-	-	-
	MM294	-	(+)	-
	HMS174	-	-	-
	wt23226	-	-	-
	wt23848	-	-	-
pET26b(+)	C2566	+	+	+
	C3010	+	+	+
	C3029	+++	+++	+++
	C3030	+++	++	++
	RHB T7 <sub>red1</sub>	+++	+++	+++
	RHB T7 <sub>wt</sub>	++	++	++

Auch das mittelgroße Produkt Zytokin wird nur durch den pET26b(+)-Vektor exprimiert, wobei die Expressionsbanden deutlich schwächer als beim Prähormon sind. Die fehlende Expression mit pHI und pIPTG\_T5 resultiert weder aus der Anwesenheit von Kanamycin noch aus Handlingfehlern bei der Induktion.

### 5.2.2. Insertnachweis bei fehlender Expression

Mit Hilfe der Abbildung 5.8 wird gezeigt, dass die beim Expressionstest verwendeten Zellen alle das produktcodierende Insert besitzen. Die fehlende Expression der pHI- und pIPTG\_T5-Kombinationen kann dadurch nicht auf die Abwesenheit des Inserts zurückgeführt werden.

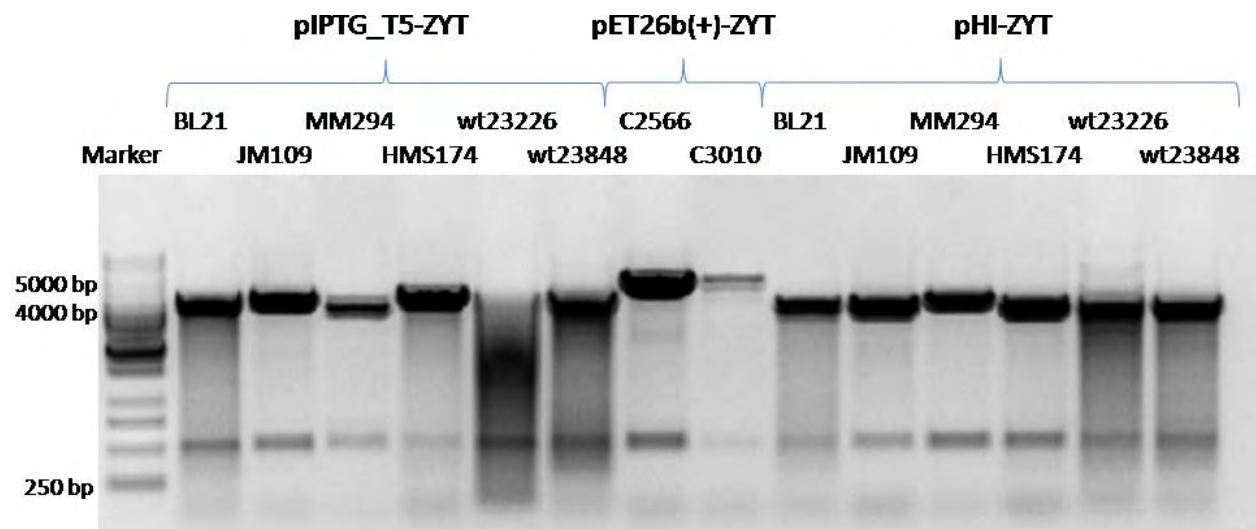


Bild 5.8.: Nachweis des ZYT-Inserts mittels Restriktionsanalyse bei fehlender Expression

### 5.2.3. Produktnachweis mittels Western Blot

Auch beim Zytokin wurde ein Western Blot durchgeführt (Abbildung 5.9) um auch geringe Produktmengen nachweisen zu können. Dabei wurden sowohl bei pHI- als auch bei pIPTG\_T5-Kombinationen schwache Produktbanden sichtbar. Nahezu alle Stämme mit pIPTG\_T5 bilden Produkt, wobei der JM109 der Effizienteste ist. Aber auch diese Bande ist im Vergleich zur Positivkontrolle, welche im Coomassiegel auch nicht sehr stark ist, zu schwach, um Konkurrenz zum T7-System darzustellen.

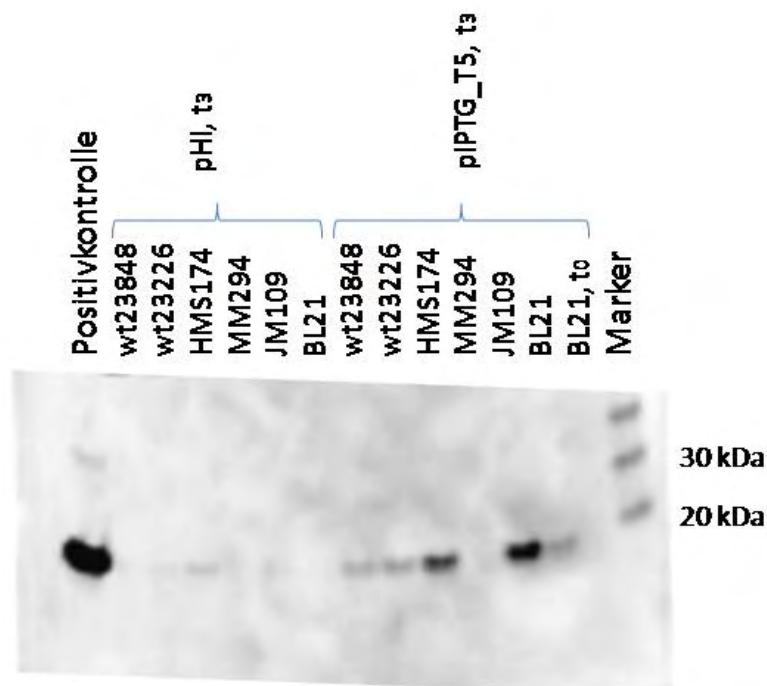


Bild 5.9.: Western Blot zum Nachweis von ZYT in geringen Konzentrationen

#### 5.2.4. Plattenvergleich mit Quantifizierung

Tabelle 5.4.: Ergebnisse der Quantifizierung mit ZYT

Platte	Vektor	Stamm	Masse der Bande	OD der Probe	$y_{p/x}$ in $\frac{g \text{ Produkt}}{g \text{ BTM}}$	End-OD	Ausbeute in mg
konisch	pET	RHB T7 <sub>red1</sub>	178,84 ng	5	0,0122	2,90	0,0318
flach	pET	RHB T7 <sub>red1</sub>	267,67 ng	5	0,0183	1,67	0,0283
rund	pET	RHB T7 <sub>red1</sub>	243,83 ng	1	0,0834	3,06	0,2297

Auch die Ausbeute des Zytokins ist in der konischen und flachen Platte fast um den Faktor 10 geringer als vom Prähormon. Sehr bedeutend stellt sich hier der Unterschied zur runden Platte dar. Aufgrund des viel höheren Produktausbeutekoeffizienten und der höheren End-OD wird eine 10fach höhere Ausbeute erzielt, welche an die des Prähormons heranreicht. Hierbei wäre der doppelte Arbeitsaufwand bei Verwendung der 24-Well-Platte durchaus gerechtfertigt.

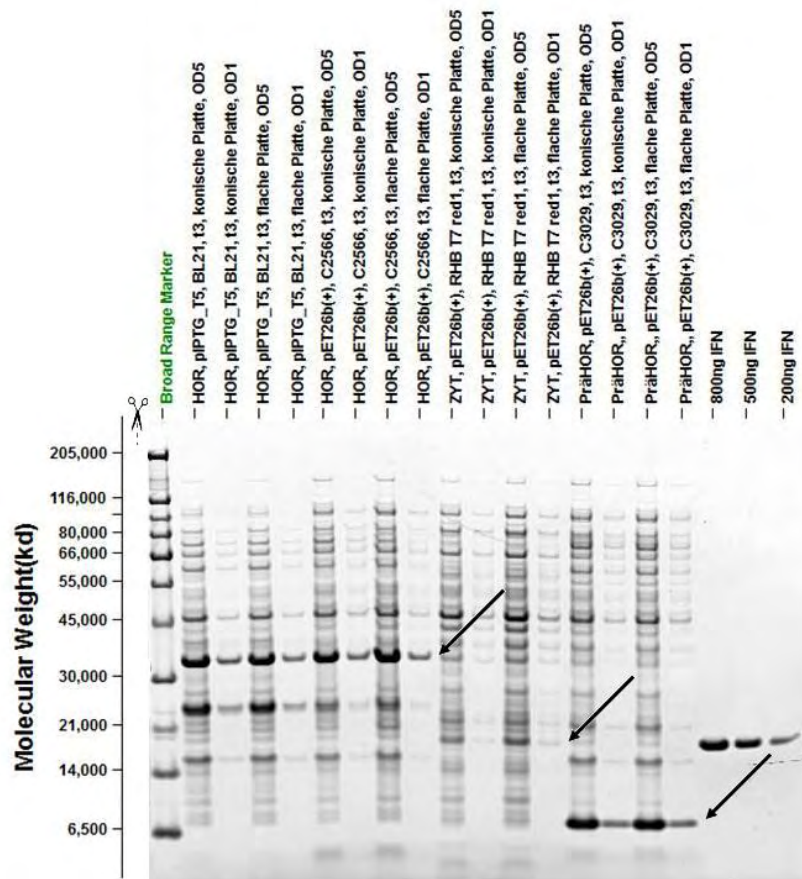


Bild 5.10.: Quantifizierung in Mikrotiterplatten mit flachen und konischen Wells

In der Abbildung 5.10 ist die Quantifizierung des Zytokins in der besten Kombination im Vergleich zu Prähormon und Hormon dargestellt. Dabei wird ebenfalls wie aus Tabelle 5.4 deutlich, dass der Produktausbeutekoeffizient für das Zytokin im Vergleich zum Prähormon um das Zehnfache schwächer ist. Das Ergebnis aus der konischen Platte liegt zwar nicht mehr ganz im Kalibrierbereich, lässt sich als Richtwert zum Vergleich des Expressionsleistung aber trotzdem verwenden.

Dieses mittelgroße Produkt wird in flacher und konischer Platte ähnlich stark exprimiert und in der Platte mit rundem Boden deutlich stärker. Dennoch ist die Expression des Zytokins viel geringer als die des Prähormons.

## 5.3. Hormon

### 5.3.1. Expression

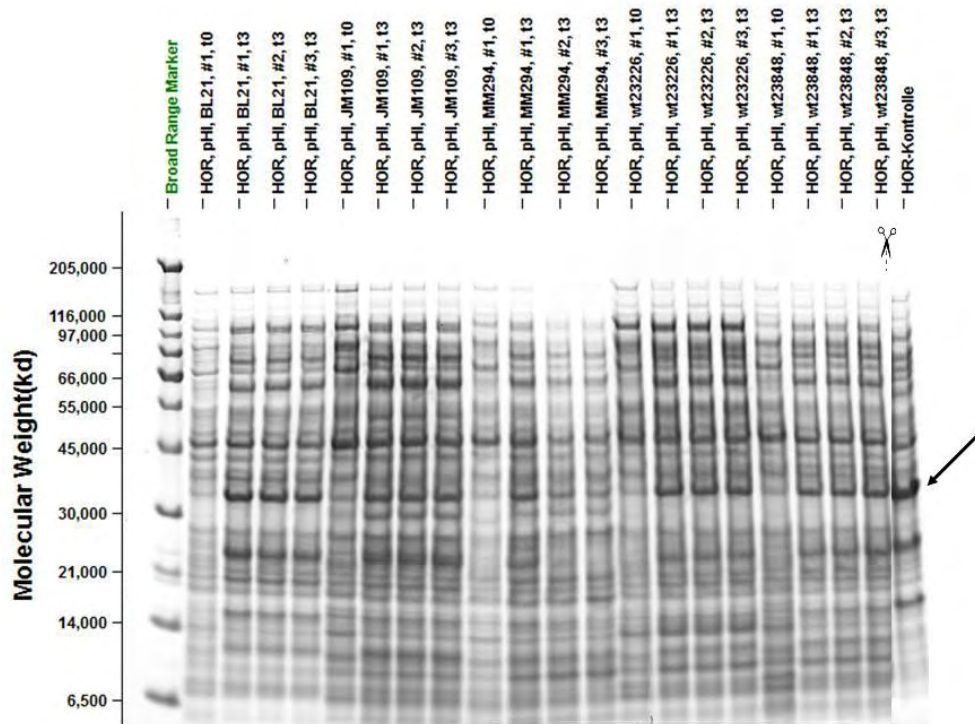


Bild 5.11.: SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pHI

Das Hormon stellt mit seinem Molekulargewicht von ca. 38 kDa ein großes Protein dar und wird im Gegensatz zu den anderen Proteinen in allen drei Expressionssystemen produziert (siehe Tabelle 5.5), selbst mit dem pHI entstehen deutliche Banden (siehe Abbildung 5.11). In der Abbildung kann man ebenfalls erkennen, dass nicht nur das intakte Produkt exprimiert wird, sondern dass auch zwei kleinere Produkte gebildet werden. Dabei könnte es sich evtl. um Abbauprodukte handeln, wobei ein spezifischer Schnitt/-Bruch immer an der gleichen Stelle erfolgen muss, damit das charakteristische Bandenmuster entsteht. Da dieses Bandenmuster jedoch in allen Expressionssystemen und Zellen in ähnlichem Ausmaß entsteht, handelt es sich wahrscheinlich um ein produktspezifisches Phänomen. Da dies nicht Thema der Arbeit ist, wurde es nicht näher untersucht.

Die in der Tabelle rot markierten Kombinationen stellen die besten Produzenten der jeweiligen Kombination dar und werden für weitere Tests verwendet. Von den pHI-Kombinationen wurden drei Verschiedene ausgesucht, da sich der pHI auf Grund der Hitzeinduktion als schwer in der Handhabung erweist (siehe 5.3.3).

Die Ursache für die Expressionsleistung der Stämme liegt vermutlich in den Genotypen.

Das Vorhandensein aller Gene 2.1 wirkt sich tendenziell negativ aus, wie bei dem Stamm C3030. Am meisten Hormon produziert der C2566, welcher nur das Gen für die T7-RNA-Polymerase besitzt und die beiden Proteasen lon und ompT ausgeschaltet hat. Die weiteren Genotypen führen zwar ebenfalls zur Expression, je mehr Gene hierbei inaktiviert/integriert wurden, desto weniger Hormon wird produziert. Sowohl mit pIPTG\_T5 aber auch mit pHI exprimiert der BL21 und die Wildtypen gut. Folglich wirkt sich der Defekt in der ompT-Protease des BL21 positiv auf die Expression aus. Mit den Wildtypstämmen ohne mutierte/deletierte Gene, sowie dem MM294, welchem lediglich das F-Plasmid fehlt, können ebenfalls gute Expressionsleistungen erzielt werden.

Tabelle 5.5.: Auswertungstabelle der Kombinationen mit HOR

Vektor	Stamm	Klon 1	Klon 2	Klon3
pHI	BL21	+++	+++	+++
	JM109	++	++	++
	MM294	+	+	+
	HMS174	+	+	+
	wt23226	+++	+++	+++
	wt23848	+++	+++	+++
pIPTG_T5	BL21	+++++	+++++	+++++
	JM109	+++	+++	+++
	MM294	+++++	+++++	+++++
	HMS174	+++++	+++++	+++++
	wt23226	+++++	+++++	+++++
	wt23848	+++++	+++++	+++++
pET26b(+)	C2566	++++	+++	+++
	C3010	+++	+++	+++
	C3029	+++	+++	+++
	C3030	++	++	++
	RHB T7 <sub>red1</sub>	+++	+++	++
	RHB T7 <sub>wt</sub>	+++	+++	++

Das als großes Protein ausgewählte Hormon wird im Gegensatz zu den anderen Produkten in allen drei Vektoren exprimiert. Die Vektoren pET26b(+) und pIPTG\_T5 sind ähnlich stark, der pHI exprimiert hingegen deutlich schwächer.

Besonders auffällig sind beim pIPTG\_T5 die starken, zusätzlichen Expressionsbanden mit geringerem Molekulargewicht, wobei es sich um Abbauprodukte handeln könnte.

### 5.3.2. Insertnachweis bei fehlender Expression

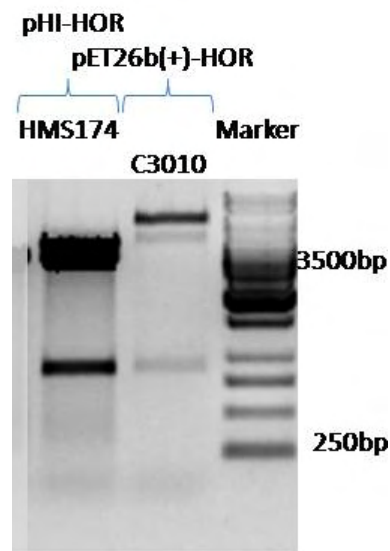


Bild 5.12.: Nachweis des HOR-Inserts mittels Restriktionsanalyse bei fehlender Expression

Die Kombinationen pHI in HMS174 und pET26b(+) in C3010 brachten im ersten Durchlauf keine deutlichen Produktbanden zustande, so dass die pDNA isoliert und die Inserts im Agarosegel nachgewiesen wurden.

Der Grund für die schwache Expression liegt nicht auf DNA-Ebene, da das Produktinsert überall enthalten ist. Die Ursache dafür muss in der Kombination der Expressionskomponenten liegen.

### 5.3.3. Temperaturverlauf bei Hitzeinduktion

Als Grund für die schwächere Expression mit dem pHI wurde die Hitzeinduktion vermutet. Da die Temperatur nur langsam in die Mikrotiterplatten übergeht (siehe Abbildung 4.11), wurde der Temperaturverlauf aufgenommen und überprüft.

Bei den anderen Produkten wurde die Induktion über die Induktionskontrolle belegt, wobei auch die zu langsam erhöhte Temperatur einen Einfluss gehabt haben könnte.

In der Abbildung 5.13 ist der Temperaturverlauf und die Temperatureinstellung des Brutschrankes bei Hitzeinduktion dargestellt. Dafür wurde ein Thermometer im mediumgefüllten Referenzwell mitgeführt.

Um die für das Wachstum vorgesehenen 30°C im Well zu erreichen, muss der Brutschrank auf 33°C eingestellt werden. Das zweistündige Wachstum vor Induktion findet allerdings nur gut eine Stunde bei 30°C statt, wenn das Medium Raumtemperatur hatte und nicht vorgewärmt war. Dadurch wird bei Verwendung des pHI meist ein längerer Zeitraum



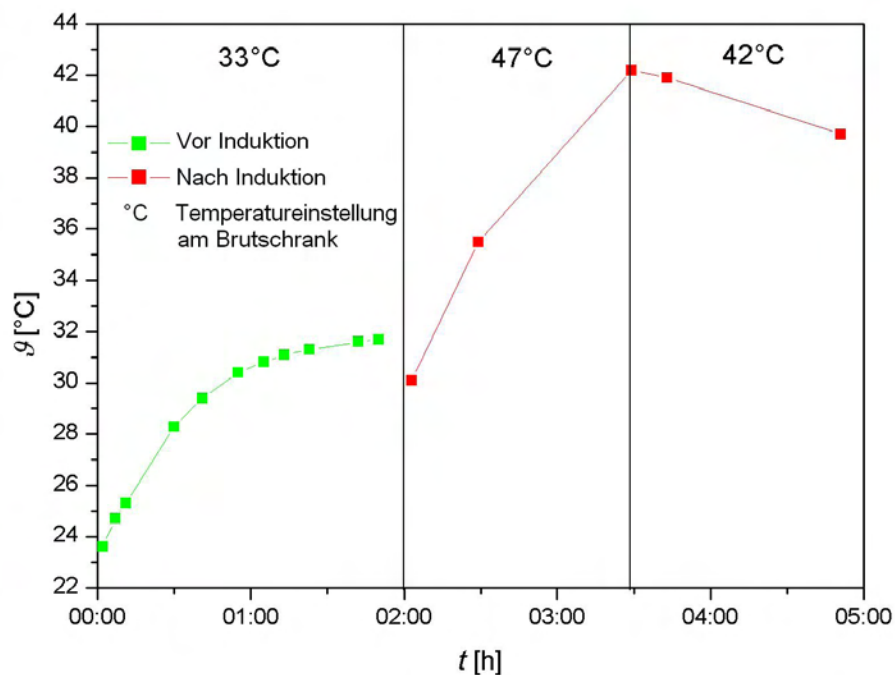


Bild 5.13.: Temperaturverlauf bei Hitzeinduktion

benötigt um die Induktions-OD zu erreichen. Durch die Probennahme vor der Induktion kühlt das Medium bzw. die Kultur währenddessen um ca. 3°C ab und soll danach bei 42°C induziert werden. Um die Temperatur schneller zu erlangen, wird der Brutschrank auf 47°C eingestellt, wobei zum Erreichen der Induktionstemperatur trotzdem immer noch 1,5 Stunden benötigt werden. Mit Erreichen der 42°C sollte der Brutschrank trotzdem nicht auf 42°C eingestellt werden, da die Temperatur der Kultur sonst in den nächsten 1,5 Stunden wieder auf ca. 40°C abfällt.

Aus dem späten Erreichen der Induktionstemperatur resultiert eine geringere Expressionsleistung, wodurch die schwächeren Produktbanden zustande kommen. Außerdem handelt es sich deshalb bei der  $t_3$  Probe erst um eine  $t_{1,5}$  Probe, da erst 1,5 Stunden einer realen Induktion und somit Produktbildung vergangen sind. Dadurch lassen sich die anderen Systeme mit dem Hitzeinduzierbaren nur bedingt vergleichen.

#### 5.3.4. Produktnachweis mittels Western Blot

Auch bei dem Hormon wurde ein Western Blot mit den schwächsten Kombinationen durchgeführt. Dieser war jedoch völlig überladen und zeigte in der gesamten Spur der Positivkontrolle ein starkes, überbranntes Signal, was auf eine unspezifische Reaktionen des Antikörpers hindeutet.

Da im Coomassiegel alle Banden gut zu erkennen waren, wurde auf einen weiteren Produktnachweis mittels Western Blot verzichtet.

### 5.3.5. Plattenvergleich mit Quantifizierung

Tabelle 5.6.: Ergebnisse der Quantifizierung mit HOR in pET26b(+) in C2566 und HOR in pIPTG\_T5 in BL21

Vektor und Stamm	Platte	Masse Bande 1	Masse Bande 2	Masse Bande 3	OD der Probe	$y_{p/x}$ Bande 1	$y_{p/x}$ Summe
pET in C2566	konisch	658,11 ng	298,53 ng	173,92 ng	5	0,0450	0,0773
	flach	820,06 ng	333,58 ng	207,92 ng	5	0,0561	0,0931
	rund	784,67 ng	402,28 ng	342,81 ng	5	0,0537	0,1046
pIPTG in BL21	konisch	722,00 ng	635,62 ng	280,08 ng	5	0,0494	0,112
	flach	632,80 ng	579,67 ng	228,48 ng	5	0,0433	0,0985
	rund	741,07 ng	426,81 ng	210,89 ng	5	0,0507	0,0943

Tabelle 5.7.: Ergebnisse der Ausbeuteberechnung mit HOR in pET26b(+) in C2566 und HOR in pIPTG\_T5 in BL21

Vektor und Stamm	Platte	End-OD	$y_{p/x}$ Bande 1	Ausbeute Bande 1 in mg	$y_{p/x}$ Summe	Ausbeute Summe in mg
pET in C2566	konisch	2,95	0,0450	0,119	0,0773	0,205
	flach	2,33	0,0561	0,118	0,0931	0,195
	rund	3,56	0,0537	0,172	0,1046	0,335
pIPTG in BL21	konisch	2,53	0,0494	0,112	0,112	0,255
	flach	2,28	0,0433	0,089	0,0985	0,202
	rund	5,25	0,0507	0,240	0,0943	0,446

Sowohl bei der Expression vom Hormon in pET26b(+), als auch in pIPTG\_T5 entstehen drei Produktbanden (siehe Abbildung 5.10), so dass alle drei quantifiziert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.6 dargestellt. Die oberste Bande weist immer das stärkste Signal auf und stellt das intakte Produkt dar. Deshalb wurde der Produktausbeutekoeffizient dafür berechnet. Da die anderen Banden jedoch scheinbar auch mit der Expression zusammenhängen und Produktfragmente darstellen, wurde auch die Summe der drei Massen berechnet und ein Produktausbeutekoeffizient für die Gesamtheit der drei Banden bestimmt.

Bei beiden Vektoren ist  $y_{p/x}$  der 1. Bande unabhängig von der Plattengeometrie fast gleich.  $y_{p/x}$  der Summe bei Verwendung des pET26b(+)-Vektors ist bei der runden Wellform wieder etwas besser, der pIPTG\_T5 exprimiert in der konischen Platte geringfügig mehr Hormon. In Bezug auf die erste Bande zeigt der pET26b(+) eine höhere Ausbeute, die Summe der Banden ist jedoch im Schnitt in dem Vektor pIPTG\_T5 etwas größer.

Da die Ausbeute von der erreichten End-OD der Kultivierung abhängt, wurde sowohl für die erste Bande, als auch für die Summe der Banden die absolute Ausbeute in mg berechnet. Sowohl in Bezug auf die erste Bande, als auch auf die Summe der Banden wird

in der runden Platte am meisten Ausbeute erzielt. Insgesamt ist ebenfalls der pIPTG\_T5 etwas stärker in der Expressionsleistung als der pET26b(+). Im Vergleich zum Prähormon ist die Ausbeute der 1. Bande etwas schwächer, die der Summe ungefähr gleich. Für die Herstellung eines wirksamen Medikamentes kann jedoch nur das Protein verwendet werden, welches intakt ist und auf der richtigen Höhe läuft. Sollte die Ursache für den gleichmäßigen Abbau des Hormons nicht gefunden werden, sind nur die Werte für die 1. Bande relevant und aussagekräftig. Die anderen Banden stellen unwirksame Abbauprodukte dar, welche es gilt abzutrennen.

Der pHI wurde mit HOR in drei verschiedenen Stämmen getestet und die Ergebnisse in Tabelle 5.8 dargestellt. Trotz Normierung der Proben auf OD10 liegen manche Banden unterhalb des Kalibrierbereiches. Dadurch wird auch der Produktausbeutekoeffizient sehr gering. Desweiteren lässt sich an Hand des  $y_{p/x}$  keine wirkliche Tendenz zu einer Wellform erkennen. Alle Werte sind so niedrig und unterscheiden sich innerhalb eines Stammes höchstens um  $0,0029 \left[ \frac{g \text{ Produkt}}{g \text{ BTM}} \right]$ .

In Bezug auf die am Ende erreichte OD ist die absolute Ausbeute sehr gering und liegt sogar noch unterhalb der vom Zytokin. Desweiteren ist im Vergleich der Stämme untereinander kein großer Unterschied erkennbar. Lediglich der wt23226 in der runden Mikrotiterplatte ist mit der doppelten Ausbeute ein Ausreißer.

Auffällig bei dem pHI ist die höhere End-OD im Vergleich zu den anderen Vektoren. Der BL21 bspw. weist mit dem gleichen Produktinsert aber anderen Vektoren ein unterschiedliches Wachstumsverhalten auf. Durch Zugabe des Induktionsmittels IPTG kommt es zu einer Stagnation des Wachstums. Die Induktion des pHI durch Temperaturerhöhung scheint das Wachstum zwar zu verlangsamen, nicht jedoch zu stoppen.

Obwohl der pHI den Vorteil des Weiterwachsens besitzt, stellt er keine Alternative zu den beiden anderen Vektoren dar. Zum einen lässt sich mit ihm nur das große Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 38 kDa exprimieren, und zudem ist er nicht sehr konsistent und exprimiert nicht reproduzierbar. Das wird durch den Vergleich der Abbildungen A.17 und 5.11 deutlich. Die auf dem einen Gel gut sichtbaren und recht stark ausgeprägten Banden sind auf dem anderen Gel trotz gleichen Versuchsaufbaus bei ca. 38 kDa nur schwierig zu erkennen.

Das Hormon-Protein wird also sowohl im pET26b(+), als auch im pIPTG\_T5 unabhängig von der Wellform der Mikrotiterplatte ungefähr gleich stark exprimiert. Der pHI produziert ebenfalls das Zielprotein Hormon, und besitzt den Vorteil dass die Zellen auch nach Induktion deutlich weiter wachsen. Dennoch erzielt der pHI eine viel geringere Ausbeute und exprimiert nicht reproduzierbar. Durch eine Optimierung ließen sich die Probleme mit dem pHI eventuell minimieren, so dass auch hier ein breites Screening vieler Kombinationen sinnvoll erscheint.

Tabelle 5.8.: Ergebnisse der Quantifizierung und Ausbeuteberechnung mit HOR in pHI

Vektor und Stamm	Platte	Masse der Bande	OD der Probe	$y_{p/x}$ in $\frac{g \text{ Produkt}}{g \text{ BTM}}$	End-OD	Ausbeute in mg
pHI in BL21	konisch	175,94 ng	10	0,00602	3,76	0,0204
	flach	144,40 ng	10	0,00494	3,05	0,0136
	rund	156,46 ng	10	0,00535	4,16	0,0200
pHI in wt23226	konisch	193,13 ng	10	0,00660	3,40	0,0202
	flach	264,80 ng	10	0,00905	2,86	0,0233
	rund	227,89 ng	10	0,00950	4,88	0,0417
pHI in wt23848	konisch	223,11 ng	10	0,00763	3,38	0,0232
	flach	150,39 ng	10	0,00514	2,93	0,0156
	rund	188,30 ng	10	0,00644	4,33	0,0251

## 5.4. Reproduzierbarkeit mit neuem Produkt

Aus den vorherigen Versuchen geht hervor, dass der pET26b(+)-Vektor mit dem T7-System den anderen Vektoren überlegen ist. Als einziger Vektor exprimiert er kleine und mittelgroße Proteine, aber auch das große Hormon produziert er zuverlässig. Da er beim Prähormon und Zytokin außer Konkurrenz steht, werden die Expressionssysteme mit dem Hormon näher betrachtet. Dabei sind die Vektoren pET26b(+) und pIPTG\_T5 die stärksten Produzenten. Um dieses Ergebnis zu reproduzieren, wurde ein weiteres, großes Hormonprotein (32 kDa) in die drei Vektoren kloniert und in die besten Stämme transformiert.

Das Testhormon lag bereits in pHI und BL21 vor, was nicht durch eine pDNA-Preparation und Restriktionsanalyse kontrolliert wurde. Im pIPTG\_T5 lag das Testhormon ebenfalls bereits vor. Vor der Transformation in den BL21 wurde die DNA jedoch noch isoliert und verifiziert. In den pET26b(+)-Vektor musste das Testhormon ganz neu kloniert und in den C2566 transformiert werden. Die zugehörigen Gelbilder befinden sich im Anhang.

Aus der Abbildung 5.14 wird deutlich, dass mit dem Testhormon ein ganz anderes Ergebnis erzielt wurde. Im Gegensatz zum anderen Hormon zeigt der pIPTG\_T5 hier überhaupt keine Expression. Der pHI hingegen hat das Testhormon in großen Mengen produziert und kann sogar eine stärkere Bande als der ebenfalls gut exprimierende pET26b(+) vorweisen. Desweiteren kann man aus der Abbildung entnehmen, dass der pHI auch bei niedrigen Temperaturen Produkt bildet, da auch in der  $t_0$ -Probe eine Expressionsbande zu erkennen ist. Der Promotor wird daher als undicht bezeichnet.

Auf die Suche nach der Ursache für die fehlende Expression mit dem pIPTG\_T5, sowie die Durchführung eines Western Blots wurde verzichtet.

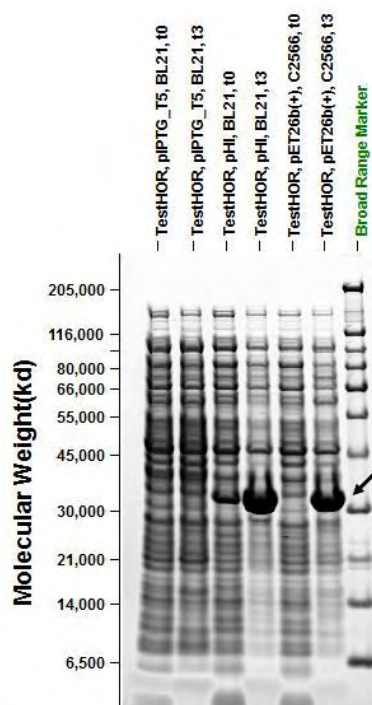


Bild 5.14.: Expression mit TestHOR als Reproduzierbarkeitsversuch

Im Vergleich zu Abbildung 5.5 und Tabelle 5.6 wurden folgende Werte geschätzt, da keine Quantifizierung durchgeführt wurde.

Tabelle 5.9.: Schätzwerte des Reproduzierungsversuchs

Vektor und Stamm	$y_{p/x}$ in $\frac{g \text{ Produkt}}{g \text{ BTM}}$	End-OD	Ausbeute in mg
pET26b(+) in C2566	0,5	5,52	2,48
pHI in BL21	0,8	6,79	4,89

Der Ausbeutekoeffizient  $y_{p/x}$  des pHI wurde mit ca. 0,8  $[\frac{g \text{ Produkt}}{g \text{ BTM}}]$  etwas höher als der des pET26b(+) angenommen. Da auch die End-OD des pHI deutlich höher lag als die des pET26b(+) wird fast doppelt so viel Ausbeute mit dem pHI erzielt. Durch Verwendung eines anderen Stammes, der Kultivierung in einer besser geeigneten Platte, oder durch eine schnellere Temperaturinduktion, könnte die Ausbeute von fast 5 mg evtl. noch gesteigert werden.

Trotz verwandtem Protein mit ähnlichem Molekulargewicht ist die Expressionsleistung der verschiedenen Systeme nicht vorherzusehen. Die Größe des Produktes stellt folglich kein Kriterium dar, nach dem im Vorfeld eine besonders geeignete Kombination ausgesucht werden kann. Ein Screening möglichst vieler Kombinationen ist in jedem Fall unumgänglich. Dabei reicht es jedoch völlig aus, zwei bis drei Klone pro Kombination zu testen, da sie sich untereinander kaum unterscheiden, wie die Ergebnisse eindeutig belegen. Um ein derartiges Probenvolumen rationell bearbeiten zu können, eignet sich die hier beschriebene Screening-Methode in Mikrotiterplatten, wodurch viel Zeit, Platz und Material eingespart werden kann und somit der Aufwand deutlich limitiert wird.

## 6. Zusammenfassung

Für die Entwicklung einer Screeningmethode in Mikrotiterplatten ist auch die OD-Messung in Mikrotiterplatten unabdingbar. Mit Hilfe einer selbst erstellten Regressionsgerade wurden die von Multireader ermittelten Werte in  $OD_{600}$ -Werte bei einer Küvetten-schicktdicke von 1 cm umgerechnet. Diese Methode spart trotz erforderlichen Umrechnungen viel Zeit und ermöglicht einen hohen Probendurchsatz.

Die Wachstumskurven von Kultivierungen in Mikrotiterplatten weisen keine steile exponentielle Phase auf und führen zu einer viel geringeren End-OD als bei Schüttelkolbenversuchen. Als Ursache dafür wurde der schlechte Sauerstoffeintrag, sowie der langsame Wärmeübergang ins Medium identifiziert. Wichtig für den  $O_2$ -Eintrag ist das Verhältnis von Kolben- zu Mediumvolumen. Im Schüttelkolben beträgt es 0,1, durch die kleinen Wells kommt in Mikrotiterplatten lediglich ein Verhältnis von 0,6 zustande.

Desweiteren wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Kanamycin bei der Kultivierung keinen Einfluss auf das Wachstum und Produktbildung der Bakterien hat.

Die nachfolgenden Ergebnisse zeigen, wie wichtig das Screening zahlreicher Kombinationen ist.

Sowohl das kleine Protein Prähormon (ca. 10 kDa), als auch das mit ca. 20 kDa als mittelgroß zählende Zytokin wurden nur durch das T7 Promotersystem im pET26b(+)-Vektor exprimiert. Weder mit pHI, noch mit pIPTG\_T5 kommt es zur Bildung der beiden Produkte. Als Ursache für die nicht erfolgte Expression wurden das Fehlen des Inserts auf DNA-Ebene in beiden Fällen ausgeschlossen. Durch die Induktionskontrollen wurde auch die Möglichkeit von Fehlern bei der Hitzeinduktion widerlegt. Desweiteren hat die Anwesenheit von Kanamycin keinen negativen Einfluss auf die Expression, da auch ohne Kanamycin keins der beiden Produkte gebildet wurde. Die durchgeführten Western Blots belegen, dass mit pHi und pIPTG\_T5 kein Protein detektiert werden konnte.

Die Quantifizierung beim Prähormon ergibt, dass der Produktausbeutekoeffizient  $y_{p/x}$  bei Verwendung der runden Platte am höchsten ist. Bei der auf die End-OD bezogene absolute Ausbeute schneiden konische und flache Platte ähnlich gut ab, die flache Platte fällt eindeutig raus. Bei diesem Produkt ist also die Expression in konischer Platte zu bevorzugen, da in ihr doppelt so viele Klone wie in der runden Platte gleichzeitig getestet werden können.

Auch bei der Quantifizierung des Zytokin-Proteins weist die flache Platte die geringsten Werte auf. In der runden Platte ist sowohl  $y_{p/x}$ , als auch die End-OD sehr hoch, was zu einer zehnfach höheren absoluten Ausbeute als in der konischen Platte führt. Hierbei scheint also die konische Platte die meisten Vorteile zu bergen.

Auffällig beim Vergleich zwischen Prähormon und Zytokin ist, dass trotz Verwendung der gleichen Vektor-Stamm-Kombination viel weniger Zytokin als Prähormon gebildet

wurde.

Das als großes Protein ausgewählte Hormon wird im Gegensatz zu den anderen Produkten in allen drei Vektoren exprimiert. Die Vektoren pET26b(+) und pIPTG\_T5 sind ähnlich stark, wobei besonders auffällig die starken, zusätzlichen Expressionsbanden mit geringerem Molekulargewicht sind. Der pHI exprimiert hingegen deutlich weniger. Als Grund dafür wurde eine Temperaturverlaufskurve aufgezeichnet. Daraus geht hervor, dass der Brutschrank auf eine viel höhere, als die im Medium erwünschte, Temperatur eingestellt werden muss. Aus dem Zeitverlust durch die langsamere Temperaturerhöhung könnten die schwächeren Banden des pHI resultieren. Die nach dreistündiger Expression entnommenen Zellen haben daher erst 1,5 h exprimiert. Durch den verzögerten Start der Expression ist eine geringe Produktbildung zu erwarten .

Beim pET26b(+) und pIPTG\_T5 stellt sich für die Quantifizierung die Frage, ob nur die erste Expressionsbande auf der richtigen Höhe, oder alle Banden als Summe berücksichtigt werden müssen. Bei den zusätzlichen Banden handelt es sich wahrscheinlich um Degradationsprodukte. Da es sich dabei dann jedoch nicht um ein intaktes und verwertbares Produkt handelt, es sei denn der charakteristische Abbau kann unterbunden werden, ist die Betrachtung der ersten Bande relevanter. Bei der ersten Bande sind beide Vektoren unabhängig von der Wellgeometrie in Bezug auf  $y_{p/x}$  gleich.  $y_{p/x}$  der Summe zeigt bei pET26b(+) eine Tendenz zur runden Platte, bei pIPTG\_T5 zur konischen. Die absolute Ausbeute unter Berücksichtigung der End-OD ist bei beiden Vektoren sowohl bei der ersten Bande, als auch bei der Summe in der runden Platte am höchsten.

Mit dem pHI wurden jeweils drei Stämme in den drei Platten mit unterschiedlichen Wellformen getestet. Sowohl  $y_{p/x}$  als auch die absolute Ausbeute sind allgemein sehr gering. Der wt23226 zeigt Präferenz zur runden Platte, ansonsten sind alle anderen Kombinationen recht ähnlich.

Da der pHI beim ersten Expressionstest mit allen Kombinationen in der konischen Platte deutlich stärkere Bänder als bei der Wiederholung für die Quantifizierung aufweist, scheint der pHI nicht reproduzierbar zu exprimieren. Aus diesem Grund stellt er beim Hormon keine Alternative zu den anderen Vektoren dar. Seine schwächere Expressionsleistung resultiert vermutlich aus der verzögerten Induktion auf Grund des langsamen Wärmetransport ins Medium. Trotz der Möglichkeit zur Optimierung ist der pHI ungeeignet für eine Produktion des Hormons in größerem Maßstab.

Um beurteilen zu können, ob die Versuchsergebnisse auch mit einem anderen, großen Hormon-Protein reproduziert werden können, wurde es in die drei Vektoren kloniert und in die besten Stämme transformiert. Trotz verwandtem Protein mit ähnlichem Molekulargewicht kam es dabei nicht zu einer ähnlichen Expression wie bei dem Hormon. Der pIPTG\_T5, welcher wiederum sehr viel Hormon produziert hat, zeigt hier keine Produktbande. Der pET26b(+) liefert sehr zuverlässig auch hier eine sehr starke Bande. Besonders erstaunlich ist das Ergebnis des pHI. Er exprimiert nicht nur, sondern dermaßen effizient, dass die Bande sogar deutlich stärker ist als die des pET26b(+)-Vektors. Hinzu kommt, dass bei der Kultivierung eine recht hohe End-OD erreicht wurde, so dass eine absolute Ausbeute von geschätzten 5 mg erreicht wurde. Dieses Resultat ist auf Grund der vorher-

rigen Ergebnisse ausgesprochen überraschend. Zur Sicherheit sollte der Versuch jedoch wiederholt werden, um auszuschließen, dass der pHI auch hier im zweiten Durchgang einiges seiner Expressionsleistung eingebüßt hat.

Es macht daher Sinn eine große Anzahl von Kombinationen aus Genotypen und Promotoren für ein Produkt zu testen, da nicht pauschal ein Element als besonders vielversprechend oder ungeeignet angesehen werden kann. Denn trotz verwandtem Protein mit ähnlichem Molekulargewicht ist die Expressionsleistung der verschiedenen Systeme nicht vorherzusehen. Die Größe des Produktes stellt folglich kein Kriterium dar, nach dem im Vorfeld eine besonders geeignete Kombination ausgesucht werden kann. Ein Screening möglichst vieler Kombinationen ist in jedem Fall unumgänglich. Dabei reicht es jedoch völlig aus, zwei bis drei Klone pro Kombination zu testen, da sie sich untereinander kaum unterscheiden. Um dieses Probenvolumen rationell bearbeiten zu können, wurde in dieser Arbeit eine effiziente Screening-Methode in Mikrotiterplatten etabliert, wodurch viel Zeit, Platz und Material eingespart werden kann.

Die Selektion der entsprechenden Platte hängt davon ab, ob das Ziel darin besteht, viele Klone gleichzeitig zu untersuchen, oder ob eine besonders hohe Ausbeute erzielt werden soll. Bei letzterem eignet sich die Platte mit den runden Wells besser, für ein umfangreicheres Screening erweist sich die konische Platte als geeigneter.



## 7. Ausblick

Mit zunehmendem Marktanteil von Biopharmaka wird die Suche nach einer geeigneten Produktionskombination immer bedeutender. Damit eine Firma konkurrenzfähig bleiben kann, sollte sie ständig auf der Suche nach besseren Produzenten als die der Mitbewerber sein.

Die Versuche zeigen, wie sinnvoll es ist, viele verschiedene Kombinationen aus Vektor und Stamm für ein Produkt zu testen. Durch die unvorhersehbaren Ergebnisse können keine bestimmten Kombinationen zuverlässig definiert werden, welche besonders überzeugen/unvorteilhaft sind. Für jedes Produkt sollte im Vorfeld ein umfassendes Screening durchgeführt werden, unabhängig von der Produktgröße. Diese ist nur bedingt aussagekräftig, denn die Expression hängt auch von vielen anderen Faktoren ab. Damit sich der entsprechende Arbeitsaufwand im Rahmen hält, wird die Möglichkeit eines rationalen Screenings immer wichtiger. Durch die Verwendung von Mikrotiterplatten, mit denen bis zu 48 Klone gleichzeitig untersucht werden können, wird Zeit eingespart und somit im kommerziellen Sektor erfolgreich gearbeitet.

Um die Expressionstests in den Mikrotiterplatten vergleichbarer mit Versuchen in Schüttelkolben zu machen, könnte die Methode weiter optimiert werden. Dafür ist es wichtig, den Sauerstoffeintrag zu erhöhen. Um dies zu erreichen, könnten folgende Faktoren verändert, bzw. optimiert werden:

1. Durch weniger Medium wird das Verhältnis von Kolben- zu Mediumvolumen verbessert und eine höhere Schüttelfrequenz ermöglicht.
2. Eine Schrägstellung der Platte vergrößert die Oberfläche und damit den Sauerstoffeintrag.
3. Weitere Klebefolien könnten getestet werden, falls sie sich in der Sauerstoffdurchlässigkeit unterscheiden.

Eine Optimierung im kleinen Format ist auf jeden Fall lohnenswert. In der nachfolgenden Fermentation verhalten sich die Zellen durch das Up-Scaling und variierte Parameter wie Medium, Sauerstoffeintrag, Antischaummittel oder Zufütterung zwar anders, die Optimierung hierbei ist jedoch sehr viel aufwendiger. Daher sollte sie so weit wie möglich im frühen Stadium des Screenings und der Selektion einer erfolgreichen Produkt-Vektor-Stamm-Kombination erfolgen.

Desweiteren würden bessere, modernere Geräte die Arbeiten erleichtern und die Methode optimieren. Ein Multireader mit monochromatischer Lichtquelle und automatischer

Umrechnung auf OD<sub>600</sub>-Werte bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter würde Abhilfe schaffen. Aber auch ein kleinerer Schüttelinkubator, der schneller heizt und die Temperatur in den Wells eher erreicht, wäre von Vorteil.

Trotz des gut funktionierenden Expressionssystems mit *E.coli* wird auch nach anderen Systemen für die Produktion rekombinanter Proteine gesucht. Für diese gentechnische Proteinproduktion mit Eukaryoten werden bspw. Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* bereits erfolgreich eingesetzt. Aber auch in Insekten-, Säuger- oder Pflanzenzellen kann die Proteinproduktion stattfinden. Dabei stellt die Glykosylierung einen entscheidenden Vorteil gegenüber der Produktion mit *E.coli* dar, wobei solche Expressionssysteme teurer und viel aufwendiger sind.

Eine relativ neue, umstrittene Arbeitsrichtung ist das Pharming, bei dem transgene Lebewesen als Wirtsorganismus für die Proteinsynthese fungieren. So ein transgenes Tier enthält in all seinen Zellen ein kloniertes Gen. Dadurch ließen sich bereits rekombinante Proteine in der Milch von Kühen oder in Hühnereiern erzeugen. (Brown, 2011, S. 215-219)

Diese alternativen Methoden der Proteinproduktion stecken jedoch noch in den Anfängen. Möglicherweise werden sie nie in dem Maße für die Produktion Verwendung finden wie der Prozess mit *E.coli*. Dieser ist weitgehend optimiert und überall etabliert. Obwohl nach Alternativen zu *E.coli* gesucht wird, stellt dieses Bakterium trotzdem derzeit das effizienteste Medium dar. Eine Bakterienkultur ist sehr leicht, kostengünstig und unkompliziert anzuziehen. Innerhalb sehr kurzer Zeit können hohe Zellkonzentrationen erreicht werden. Desweiteren lassen sich dabei hohe Produktausbeuten erzielen.

Durch die langjährige Nutzung des Modellorganismus *E.coli* ist sein Genom entschlüsselt und in vielen verschiedenen Genen verändert. Die einzelnen Stämme wurden dahingehend modifiziert und verbessert, eine noch größere Menge an stabilerem, aktiven Produkt zu exprimieren. Außerdem wurden viele verschiedene Klonierungsvektoren entwickelt, die das gleiche Ziel verfolgen.

Um aus dieser Vielzahl an möglichen Kombinationen das beste System für ein Produkt zu identifizieren ist ein Screening unerlässlich. Damit sollte ein möglichst breites Spektrum abgedeckt werden, da die Ergebnisse nicht vorhersehbar sind und ein Expressionssystem sehr komplexen Einflüssen unterliegt.

Mit dieser Arbeit wurde eine effiziente Methode etabliert und gleichzeitig die immense Bedeutung eines umfassenden Screenings für einen erfolgreichen Produktionsprozess aufgezeigt.

# Literaturverzeichnis

- [Antranikian 2006] ANTRANIKIAN, G.: *Angewandte Mikrobiologie*. Heidelberg : Springer-Verlag, 2006
- [Brown 2011] BROWN, T. A.: *Gentechnologie für Einsteiger*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2011
- [Chmiel 2011] CHMIEL, H.: *Bioprozesstechnik*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2011
- [Clark u. Pazdernik 2009] CLARK, D. P. ; PAZDERNIK, N. J.: *Molekulare Biotechnologie. Grundlagen und Anwendungen*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2009
- [Cypionka 2010] CYPIONKA, H.: *Grundlagen der Mikrobiologie*. Heidelberg : Springer-Verlag, 2010
- [Freissmuth u. a. 2012] FREISSMUTH, M. ; OFFERMANN, S. ; BÖHM, S.: *Pharmakologie & Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. Heidelberg : Springer Medizin Verlag, 2012
- [Ganten u. Ruckpaul 2008] GANTEN, D. ; RUCKPAUL, K.: *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Heidelberg : Springer Medizin Verlag, 2008
- [Heidorn 2002] HEIDORN, T.: *Bioprozessoptimierung und Scale-up der Tropodithiis?ure-Produktion durch das marine Bakterium Ruegeria sp. Stamm T5*. Hannover, Universität Hannover, Diss., 2002
- [Hoffbauer 2011] HOFFBAUER, B.: *Berufsziel Life Sciences. Ein Karriere-Wegweiser*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2011
- [Jansohn u. Rothhämel 2012] JANSOHN, M. ; ROTHÄMEL, S.: *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 2012
- [Königshoff u. Brandenburger 2007] KÖNIGSHOFF, M. ; BRANDENBURGER, T.: *Kurzlehrbuch Biochemie*. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 2007
- [Merck KGaA 2013] [http://www.merckmillipore.com/germany/life-science-research/pet-26b-plus-dna/EMD\\_BIO-69862/p\\_2t0b.s10kacAAAEjWh19.zLX](http://www.merckmillipore.com/germany/life-science-research/pet-26b-plus-dna/EMD_BIO-69862/p_2t0b.s10kacAAAEjWh19.zLX)
- [New England Biolabs GmbH 2013] <http://www.neb-online.de/>

[Prave u. a. 1994] PRAVE, P. ; FAUST, U. ; SITTIG, W. ; SUKATSCH, D. A.: *Handbuch der Biotechnologie*. München : Oldenbourg Verlag GmbH, 1994

[Renneberg 2006] RENNEBERG, R.: *Biotechnologie für Einsteiger*. München : Elsevier GbmH, 2006

[Richter-Helm 2013] <http://www.richter-helm.eu/>

[Zuber 2008] ZUBER, P.: *Innovationsmanagement in der Biotechnologie. Nachhaltigkeit als Leitbild einer entwicklungsbegleitenden Evaluierung*. Wiesbaden, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Diss., 2008

# Bilderverzeichnis

1.1. Fließdiagramm des Arbeitsablaufs . . . . .	3
2.1. Aufbau einer E.coli Zelle. Aus (Clark u. Pazdernik, 2009, S. 9) . . . . .	5
2.2. Typische Wachstumskurve von Bakterien. Aus (Clark u. Pazdernik, 2009, S. 10) . . . . .	6
2.3. Plasmidkarte von pHI mit Hormon. . . . .	11
2.4. Plasmidkarte von pET mit Zytokin. . . . .	12
4.1. Kombinationen des Vektors pET26b(+) und eingezeichnete Startpunkte. . . . .	29
4.2. Kombinationen des Vektors pHI und eingezeichnete Startpunkte. . . . .	30
4.3. Kombinationen des Vektors pIPTG_T5 und eingezeichnete Startpunkte. . . . .	31
4.4. Regressionsgerade zur Berechnung der $OD_{600}$ aus den gemessenen Werten bei 570nm . . . . .	32
4.5. Regressionsgerade zur Berechnung der $OD_{600}$ aus den gemessenen Werten bei 620nm . . . . .	33
4.6. Abhängigkeit der $OD_{600}$ von der Zellkonzentration zur Beurteilung des Messbereichs . . . . .	34
4.7. Wachstumskurven der NEB-STämme im Schüttelkolben . . . . .	36
4.8. Wachstumskurven der ATCC-STämme im Schüttelkolben . . . . .	37
4.9. Darstellung der verwendeten Wellformen . . . . .	38
4.10. Vergleich des Wachstums von RHB T7 <sub>red1</sub> in unterschiedlichen Mikrotiterplatten und zum Schüttelkolben . . . . .	39
4.11. Vergleich des Wärmeübergangs beim Kolben und Mikrotiterplatte . . . . .	40
4.12. Vergleich vom Wachstum im Schüttelkolben zu Wachstumskurven mit und ohne Kanamycin in konischer Mikrotiterplatte . . . . .	41
5.1. SDS-Gel des Expressionstest von PräHOR in pET26b(+) . . . . .	42
5.2. SDS-Gel des Expressionstest von PräHOR in pHI . . . . .	43
5.3. Nachweis des PräHOR-Inserts mittels Restriktionsanalyse bei fehlender Expression . . . . .	45
5.4. Western Blot zum Nachweis von PräHOR in geringen Konzentrationen . . . . .	46
5.5. Quantifizierung in der Mikrotiterplatte mit runden Wells . . . . .	47
5.6. SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pET26b(+) und pIPTG_T5 . . . . .	49
5.7. SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pET26b(+) . . . . .	50
5.8. Nachweis des ZYT-Inserts mittels Restriktionsanalyse bei fehlender Expression . . . . .	52
5.9. Western Blot zum Nachweis von ZYT in geringen Konzentrationen . . . . .	53
5.10. Quantifizierung in Mikrotiterplatten mit flachen und konischen Wells . . . . .	54

5.11. SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pHI . . . . .	55
5.12. Nachweis des HOR-Inserts mittels Restriktionsanalyse bei fehlender Expression . . . . .	57
5.13. Temperaturverlauf bei Hitzeinduktion . . . . .	58
5.14. Expression mit TestHOR als Reproduzierbarkeitsversuch . . . . .	62
A.1. Kontrollverdau von: pHI-HOR, pIPTG_T5-HOR, pET26b(+)-ZYT, pHI-ZYT, pIPTG_T5-ZYT vor der Transformation . . . . .	74
A.2. Kontrollverdau von: pIPTG_T5-PräHOR, pET26b(+)-PräHOR, pET26b(+)-HOR vor der Transformation . . . . .	75
A.3. Kontrollverdau von: 6 x pHI-PräHOR vor der Transformation . . . . .	75
A.4. SDS-Gel des Expressionstest von PräHOR in pET26b(+) und C3029 . . . . .	77
A.5. SDS-Gel des Expressionstest von PräHOR in pHI und JM109 . . . . .	77
A.6. SDS-Gel des Expressionstest von PräHOR in pIPTG_T5 . . . . .	78
A.7. SDS-Gel des Expressionstest von PräHOR in pIPTG_T5 und wt23848 . . . . .	78
A.8. SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pET26b(+) und C2566 . . . . .	79
A.9. SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pIPTG_T5 . . . . .	79
A.10. SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pHI . . . . .	80
A.11. SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pHI . . . . .	80
A.12. SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pHI und HMS174, sowie in pET26b(+) und C3010 . . . . .	81
A.13. SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pET26b(+) . . . . .	81
A.14. SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pET26b(+) und C3030 . . . . .	82
A.15. SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pIPTG_T5 . . . . .	82
A.16. SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pIPTG_T5 . . . . .	83
A.17. Quantifizierung mit pHI in Mikrotiterplatten mit flachen und konischen Wells . . . . .	83
A.18. Restriktionsanalyse zur Klonierung des TestHOR in pET26b(+) . . . . .	84
A.19. Restriktionsanalyse zur Verifizierung des TestHOR in pET26b(+) und pIPTG_T5 . . . . .	84

# Tabellenverzeichnis

2.1. Genotypenübersicht der NEB-Stämme . . . . .	7
2.2. Genotypenübersicht der ATCC . . . . .	9
2.3. Rekombinant hergestellte Proteine und ihre Anwendungsgebiete. Verändert nach (Brown, 2011, S. 229) . . . . .	13
3.1. Allgemeine Materialien und Geräte . . . . .	16
3.2. Zusammensetzung LB-Medium . . . . .	17
3.3. Materialien für pDNA-Preparation . . . . .	17
3.4. Materialien für Restriktionsverdau . . . . .	18
3.5. Materialien für Gelextraktion . . . . .	18
3.6. Zusammensetzung LB-Agar . . . . .	19
3.7. Materialien für Transformation . . . . .	20
3.8. Materialien für Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	21
3.9. Materialien für OD-Messung . . . . .	22
3.10. Materialien für BTM-Bestimmung . . . . .	22
3.11. Zusammensetzung Solubilisierungspuffer . . . . .	23
3.12. Materialien für SDS-PAGE . . . . .	23
3.13. Materialien für Coomassie-Färbung . . . . .	24
3.14. Materialien für Quantifizierung . . . . .	24
3.15. Zusammensetzung PBS-T . . . . .	25
3.16. Materialien für Western Blot . . . . .	26
3.17. Zusammensetzung Komplet-Medium . . . . .	27
3.18. Materialien für Expressionstest . . . . .	28
3.19. Materialien für Cryo Stock Ablage . . . . .	28
4.1. Blankwerte der Beispielrechnung . . . . .	34
4.2. Beispielrechnung . . . . .	35
4.3. Berechnung des Animpfvolumens . . . . .	35
4.4. Übersicht der getesteten Mikrotiterplatten . . . . .	38
5.1. Auswertungstabelle der Kombinationen mit PräHOR . . . . .	44
5.2. Ergebnisse der Quantifizierung mit PräHOR . . . . .	48
5.3. Auswertungstabelle der Kombinationen mit ZYT . . . . .	51
5.4. Ergebnisse der Quantifizierung mit ZYT . . . . .	53
5.5. Auswertungstabelle der Kombinationen mit HOR . . . . .	56
5.6. Ergebnisse der Quantifizierung mit HOR in pET26b(+) in C2566 und HOR in pIPTG_T5 in BL21 . . . . .	59

5.7. Ergebnisse der Ausbeuteberechnung mit HOR in pET26b(+) in C2566 und HOR in pIPTG_T5 in BL21 . . . . .	59
5.8. Ergebnisse der Quantifizierung und Ausbeuteberechnung mit HOR in pHI	61
5.9. Schätzwerte des Reproduzierungsversuchs . . . . .	62
A.1. OD-Werte bei 570 nm . . . . .	76
A.2. OD-Werte bei 620 nm . . . . .	76



# A. Anhang

## A.1. Restriktionsanalysen

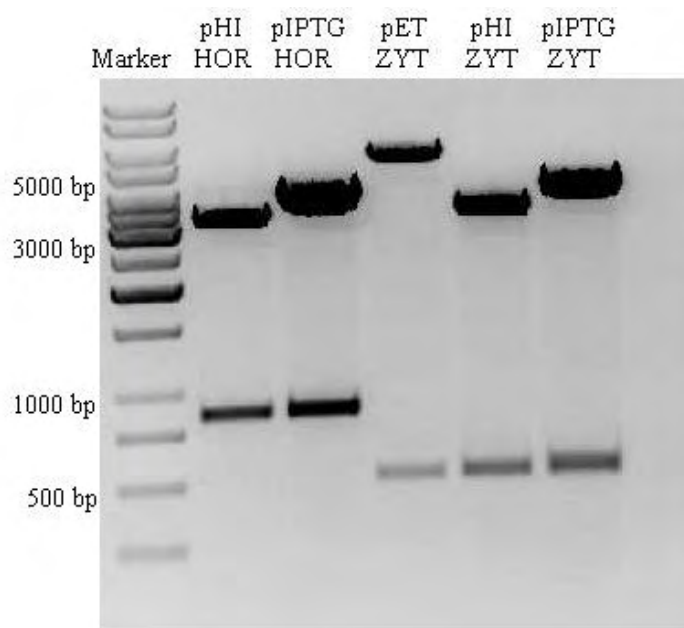


Bild A.1.: Kontrollverdau von: pHI-HOR, pIPTG\_T5-HOR, pET26b(+)-ZYT, pHI-ZYT, pIPTG\_T5-ZYT vor der Transformation

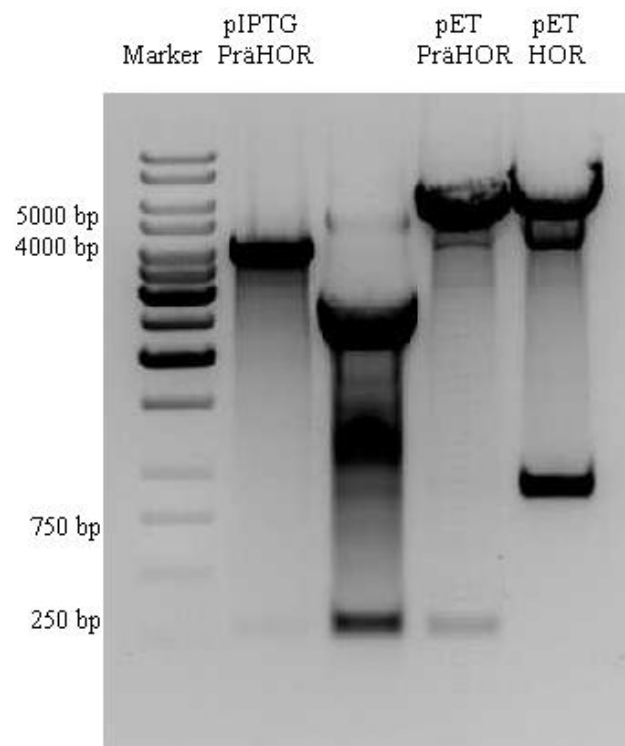


Bild A.2.: Kontrollverdau von: pIPTG\_T5-PräHOR, pET26b(+)-PräHOR, pET26b(+)-HOR vor der Transformation

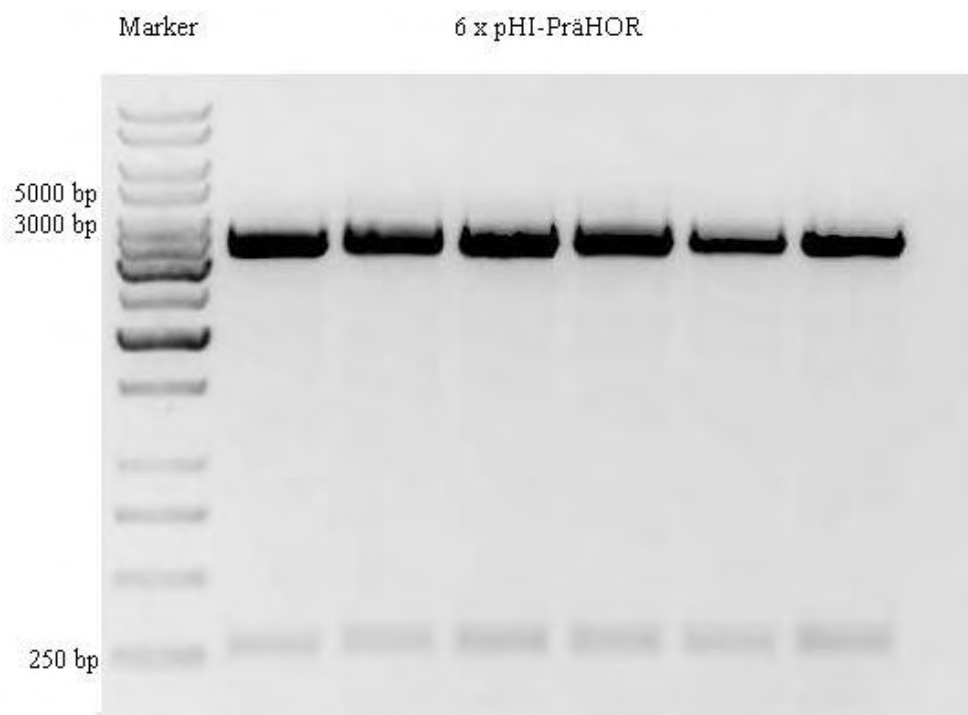


Bild A.3.: Kontrollverdau von: 6 x pHI-PräHOR vor der Transformation

## A.2. OD-Werte der Beispielrechnung

Tabelle A.1.: OD-Werte bei 570 nm

gemessene OD	- Blankwert	· Verdünnungsfaktor (10)	Regression
0,407	0,265	2,653	6,845
0,451	0,309	3,093	7,977
0,417	0,275	2,753	7,102
0,437	0,295	2,953	7,617
0,445	0,303	3,033	7,823
0,441	0,299	2,993	7,720
0,432	0,290	2,903	7,488
0,429	0,287	2,873	7,411

Tabelle A.2.: OD-Werte bei 620 nm

gemessene OD	- Blankwert	· Verdünnungsfaktor (10)	Regression
0,352	0,251	2,508	7,064
0,394	0,293	2,928	8,244
0,358	0,257	2,568	7,233
0,363	0,262	2,618	7,373
0,373	0,272	2,718	7,654
0,363	0,262	2,618	7,373
0,368	0,267	2,668	7,514
0,366	0,268	2,648	7,458

### A.3. Expressionstest PrähOR

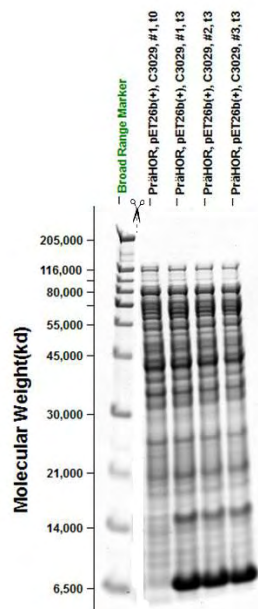


Bild A.4.: SDS-Gel des Expressionstest von PrähOR in pET26b(+) und C3029

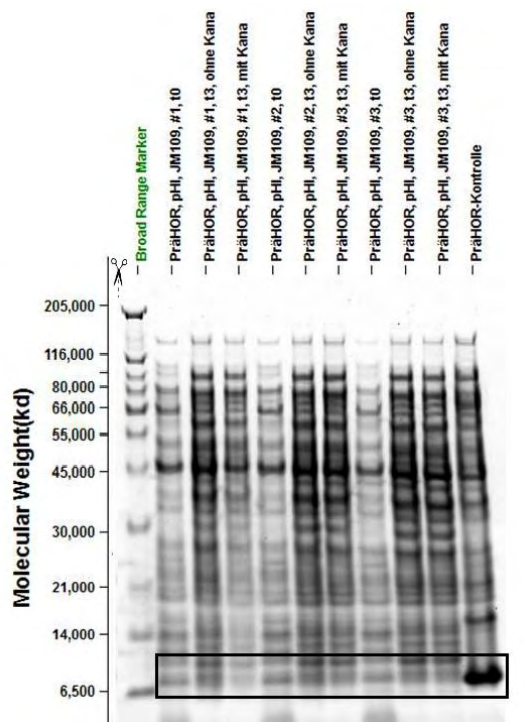


Bild A.5.: SDS-Gel des Expressionstest von PrähOR in pHI und JM109

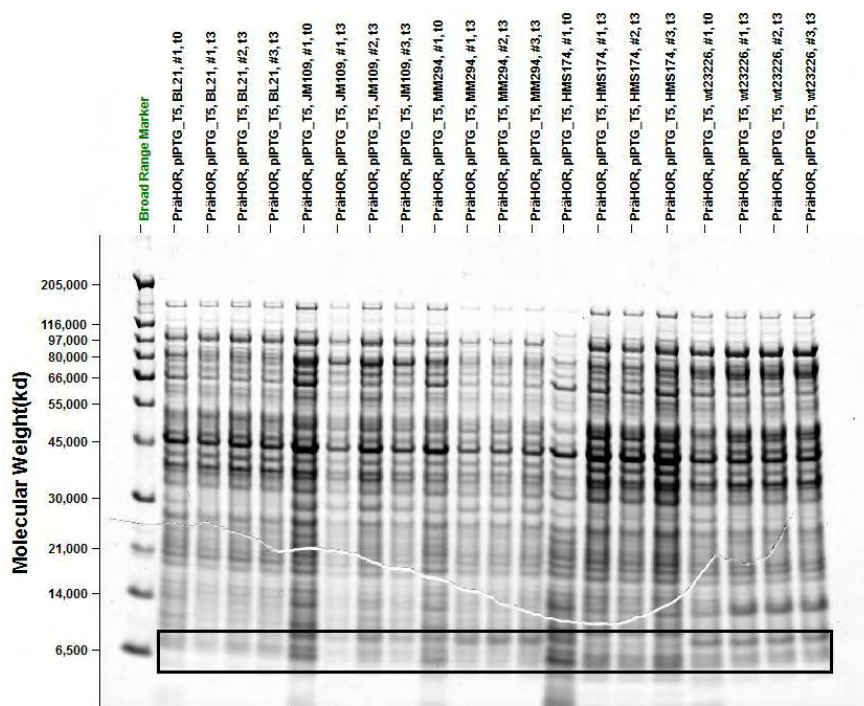


Bild A.6.: SDS-Gel des Expressionstest von PrähOR in pIPTG\_T5

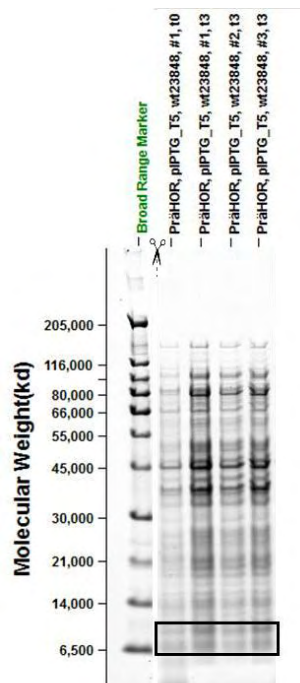


Bild A.7.: SDS-Gel des Expressionstest von PrähOR in pIPTG\_T5 und wt23848

## A.4. Expressionstest ZYT

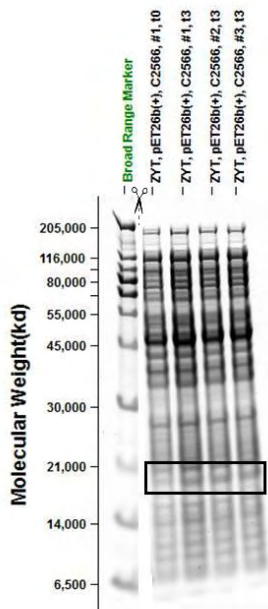


Bild A.8.: SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pET26b(+) und C2566

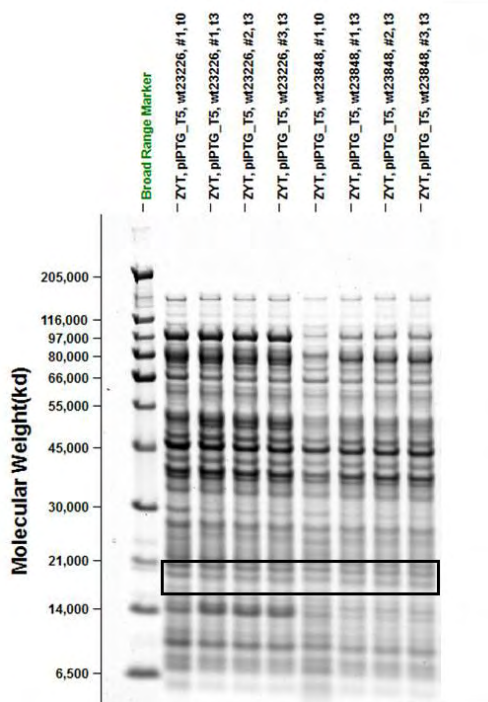


Bild A.9.: SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pIPTG\_T5

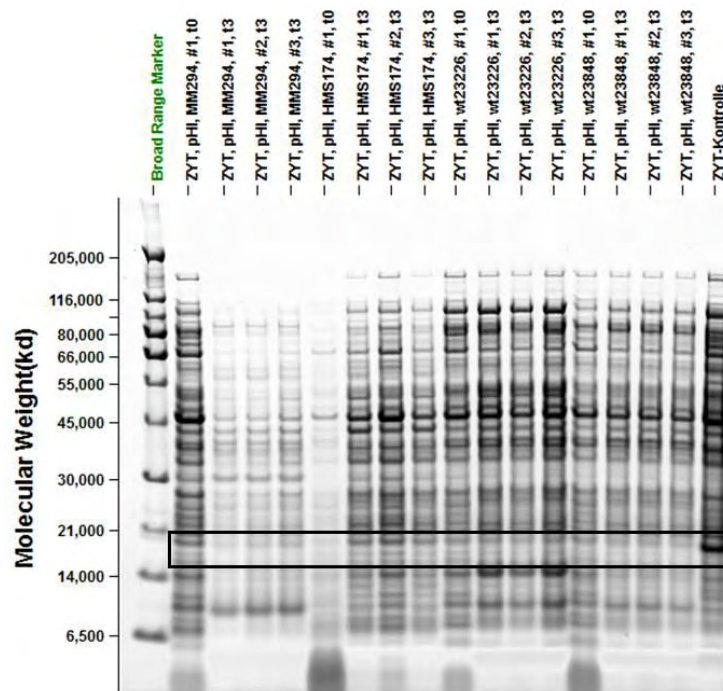


Bild A.10.: SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pHI

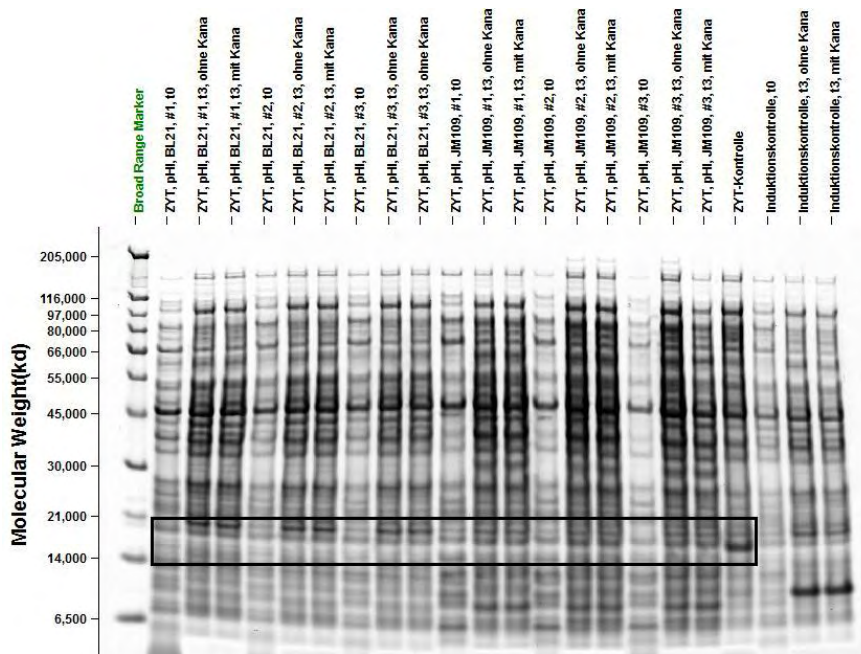


Bild A.11.: SDS-Gel des Expressionstest von ZYT in pHI

## A.5. Expressionstest HOR

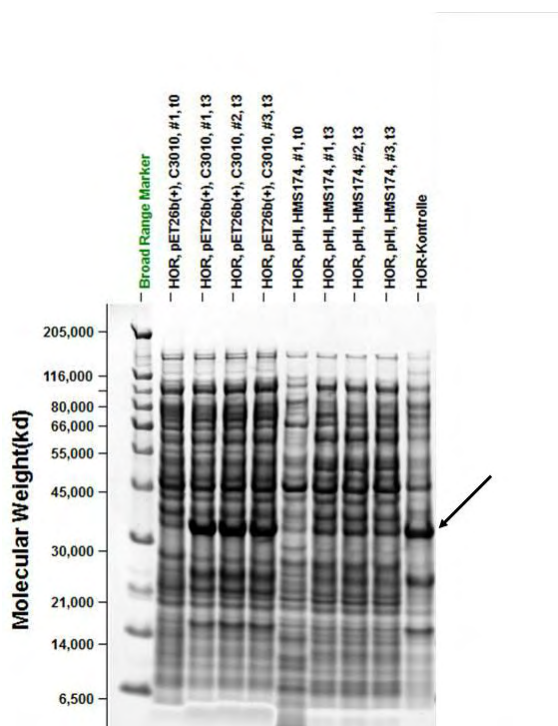


Bild A.12.: SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pHl und HMS174, sowie in pET26b(+) und C3010

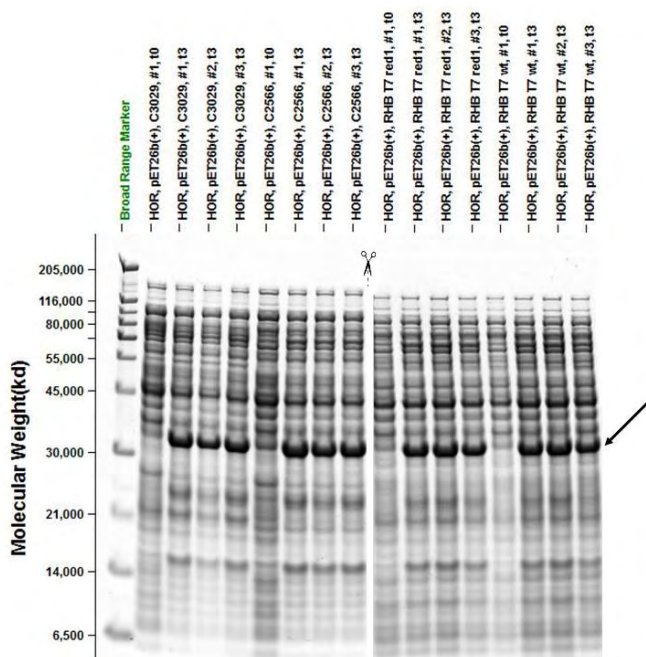


Bild A.13.: SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pET26b(+)



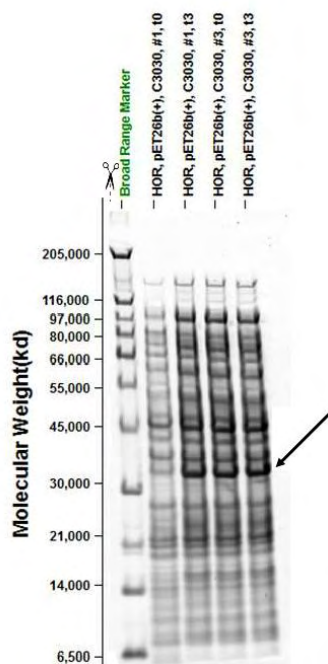


Bild A.14.: SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pET26b(+) und C3030

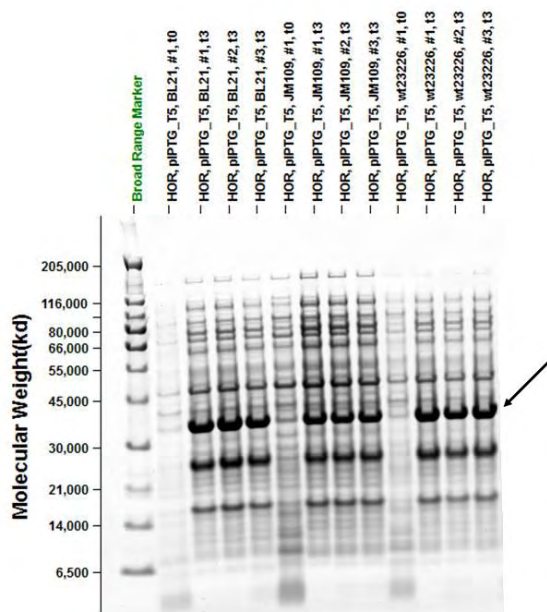


Bild A.15.: SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pIPTG\_T5

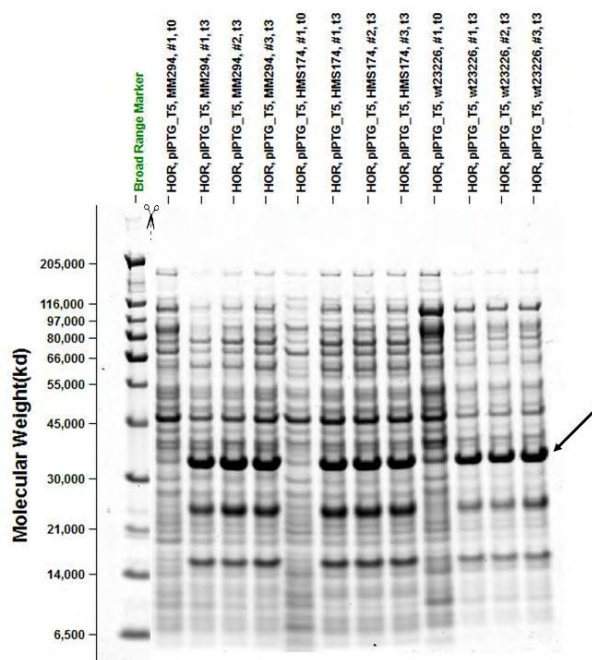


Bild A.16.: SDS-Gel des Expressionstest von HOR in pIPTG\_T5

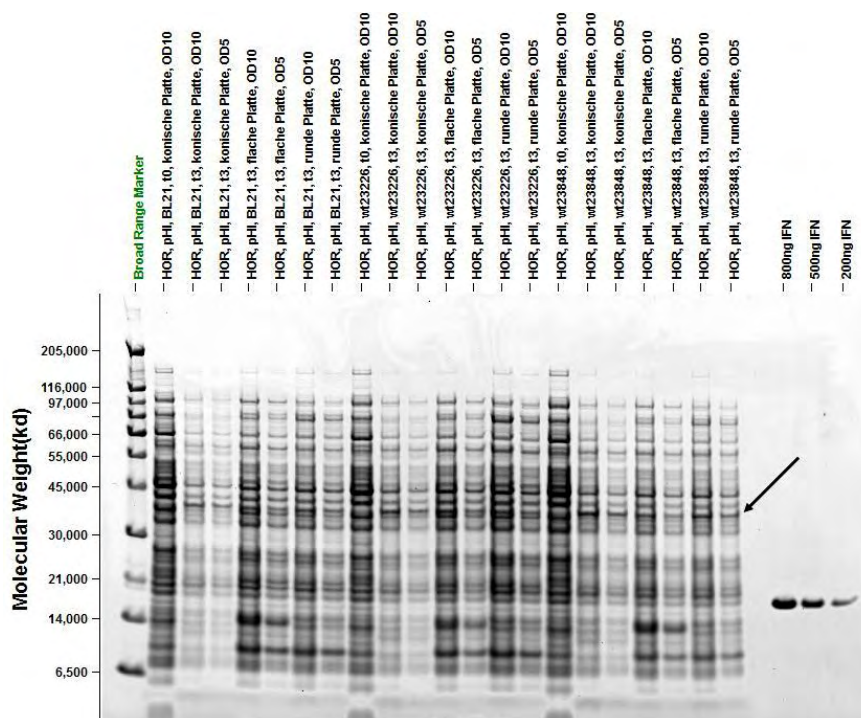


Bild A.17.: Quantifizierung mit pHI in Mikrotiterplatten mit flachen und konischen Wells

## A.6. Reproduzierbarkeit

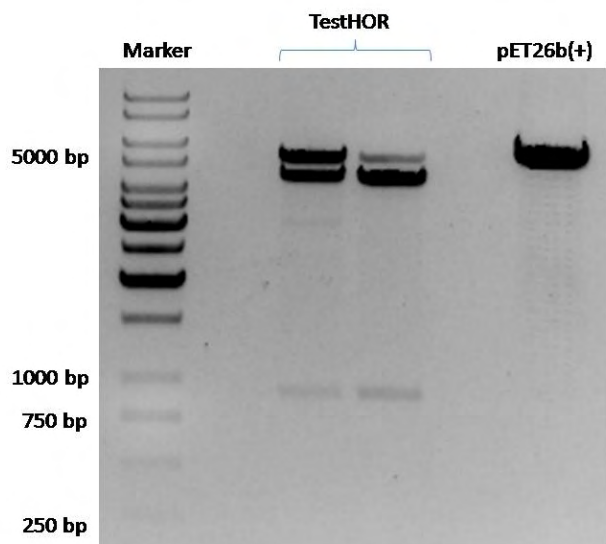


Bild A.18.: Restriktionsanalyse zur Klonierung des TestHOR in pET26b(+)

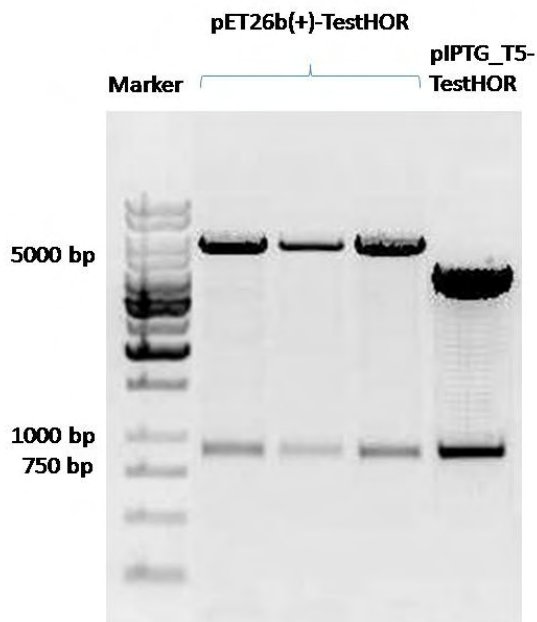


Bild A.19.: Restriktionsanalyse zur Verifizierung des TestHOR in pET26b(+) und pIPTG\_T5