



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Bachelorarbeit

Expression und Aufreinigung einer rekombinanten HRV 3C Protease

Hochschule für angewandte Wissenschaften
Fakultät Life Sciences

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von
Aleksandr Lobanov

Abgabetermin: 1. Juli 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Birger Anspach (HAW Hamburg)
2. Gutachter: Dr. Marta Kotasinska (Evotec AG)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen (einschließlich elektronischer Quellen) direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind ausnahmslos als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, den 1. Juli 2015

Danksagung

Ich möchte Frau Dr. Marta Kotasinska dafür bedanken, dass ich meine Bachelorarbeit an der Firma „Evotec AG“ durchführen dürfte. Für den zeitlichen Aufwand, den sie genommen hat, um mich bei der Arbeit zu unterstützen.

Ich möchte auch alle Kollegen und Kolleginnen danken, die mich freundlich in ihr Kollektiv aufgenommen und mich bei meinen Fragen geholfen haben.

Ich möchte mich außerdem bei Herrn Prof. Dr. Birger Anspach für seine Mühe bei der Korrektur der Bachelorarbeit bedanken.

Meine Familie danke ich für die moralische Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Problemstellung und Relevanz des Themas	1
1.2 Zeilsetzung der Arbeit	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 HRV 3C Protease	3
2.2 Aufreinigungsstrategien für HRV 3C Protease	3
3 Material	5
3.1 Geräte	5
3.2 Software	5
3.3 Verbrauchsmaterialien	6
3.4 Chemikalien	6
3.5 Stocklösungen	7
3.6 Bakterienstämme	7
3.7 Konstrukte	7
3.8 Säulen	7
3.9 Antikörper	7
3.10 Medien	8
3.11 Puffer	8
4 Methoden	10
4.1 Ansetzen von Puffern und Medien	10
4.2 Transformation	10
4.3 Ansetzen einer Vorkultur	11
4.4 Testkulturen	11
4.5 Hauptkultur im LEX™-System	11
4.6 Pull Downs	12
4.7 SDS-PAGE	13
4.8 Western Blot	13
4.9 Metallchelatchromatografie (IMAC)	15
4.10 Affinitätschromatografie (AC)	15

4.11	Anionenaustauschchromatografie (IEX)	15
4.12	Größenausschlußchromatografie (SEC)	15
4.13	Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	16
4.14	Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung durch Messung von A ₂₈₀ mittels NanoDrop	16
4.15	MALDI TOF/TOF	16
4.16	DLS	16
4.17	Aktivitätsassay	16
5	Ergebnisse	18
5.1	Auswertung der Testexpressionen mit pTriJ-HV Plasmid	18
5.2	Auswertung der Testexpressionen mit pTriJ-GV Plasmid	21
5.3	Pull Downs von pTriJ-Konstrukten	25
5.4	Kultivierung und Aufreinigung von HRV3C Protease mit GST-Tag und 6 x His-Tag im Großmaßstab	29
5.5	Auswertung der Testexpressionen mit pET-28a(+) Plasmid	34
5.6	Kultivierung und Aufreinigung von HRV 3C Protease im pET-28a(+)-Plasmid	39
5.7	Optimierung der Aufreinigung	47
5.8	Proteinanalytik	50
5.8.1	SDS-PAGE	50
5.8.2	Aktivitätsassay	51
5.8.3	MALDI TOF/TOF	54
5.8.4	DLS	55
6	Diskussion	57
6.1	Expression von pTriJ-Konstrukte	57
6.2	Aufreinigung von HRV 3C Protease mit GST- und 6 x His-Tag im Großmaßstab	57
6.3	Kultivierung und Aufreinigung von HRV 3C Protease mit pET-28a(+)-Plasmid	58
7	Zusammenfassung	59
	Literatur	60

Abbildungsverzeichnis

1	Grafische Darstellung von den Wachstumsverläufen der Testkulturen. Als Stammwirt wurden BL21 (DE3) NEB Zellen verwendet, die mit pTriJ-HV (mit 6 x His-Tag) transformiert wurden.	20
2	Das SDS-PAGE Gel von Präinduktions- und Induktionsproben von Testkulturen mit pTriJ-HV Konstrukt, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden	20
3	Das SDS-PAGE Gel von Präinduktions- und Induktionsproben von Testkulturen mit pTriJ-GV Konstrukt in BL21 (DE3) NEB, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden.	23
4	Das SDS-PAGE Gel von Präinduktions- und Induktionsproben von Testkulturen mit pTriJ-GV Konstrukt in BL21 (DE3) Star, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden	24
5	Die SDS-PAGE Gele von den Pull Down Proben aus BL21 (DE3) NEB bzw. Star Stämmen, transformiert mit HRV3C-GV Konstrukt (GST + 6 x His) und kultiviert bei 18 °C.	25
6	Die SDS-PAGE Gele von den Pull Down Proben aus BL21 (DE3) NEB bzw. Star Stämmen, transformiert mit HRV3C-GV Konstrukt (GST + 6 x His) und kultiviert bei 18 °C.	26
7	Die SDS-PAGE Gele von den Pull Down Proben aus BL21 (DE3) NEB Stämmen, transformiert mit HRV3C-HV Konstrukt (6 x His-Tag) kultiviert bei 37 °C bzw.18 °C.	27
8	Das SDS-PAGE Gel von den GST-getagten Proteinen nach dem Pull Down mit NiNTA-Agarose-Beads, um festzustellen, ob der His-Tag an den Protein vorhanden ist.	29
9	Grafische Darstellung von dem Wachstumsverlauf In verschiedenen Schottflaschen von Hauptkulturen von BL 21 (DE3) Star mit HRV3C-GV-Konstrukt (GST + 6 x His) in TB-Medium und kultiviert im LEX-System. Vor der Induktion wird Temperatur gesenkt (T) und später mit 1 mM IPTG induziert (I). Die Expression findet über Nacht bei 18 °C statt.	30
10	Die Western Blot Membran von der 12 L Kultur vor und nach der Induktion, um die Expression zu analysieren. Western Blot wird mit AntiGST Antikörper als primärer Antikörper und AntiMouse IgG als sekundärer Antikörper durchgeführt.	31
11	Chromatogramm von der Affinitätschromatografie mit der GSTrap™ HP 5 mL. Die Flussrate beträgt 4 ml/min. Elution erfolgt mit dem linearen Gradienten von AC Elutionspuffer (mit reduziertem Glutathion).	31
12	Das SDS-PAGE Gel mit den Proben von der Vorbereitung zur Affinitätschromatografie und den Proben von dem Durchfluss und Fraktionen.	32
13	Die Western Blot Membran mit den Proben von der Vorbereitung zur Affinitätschromatografie und den Proben von dem Durchfluss und Fraktionen. . . .	32
14	Die Western Blot Membran von den Proben vor und nach der Affinitätschromatografie verglichen mit den entsprechenden Proben vom Pull Down.	33

15	Chromatogramm von der Größenausschlußchromatografie mit der HiLoad 26/600 Superdex™ 75 µg. Die Flussrate beträgt 2,0 mL/min.	34
16	Das SDS-PAGE Gel von den Proben nach der Größenausschlußchromatografie.	34
17	Das SDS-PAGE Gel von den Präinduktions- und Induktionsproben von Testkulturen mit pET-28a(+) Konstrukt, die unter verschiedenen Parameter kultiviert wurden.	36
18	Vergleich von dem SDS-PAGE Gel mit der Western Blot Membran von Pull Down Proben der Testkulturen.	37
19	Grafische Darstellung von Wachstumsverläufen von Hauptkulturen von BL 21 (DE3) NEB mit pET-28(+) in TB-Medium im LEX- System. Die Induktion (I) erfolgt mit 1,0 mM IPTG. Die Expression erfolgt 4 Stunden lang bei 37 °C	40
20	Das SDS-PAGE Gel von nicht induzierten und induzierten mit pET-28a(+)-Vektor transformierten BL21 (DE3) NEB in der Hauptkultur. Die Kultivierung erfolgt im TB-Medium. Expression findet bei 37 °C für 4 h statt. Induktion erfolgt mit 1 mM IPTG.	40
21	Chromatogramm von der IMAC mit HiTrap™ 5 mL FF crude. Die Flussrate beträgt 4 mL/min. Elution erfolgt mit linearen Gradienten mit Imidazolhaltigen IMAC Elutionspuffer.	41
22	SDS-PAGE Gel mit den Proben vor und nach der Affinitätschromatografie.	42
23	Chromatogramm nach der Ionenaustauscherchromatografie mit HiTap™ Q HP 5 mL. Die Flussrate beträgt 4 mL/min. Es wird mit linearen Salzgradienten eluiert.	43
24	Das SDS-PAGE Gel von den Proben von und nach der Ionenaustauscherchromatografie.	44
25	Chromatogramm von Größenausschlusschromatografie mit HiLoad 26/600 Superdex™ 200 µg. Die Flussrate beträgt 2,0 mL/min.	45
26	Das SDS-PAGE Gel von für die Größenausschlusschromatografie vorbereiteten, sowie nach der Chromatografie aufgenommene Fraktionen.	45
27	Das SDS-PAGE Gel nach dem Verdautes mit den Protease aus beiden Pools zu verschiedenen Zeitpunkten. Der Verdautes wurde mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen bei 37 °C bzw. 18 °C mit 10 µg von Testprotein durchgeführt.	46
28	SDS-PAGE von den Proben genommen vor und nach der IMAC. Zusätzlich wurden die Proben nach dem Waschschrift mit IMAC Waschpuffer mit der Salzkonzentration von 300 mM aufgetragen.	47
29	SDS-PAGE von den Proben genommen vor und nach der IEX. Aufgrund der Systemfehlers wurde falsche Methode für die Elution ausgewählt	48
30	Chromatogramm von der IEX mit HiTrap™ Q HP 5 mL. Die Flussrate beträgt 4 mL/min. Elution erfolgt mit einem Stufengradienten von 20 % IEX Elutionspuffer über 10 CV, wo die HRV 3C Protease eluieren sollte, und die weiteren Bestandteile der Probe werden mit linearen Gradienten eluiert.	49
31	SDS-PAGE von dem Gel vor und nach der Ionenaustauscherchromatografie.	49
32	SDS-PAGE von finalen Proben aus dem ersten und den zweiten Pool zur bestimmung der Reinheit.	50

33	Ermittlung des optimalen Abstandes für die Messung der Intensivität von zwei mit der Probe gefühlten Wells.	51
34	Vergleich der Michaelis-Menten Kinetiken von kommerziellen Protease und der aufgereinigten Protease in zwei Pools.	52
35	Aus Michaelis-Menten ermittelte Lineweaver-Burk-Diagramme zur Bestimmung der wichtigen kinematischen Parameter. Es werden die kommerziell erhältliche HRV 3C Protease mit der aufgereinigten Protease aus dem zweiten Pool verglichen.	53
36	Mittels MALDI TOF/TOF gemessene Molekulargewichte von in der Probe erhaltenen Komponenten.	54
37	Aus 30 Messungen ermittelte Korrelationsfunktion von HRV 3C Protease in beiden Pools. Daraus errechnete Verteilung der hydrodynamischen Radien: Pool 1 (links): 3,25 nm mit Polydispersität von 27,2 % und Pool 2 (rechts): 2,23 nm mit Polydispersität von 31,5 %	55
38	Massenverteilung der beiden Proben: Pool 1 (links) und Pool 2 (rechts).	55
39	Intensitätsverteilung nach der Messung der Proben aus beiden Pools: Pool 1 (links) und Pool 2 (rechts).	55

Tabellenverzeichnis

1	Der Wachstumsverlauf der Testexpressionen von BL21 (DE3) NEB-Stämmen, transformiert mit pTriJ-HV-Vektor (6 x His-Tag) in verschiedenen Medien (TB- und LB-Medien) bei 18 °C (über Nacht) und bei 37 °C (4 Stunden). Induziert wurde mit 0,1 bzw. 1 mM IPTG. [I: Zeitpunkt der Induktion]	18
2	Der Wachstumsverlauf der Testexpressionen von BL21 (DE3) Star-Stämmen, transformiert mit pTriJ-HV-Vektor (6 x His-Tag) in verschiedenen Medien (TB- und LB-Medien) bei 18 °C (über Nacht) und bei 37 °C (4 Stunden). Keine der Kultur hat den Induktionszeitpunkt erreicht. [X: Kultivierung wurde abgebrochen]	19
3	Der Wachstumsverlauf der Testexpressionen von BL 21 (DE3) NEB-Stämmen, transformiert mit pTriJ-GV-Vektor (GST und 6 x His-Tag) in verschiedenen Medien (TB- und LB-Medien) bei 18 °C (über Nacht) und bei 37 °C (4 Stunden). Induziert wurde mit 0,1 bzw. 1 mM IPTG. [I: Zeitpunkt der Induktion] .	21
4	Grafische Darstellung von den Wachstumsverläufen der Testkulturen. Als Stammwirt wurde BL21 (DE3) NEB Zellen verwendet, die mit pTriJ-GV (mit GST und 6 x His-Tag) transformiert wurden.	22
5	Der Wachstumsverlauf der Testexpressionen von BL21 (DE3) Star-Stämmen, transformiert mit pTriJ-GV-Vektor (GST und 6 x His-Tag) in verschiedenen Medien (TB- und LB-Medien) bei 18 °C (über Nacht) und bei 37 °C (4 Stunden). Induziert wurde mit 0,1 bzw. 1 mM IPTG. [I: Zeitpunkt der Induktion] .	23
6	Grafische Darstellung von den Wachstumsverläufen der Testkulturen. Als Stammwirt wurde BL21 (DE3) Star Zellen verwendet, die mit pTriJ-GV (mit GST und 6 x His-Tag)	24
7	Mittels NanoDrop bestimmten Gesamtproteinkonzentrationen in den Proben nach der Elution von Pull Downs. Alle Proben wurden doppelt gemessen und anschließend der Mittelwert daraus berechnet.	28
8	Wachstumsverlauf von Hauptkultur von BL 21 (DE3) Star mit HRV3C-GV-Konstrukt (GST + 6 x His) in TB-Medium im LEX-System. Vor der Induktion wurde die Temperatur gesenkt (T) und später mit 1 mM IPTG induziert (I). Die Expression findet über Nacht bei 18 °C statt.	30
9	Der Wachstumsverlauf der Testexpressionen von BL21 (DE3) NEB-Stämmen, transformiert mit pET-28(+) Konstrukt in verschiedenen Medien (TB- und LB-Medien) bei 18 °C (über Nacht) und bei 37 °C (4 Stunden). Induziert wurde mit 0,1 bzw. 1 mM IPTG. [I: Zeitpunkt der Induktion]	35
10	Die Daten von den Pull Downs von den Testkulturen, die unter verschiedene Bedingungen kultiviert wurden.	36
11	Die Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung der Proben mit pET28a(+)-Plasmid, transformiert in BL21 (DE3) NEB Stamm, mit dem NanoDrop.	38
12	Wachstumsverläufe von Hauptkultur von BL 21 (DE3) NEB mit pET-28(+) in TB-Medium im LEX-System. Die Induktion erfolgt mit 1,0 mM IPTG. Die Expression erfolgt 4 Stunden lang bei 37 °C.	39

Abkürzungsverzeichnis

3D	3-dimensional
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
A	Amper
AC	Affinitätschromatografie
ca	circa
CV	Column Value
DLS	Dynamic Light Scattering
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al</i>	und andere
EtOH	Ethanol
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HRV	Human Rhinovirus
IEX	Ionenaustauscherchromatografie
IMAC	Metallchelatchromatografie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Broth

mA	Milliamper
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionisation
M	Molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Größenausschlußchromatografie
TOF	Time of Flight
TB	Terrific Broth
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
u.a.	unter anderem
U	Unit
V	Volt
vgl	vergleiche

1 Einleitung

1.1 Problemstellung und Relevanz des Themas

Escherichia coli gehört zu einem sehr gut erforschten Mikroorganismus, der sehr oft seine Verwendung bei den gentechnischen Arbeiten findet.

Trotz vieler seiner Vorteile, die diese Stämme bieten, haben sie auch einen wesentlichen Nachteil. Sie sekretieren nicht das gewünschte Zielprotein in das Medium, sodass immer ein Aufschluss Schritt benötigt wird. Sobald die Bakterienzelle aufgeschlossen ist, kommen auch interne Zellkomponente zum Vorschein. Unter diesen Umständen kann es ziemlich aufwendig und kostenintensiv sein das Zielprotein in reiner und vor allem aktiver Form zu gewinnen, weil die zusätzliche Schritte die Verluste von Zielprotein verursachen.

Bei der rekombinanten Expression wird oft in den Klonierungsvektor die Sequenz für die sogenannten Fusionstags eingebaut. Diese sollen die Aufreinigung und/oder die Detektion von dem Zielprotein erleichtern. Der Tag erhöht das Molekulargewicht des Proteins, sodass das Herabsenken der Produktivität bei der Expression ein mögliches Problem darstellen kann. Bei falscher Wahl kann sogar die Spezifität und Aktivität von Zielprotein herabgesetzt werden. Dennoch es lohnt sich einen oder mehreren Tags einzubauen, weil dadurch die Stabilität und Löslichkeit erhöht werden können. Durch eine chromatografische Aufreinigung kann das Protein leichter isoliert werden, vor allem wenn Affinität des Tags zum Säulenmaterialien hoch ist. Nach der Aufreinigung müssen die Tags wieder entfernt werden, damit sie bei folgenden Untersuchungen von Protein die Ergebnisse nicht verfälschen. Für diesen Zweck eignen sich die Proteasen besonders gut, weil sie hochselektiv sind. Die Proteasen erkennen bestimmte Aminosäuresequenz, wo sie sich anlagern und dem Tag von dem Zielprotein abspalten. [4, 7]

Eine von oft verwendeten Proteasen ist die Human Rhinovirus (HRV) 3C Protease. Es gibt zwar viele Anbieter auf dem Markt die diese Protease verkaufen. Doch in einem Unternehmen, wo die Aufreinigungen sehr oft durchgeführt werden, ist es in langfristiger Perspektive von Vorteil die Protease „im Hause“ zu produzieren. Dadurch können anfallende Kosten für die Protease gesenkt werden.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Meine Aufgabe besteht darin, eine Methode für das Labor zu etablieren, die Protease möglichst schnell und ohne großen praktischen Aufwand aufzureinigen erlaubt.

Die Protease soll sowohl in hoher Konzentration als auch in biologisch aktiver Form gewonnen werden. In der Probe sollen außerdem keine Verunreinigungen vorhanden sein, um bei der späteren Anwendung für Entfernung der Fusionstags nicht die Proteinprobe zusätzlich zu kontaminieren.

Am Anfang der Arbeit werden auch die Kultivierungsparameter ermittelt werden, unter denen die gentechnisch manipulierten Mikroorganismen am besten das gewünschte Zielprotein exprimieren können. Um die bessere Expressionsbedingungen zu finden werden Parameter wie Bakterienstamm, Kultivierungsmedium (TB oder LB), IPTG-Konzentration für die Induktion sowie besser geeignete Expressionstemperatur. Entsprechend der Expressionstemperatur wird es entweder bei 37 °C 4 Stunden lang oder bei 18 °C über Nacht expremiert.

Die Zielsequenz von der Protease wird von der Firma GenScript in pTriJ-Vektoren kloniert und eine Codonoptimierung durchgeführt. Es handelt sich um zwei verschiedene Konstrukte, die sich in den eingebauten Tags unterscheiden. Der erste Konstrukt HRV3C_opt_pTriJ-HV soll die Protease mit dem 6 x His-Tag expremiert. Während der zweite Konstrukt (HRV3C_opt_pTriJ-GV) noch zusätzlich GST-Tag besitzt. Bei pTriJ-Vektor handelt es sich um einen für die firmeninternen Expressionen benutzten Vektor.

Diese Fusionstags sollen nicht nur die Aufreinigung von dem rekombinanten HRV 3C Protease erleichtern. Sie sollen auch nach Gebrauch (Abschneiden der Fusionstags von anderen Zielproteinen) dazu beitragen die Protease sowie die abgeschnittenen Fusionstags von dem Zielprotein leichter zu entfernen.

Wünschenswert ist die Expression vom löslichen Protein ohne Bildung von Einschlusskörperchen (die sogenannten Inclusion bodies), damit keine Proteinaktivitätsverluste durch die Rückfaltung in Kauf genommen werden müssen.

Nach der erfolgreichen Expression wird die Protease chromatografisch aufgereinigt, wobei der erste chromatografische Schritt die Affinitätschromatografie sein wird. Es wird Säulenmaterial verwendet, das hohe Affinität zum Fusionstag hat. Je nach Reinheit der Probe wird weitere Aufreinigungsstrategie festgelegt.

Abschließend wenn das Protein in ausreichend reiner Form isoliert wird, wird es noch durch Messung der Gesamtproteinkonzentration quantifiziert. Die Reinheit wird durch SDS-PAGE festgestellt. Das Molekulargewicht des Proteins kann durch MALDI/TOF TOF bestimmt werden. Der hydrodynamische Radius wird mittels DLS ermittelt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 HRV 3C Protease

Humanes Rhinovirus gehört der Familie der Picornaviren und ist für die meisten Erkältungsfälle verantwortlich. Es besitzt einen kleinen positiv geladenen RNA-Einzelstrang als Träger der genetischen Information [1, 2, 3, 5]. Die RNA hat ein offenes Leseraster und ist ca. 3000 Aminosäuren lang. Zu weiteren Vertretern dieser Gruppe gehören u.a. Maul- und Klauensäueche-Virus, Cardiovirus und Hepatitis A Virus [3].

In den humanen Rhinoviren wird nur ein einziger Polyprotein mit dem Molekulargewicht von ca. 250 kDa translatiert, der aus Regionen für strukturelle und nicht strukturelle Proteine besteht [3]. Um die Proteinen in aktive biologische Form zu überführen, wird das Polyprotein von mehreren Proteasen geschnitten. Zu diesen Proteasen gehören 2A, 3C und 3 CD Proteasen (Polyprotein aus 3C Protease und 3D Polymerase) [1, 3].

Nach der Spaltung entstehen 11 Proteine, die für Struktur, Bildung des Kapsides, virale Replikation und Host Cell Shutoff verantwortlich sind. Die Strukturproteine sind in der N-terminalen Region zu finden, die Nicht-Strukturproteine befinden sich dagegen hauptsächlich in C-terminaler Region. [3]

2A Protease schneidet als erste zwischen strukturellen und nicht strukturellen Proteinen, während die 3C Protease für viele weitere interne Schnittschritte verantwortlich ist [2]. Zusammen oder ohne 3D Polymerase sind sie für 8 von 9 proteolytischen Spaltungen verantwortlich [3]. Dies macht die Protease essentiell für den Virus. 3C Protease ist ein RNA bindendes Protein, das eine wichtige bei der viralen Replikation spielt. Da Cystein im aktiven Zentrum für den nukleophilen Angriff verantwortlich ist, gehört die Protease zu den Cysteinproteasen. Ihre Struktur dennoch erinnert an Chemotrypsin-ähnliches Serinprotein [2, 8]. Auch der hohe Konservierungsgrad unter verschiedenen Serotypen machen die 3C Protease attraktiv für die Suche nach geeigneten Inhibitoren [1, 8], die zahlreich in der Literatur beschrieben sind.

2.2 Aufreinigungsstrategien für HRV 3C Protease

Die erste Beschreibung der Aufreinigungsmethode sind von K. Knott und *et al* nachzulesen. Das Paper orientiert sich auf bis dahin publizierten Arbeiten von Aufreinigung der Picornavirus 3C Protease aus Poliovirus.

K. Knott *et al* [5] haben in ihrer Publikation die Aufreinigung von löslicher Protease beschrieben. Sie haben die Sequenz in *tac*- Expressionsplasmid pTRV3C/J eingebaut. Der Vektor wurde in *E. coli* RB791 und JM103 transformiert und expremiert. Die Kultivierung findet in Minimalsalzmedium statt. Nach der Induktion mit 1 mM IPTG wurde die Kultur nach 3 Stunden geerntet. Die Bakterien werden mit dem Sonifikator aufgeschlossen und die HRV 3C Protease durch Kationenaustauscherchromatografie und Größenausschlusschromatografie isoliert. Insgesamt konnten bei der Expression die Zielproteinkonzentration von 0,5-1 mg pro L Kultur gemessen werden. Nach der Aufreinigung sind es nur 150 μ g von Zielprotein pro L Kultur gewesen. Die Arbeitsgruppe stand vor dem Problem, dass hoher Anteil der Protease unlöslich vorlag (ca. 50 %) [5].

Über eine weitere Aufreinigung von Protease mit dem periplasmatischen Sekretionsvektor berichtet Libby *et al*. Sie beschreiben die Präparation der RNA aus mit den HRV 14 3C infizierten

HeLa Zellen, Konstruktion von doppelsträngigen cDNA, Umklonierung in pGB34-RV. Nach dem partiellen Aufschluss, der durch mehrfaches schnelles Einfrieren und Auftauen der Zellen und anschließender Homogenisation mit dem Doncer besteht. Nach der Zentrifugation wird die Aktivität getestet. Folglich wurde die Expression der Protease optimiert, da starker Abbau von dem Protein beobachtet wurde. Es wurde die toxische Wirkung der Protease vermutet, deswegen die Expression nicht mehr in der Zellcytoplasma stattfinden. Aufgrund schwacher Expression wurden einige Veränderungen wie Umklonierung in pJL 6-29-86 mit N-terminal eingebauten Flag-Tag vorgenommen. Es konnten aber insgesamt nur 1 mg Protein aus einem L Bakterienkultur gewonnen werden. Viel Protein befindet sich in der unlöslichen Fraktion. Die Zugabe von Detergentien haben nicht zur besseren Löslichkeit des Proteins beigetragen [6]. In der Literatur wird oft eine andere Möglichkeit beschrieben, wie höhere Konzentrationen von Protease durch die Isolierung der Inclusion Bodies erreicht werden können. In der Arbeit von Birch *et al* wird Methode mit Solubilisierung der Einschlusskörperchen im Harnstoff angewendet. In folgenden Schritten werden sie chromatografisch aufgereinigt (Ionenaustauschchromatografie und Größenausschlusschromatografie). Es folgt ein Rückfaltungsschritt, um die Protease in aktive Form zu überführen.

Als Nachweis von der Protease gilt die Bestimmung von der Michaelis-Menten-Kinetik, wo die Eigenschaft der Protease an spezifischen Erkennungssequenz anzudocken und zwischen Gln und Gly zu schneiden zunutze gemacht wird. Der Peptid Anc-Thr-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro-Val-(p- NO₂)-Phe-Lys wird für diese Analytik verwendet. Die Aktivität wird durch die Zunahme von Fluoreszenz gemessen.

Auf diese Methode basieren auch andere Forscher, die die Protease für ihre Forschungszwecke aufgereinigt haben wie z.B. G.J.Davis [2, 3].

Eine interessante Anwendung von HRV 3C Protease stellen die Arbeitsgruppe von Youell [9]. Sie wollen die 3C Protease für die Freisetzung von immobilisierten Proteinen nutzen. Dies kann zum Beispiel in Bionanotechnologie sehr viele Vorteile bringen.

Sie beschreiben eine Methode zur Isolierung von biotynilierter HRV 3C Protease. Die Zielsequenz wird in bHR3Cp-Vektor kloniert und in BL21 (DE3) pLysS Zellen transformiert. Kultiviert werden die Bakterien in TYH-Medium mit 0,5 % Glucose und 0,1 mM Ampicillin. Weitere Kultivierungsbedingungen sind in Paper von Younell *et al* zu finden. Nach der Entnahme der Bakterienpellet wird mittels Sonifikator aufgeschlossen und zentrifugiert. Der Ultrazentrifugation folgt eine Inkubation mit DEAE-Beads. Sie werden dann abzentrifugiert und der Überstand wird abgenommen und weiterbearbeitet. Der nächste Aufreinigungsschritt mit gleichzeitiger Aufkonzentrierung der Protease ist die Ammoniumsulfatfraktionierung (Endkonzentration: 70 %). Der Überstand wird dekantiert und der Zellpellet wird resuspendiert und über Nacht dialysiert. Zum Schluss kommt noch eine Aufkonzentrierung mit Amicon 10000 MGWO. Es konnten 25-30 mg von Zielprotein aus 1 L Kultur gewonnen werden. Leider wird nicht über die Reinheit und die Verluste auch über die Expressionsstärke der Bakterienzellen berichtet [9].

3 Material

3.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Typ
Eismaschine	Thermo Scientific	-
Inkubationsschüttler	Braun Biotech International	Certomat® BS 21
Pipetten	Gilson	P2, P20, P100, P200, P1000
Mikrowelle	AEG	MICROMAT
Wasserbad	Memmert	-
Sonifikator	Bandelin electronics	UV2070
NanoDrop	ThermoScientific	200 Spectrometer
Stromversorger	Bio-RAD	PowerPac 300 Power Supply
Gelkammer	X Cell SureLock™	-
Rocking Plattform	VWR	-
Lichttisch	Kaiser	prolite basic 2
Zentrifuge	Eppendorf	5810R
Zentrifuge	VWR	ministar absolute
Vortex	Scientific Industries	Genie 2
Scanner	Canon	UDE
LEX Parallel Bioreactor	Harbinger	48™
Zentrifuge	Beckmann Coulter	Avanti J-20 XP
Rotor	Beckmann	JLA 81000
Rotor	Beckmann	JLA 16250
Rotor	Beckmann	JLA 25,50
Contifuge	Heraeus	Stratos
Photometer	AgilentTechnologies	Carry 60 UV-Vis
MALDI TOF/TOF	AppliedBiosystems	4800
Äkta Express	MDS Sciex	-
Äkta Explorer	GE Healthcare	-
Superloop	GE Healthcare	50 mL
DLS	VISCOTEK	802 DLS
pH-Meter	Seven Exelence	-
iBind Western System	LifeTechnology	-
iBind Gel Transfer Divice	LifeTechnology	2

3.2 Software

- CarryWinUV
- NanoDrop 2000/2000c
- 4000 Series Explorer™
- Microsoft Office Excel 2007

- MiKTeX 2.9
- OmniSize

3.3 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Typ
Premium Tips	Biozym	10 μ L
Quality Pipette Tips	Sarstedt	100 - 1000 μ L
Tip Stack Pack	Sarstedt	200 μ L
Einmalküvetten	Brandt	1,5 mL Halbmikro
Membran Filter (MF TM)	Merck Milipore	0,25 μ m VSWP
MikroreaktionsgefäÙe	Eppendorf	1,5 mL
MikroreaktionsgefäÙe	Eppendorf	2,0 mL
Zentrifugenfilter	Amicon [®]	Ultra-15 3000 NMWL
Stripette	Castar [®]	50 mL; 100 mL
Serological Pipet		25 mL; 10 mL; 5 mL
Falcon Tubes	Cellstar [®]	50 mL; 15 mL
Minipore	Merck	-

3.4 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Anmerkung
Carbenicillin	Sigma	Stocklösung: 50 mg/mL
Chloramphenicol	Fluka	Stocklösung: 34 mg/mL
Kanamycinsulfat	Roth	Stocklösung: 50 mg/mL
SOC Outgrowth Medium	BioLab	-
Benzonase	Novagen	250 U/ μ L
Lysozym	Sigma	from chicken egg, \geq 40000 U/mg
2-Mercaptoethanol	Roth	Stocklösung: 14,3 M
DL-Dithiothreitol	Sigma	-
L-Glutathion reduced	Sigma	-
Destilliertes Wasser	-	-
NuPAGE	Novex	4-12 % Bis-Tris Gel
iBind TM SolutionKit	Novex	-
QuickStart TM Bradford	Bio-Rad	1 x Dye Reagent
Sinapinic Acid	Sigma	-
Precision Plus Protein Standard	BIO-RAD	-
Antischaum	Sigma	-
Ethanol	Sigma	100 %
InstantBlue	Expedion	-
NBT/BCIP	Novex	-

3.5 Stocklösungen

Bezeichnung	Konzantration
NaCl	1 M
MgCl ₂	0,5 M
Imidazol	1 M
IPTG	1 M
2-Mercaptoethanol	14,3 M
DTT	1 M
reduzierter Glutathion	0,1 mM

3.6 Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller
BL21 (DE3) NEB	Invitrogen
One Shot [®] BL21 (DE3) pLys	LifeTechnologies
One Shot [®] BL21 (DE3) Star	LifeTechnologies

3.7 Konstrukte

Bezeichnung	Hersteller
HRV3C_opt_pTriJ-HV	GenScript
HRV3C_opt_pTriJ-GV	GenScript
HRV3C_opt_pET 28a(+)	GenScript

3.8 Säulen

Alle verwendeten Säulen sind von der Firma GE Healthcare hergestellt worden.

- HiTrap[™] 5 mL Q HP
- HiTrap[™] 5 mL FF crude
- GSTrap[™] 5 mL HP
- HiLoad 26/600 Superdex[™] 200 pg
- HiLoad 26/600 Superdex[™] 75 pg

3.9 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
AntiGST Antikörper	Pierce HB
AntiHis Antikörper	PENTA QUAGEN
AntiMouse IgG	Promega

3.10 Medien

Medium	pH-Wert	Zusammensetzung	Konzentration
LB-Medium	7.0	Bacto-Trypton	10 g/L
		Hefeextrakt	5 g/L
		NaCl	10 g/L
TB-Medium	7.0	Bacto-Trypton	12 g/L
		Hefeextrakt	24 g/L
		Glycerol	4 mL/L
		KH ₂ PO ₄	4,6 g/L
		K ₂ HPO ₄	25 g/L

3.11 Puffer

Medium	pH-Wert	Zusammensetzung	Konzentration
20 x MES	7,3	MES	50 mM
		Tris Base	50 mM
		SDS	0,1 %
		EDTA	1 mM
SEC Puffer	8.0	Tris-HCl	50 mM
		NaCl	150 mM
		DTT	1 mM
		EDTA	10 mM
		Glycerol	10 %
IEX Waschpuffer	8.0	Tris-HCl	50 mM
		NaCl	50 mM
		DTT	1 mM
		EDTA	10 mM
		Glycerol	10 %
IEX Elutionspuffer	8.0	Tris-HCl	50 mM
		NaCl	1 M
		DTT	1 mM
		EDTA	10 mM
		Glycerol	10 %
IMAC Waschpuffer	8.0	Tris-HCl	50 mM
		NaCl	300 mM
		β -Mercaptoethanol	1 mM
		Imidazol	10 mM
		Glycerol	10 %

Medium	pH-Wert	Zusammensetzung	Konzentration
IMAC Lysepuffer	8.0	Tris-HCl	50 mM
		NaCl	300 mM
		β -Mercaptoethanol	1 mM
		Imidazol	10 mM
		Glycerol	10 %
		MgCl ₂	5 mM
		Benzonase	10 kU/L
		Lysozym	1 mg/mL
IMAC Elutionspuffer	8.0	Tris-HCl	50 mM
		NaCl	300 mM
		β -Mercaptoethanol	1 mM
		Imidazol	300 mM
		Glycerol	10 %
AC Waschpuffer (für GST-Säule)	8.0	Tris-HCl	50 mM
		NaCl	300 mM
		β -Mercaptoethanol	1 mM
		Glycerol	10 %
AC Lysepuffer (für GST-Säule)	8.0	Tris-HCl	50 mM
		NaCl	300 mM
		β -Mercaptoethanol	1 mM
		Glycerol	10 %
		MgCl ₂	5 mM
		Benzonase	1 U/L
		Lysozym	1 mg/mL
AC Elutionspuffer (für GST-Säule)	8.0	Tris-HCl	50 mM
		NaCl	300 mM
		β -Mercaptoethanol	1 mM
		reduzierter Glutathion	10 mM
		Glycerol	10 %
Puffer A (für Western Blot)	9,5 (bei 21°C)	Tris	100 mM
		NaCl	100 mM
		MgCl ₂	5 mM
Aktivitätsassaypuffer	7,5	Hepes	50 mM
		NaCl	150 mM
		EDTA	1 mM

4 Methoden

4.1 Ansetzen von Puffern und Medien

Die Herstellung von Medien und Puffern erfolgt stets nach gleichem Muster. Die festen Bestandteile werden zuerst im destillierten Wasser gelöst. Danach werden die flüssigen Komponenten zugesetzt. Bevor die Lösung auf das Endvolumen aufgefüllt wird, wird der pH-Wert gemessen und gegebenenfalls angepasst. Die Kulturmedien werden zusätzlich autoklaviert. Die hitzelabilen Substanzen wie Antibiotika werden unmittelbar vor der Kultivierung zugegeben.

Bei den Puffern werden hauptsächlich Stocklösungen verwendet. Das Justieren des pH-Wertes erfolgt, wenn nicht anders angegeben wird, von auf 4 °C temperierten Lösungen. Vor dem Gebrauch werden die Puffer mit kurzhaltigen Substanzen komplettiert, entgast und filtriert. Dieser Schritt ist besonders wichtig, damit keine Luftblasen oder kleine Partikel auf die Säule kommen.

4.2 Transformation

Als Transformation bezeichnet man das Verfahren für Einschleusen der Fremd-DNA in die Wirtszelle. Als Ziel dieser Manipulation dient die Herstellung von den gentechnisch veränderten Mikroorganismen, die in der Lage sind das gewünschte Produkt in möglichst großer Menge zu produzieren.

Für die Arbeit werden drei verschiedene DNA-Konstrukte in jeweils unterschiedlichen Bakterienstämmen, Derivaten von *E.coli*, transformiert. Es wurden ausschließlich chemisch kompetente Zellen benutzt. Folglich wird die Transformation mittels Hitzeschock durchgeführt. Zuerst werden die Bakterien für circa 15 Minuten auf Eis gestellt, damit sie auftauen. Es wird 1 µL von Plasmid-DNA hinzugefügt und leicht gemischt und wieder für halbe Stunde inkubiert. Die Zellen werden entsprechend der von Hersteller angegebenen Hitzeschockdauer in ein Wasserbad bei 42 °C gestellt. Anschließend werden die Bakterien wieder für 5 Minuten auf dem Eis inkubiert. Es wird 950 µL von SOC Outgrowth Medium zugegeben. Die Bakterienkulturen werden im Schüttler bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Auf dieser Weise können Bakterien sich vermehren.

Nach einer Stunde werden die unterschiedlichen Volumina (10 µL und 100 µL) auf die LB-Agar-Platten mit Carbenicillin (100 µg/mL) als Selektionsantibiotika ausgestrichen. Der pLysS-Stamm hat zusätzlich eine Resistenz gegen Chloramphenicol (34 µg/mL). Der Konstrukt im pET-28a(+)-Vektor ist gegen Kanamycin resistent. Das Antibiotikum sorgt dafür, dass nur die erfolgreich transformierten Klone auf der Platte wachsen können (Selektionsdruck). Die Petrischalen werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Petrischalen mit Kolonien werden am folgenden Tag mit Paraffin verschlossen und bei 4 °C gelagert. Die Bakterien dürfen nicht älter als zwei Wochen werden, sonst wird neue Transformation gemacht.

4.3 Ansetzen einer Vorkultur

Die Vorkultur wird angesetzt, um die Bakterien zuerst in kleinen Maßstab auf eine bestimmte Zelldichte zu bringen. Bakteriensuspension wird später in Hauptkultur so verdünnt, dass ein definiertes Start-OD zwischen 0,05 und 0,1 vorliegt.

In 100 mL Erlenmeyerkolben werden jeweils 25 mL von Kultivierungsmedium vorgelegt. Entsprechend der Bakterienresistenzen wird das Medium mit Antibiotika ergänzt. Es wird eine Einzelkolonie von der LB-Agar-Platte mit der Pipettenspitze gepikst und in das Medium gegeben.

Anschließend wird die Kultur in Schüttler gestellt, wo sie bei 37 °C und 170 rpm über Nacht geschüttelt wird. Am folgenden Tag wird die OD gemessen. Die Vorkultur dient zur Inokulation von einer größeren Kultur.

4.4 Testkulturen

Mit den Testkulturen werden verschiedene Kultivierungsparameter variiert mit dem Ziel die optimalen Bedingungen für die Hauptkultur zu ermitteln, sodass es möglichst viel an löslichem Zielprotein expremiert werden kann. Getestet werden die verschiedenen Konstrukte, Wirtsorganismen, Temperaturen, Kultivierungsmedien, IPTG-Konzentrationen und Expressionstemperaturen.

Dafür werden in 250 mL Erlenmeyerkolben je 50 mL Kultivierungsmedium vorgelegt. Das Medium wird mit Antibiotika entsprechend der Resistenz der Bakterien komplementiert.

Aus einer Vorkultur wird die Bakteriensuspension auf den OD-Wert zwischen 0,05-0,1 in der Testkultur verdünnt. Nach der Inokulation werden die Kulturen in Schüttler gestellt und bei 37 °C und 170 rpm kultiviert. Während der Kultivierung werden die OD der Bakterien gemessen und protokolliert. Wenn die optische Dichte in Bereich von 0,7 kommt, wird die Kultur mit IPTG induziert.

Vor der Induktion werden 100 µL Probe genommen. Sie werden bei 5000 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Der Pellet wird in 40 µL von 4 x SDS-Puffer resuspendiert.

Die Induktion erfolgt mit 0,1 mM oder 1,0 mM IPTG. Nach Induktion werden die Bakterien bei 37 °C für 4 Stunden und bei 18 °C über Nacht kultiviert. Nach Beendigung der Kultivierung werden 100 µL abgenommen und die Bakterien geerntet. Sie werden bei 3000 x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert und bei -80 °C gelagert.

Der Expression wird durch die SDS-PAGE-Analyse der entnommenen Proben festgestellt.

4.5 Hauptkultur im LEX™-System

LEX™-System ist ein Airlift Bioreaktor zur Hochdurchsatzkultivierung von Bakterienkulturen. Durch den Lufteintrag wird die Zellsuspension begast und gleichzeitig durchgemischt. Das Wasserbad sorgt für die Temperierung der Kulturen. Der Abluft wird zusätzlich mit Aktivkohlefilter behandelt, sodass die Freisetzung von Bakterien in die Laboratmosphäre verhindert wird. Es können gleichzeitig 24 x 2 L Schottflaschen mit Bakterienzellen kultiviert werden. Für die Aufreinigung im Großmaßstab werden 12 L unter aus Testexpressionen ermittelten optimalen Bedingungen kultiviert.

Je 1,5 L vom autoklavierten Medium wird in 2 L Schottflaschen vorgelegt. Es folgt die Zugabe von Antibiotika, gegen das die Bakterien mit Zielprotein resistent sind. Die Hauptkultur wird mit der Vorkultur inokuliert. Die Optische Dichte der Hauptkultur beträgt am Anfang der Kultivierung 0,05-0,1. Um die starke Antischaumbildung zu verhindern wird Antischaummittel von Sigma (1:1000) zugegeben.

Wenn die Bakterien den erforderlichen OD-Wert erreicht haben, werden sie mit IPTG induziert. Theoretisch wird ab diesem Zeitpunkt das Zielprotein produziert. Es kann aber auch sein, dass basale Expression vor der Induktion stattfindet. Es handelt in diesem Fall um eine „leaky expression“ Manchmal ist es erforderlich nach der Induktion die Temperatur zu senken. Dann wird vor dem Induktions-OD die Temperatur herunter gedreht. Durch Zugabe von Eis kann der Prozess beschleunigt werden.

4.6 Pull Downs

Die eingefrorenen Proben von Testkulturen werden in kleinen Maßstab (pull down) aufgereinigt. Für die Pull Downs werden jeweils 15 mL von den Kulturprobe abgenommen und bei 3000 x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Zellpellet wird in 1,5 mL Lysepuffer resuspendiert.

Der Zellaufschluss erfolgt mittels Sonifikation (Bandelin electronics).

Einstellungen von Sonifikator:

- Dauer: 3 x 15 Sekunden mit 10 Sekunden Pause zwischen den Durchgängen
- Power: 30
- Zyklen: 30 %

Nach dem Aufschluss werden die Zellen bei 10000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, damit die unlöslichen Komponenten abgetrennt werden. Der Überstand wird abgenommen und weiter bearbeitet. 30 µL von den Überstand werden außerdem für die spätere Analytik genommen. Hier sind die löslichen Proteine zu finden. Inzwischen werden die NiNTA-Agarose-Beads bzw. Glutathion- Sepharose-Beads vorbereitet. Es werden 200 µL von Beads abgenommen und abzentrifugiert. Der Ethanol, in dem die Beads gelagert werden, wird abpipettiert. Die Beads werden mit 1 mL Waschpuffer equilibriert. Nach erneuter Zentrifugation wird der Waschpuffer wieder abgenommen. Es folgt eine Inkubation von Rohextrakt mit den Beads bei 4 °C für mindestens eine halbe Stunde.

Nach der Inkubation wird 30 µL Aliquot für die SDS-PAGE Analyse abgenommen. In dieser Probe sind nicht an die Beads gebundene Proteine zu finden. Der Überstand wird dekantiert. Die Beads werden noch drei Mal mit je 1,8 mL Waschpuffer gewaschen. Bei jedem Waschschrift werden jeweils 1,8 mL zu dem Waschpuffer zugegeben. Nach jedem Waschschrift werden die Beads bei 1000 x g und 4 °C eine Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wird immer verworfen, weil dort ungebundene Verunreinigung zu finden sein sollten.

Danach kommt die Elution. Zu den Beads werden 180 µL von dem Elutionspuffer dazugegeben und gut durchmischt. Nach einer Inkubation auf dem Eis für mindestens eine Minute werden die Beads zentrifugiert (1000 x g, 1 Minute lang bei 4 °C). In dem Überstand soll

nun das Zielprotein zu finden sein. Dafür werden 30 μL für SDS-PAGE abgenommen. Ein weiterer Aliquot wird für die Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung genommen. Der Rest wird von Beads getrennt und im flüssigen Stickstoff eingefroren.

4.7 SDS-PAGE

Zunächst erfolgt die Vorbereitung der Proben. Allgemein werden 30 μL von flüssigen Proben mit 10 μL 4 x SDS Puffer zusammengemischt, dadurch bekommen die Proteine einheitliche Gesamtladung proportional deren Molekulargewicht. Die festen Proben werden in 40 μL 1 x SDS Puffer resuspendiert. Die Proben werden bei 99 °C für fünf Minuten erhitzt, damit auch die Disulfidbrücken aufgebrochen werden und die Proteine unabhängig von ihrer 3D-Struktur im Gel wandern können.

Es wird die Kammer aufgebaut. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche werden kommerziell erhältliche Gele verwendet. Sie sind in die Plastiktüte verpackt. Nach der Verpackung werden die Kamm und der Klebeband am unteren Teil des Gels entfernt. Das Gel wird in der Kammer fixiert. Die Kammer wird mit Laufpuffer (1 x MES-Puffer) gefüllt. Die Taschen des Gels werden mit dem Laufpuffer gewaschen.

Vor dem Beladen des Gels werden die Proben nochmal kurz zentrifugiert. Für die Einschätzung des Molekulargewichtes wird PrecisioPlusProteinTM Standard verwendet. Dieser Marker enthält Proteine mit bekannten Molekulargewichten.

Es werden die Proben in die Taschen pipettiert. Danach wird die Kammer verschlossen.

Für die SDS-PAGE werden folgende Einstellungen an dem Stromversorger vorgenommen:

- Spannung: 200 V
- Stromstärke: 400 mA
- Dauer: 35 min

Nach dem Ablauf dieser Zeit ist die Probe nach unten zur Anode gelaufen. Der Stromversorger wird ausgeschaltet und der Aufsatz mit elektrischen Anschlüssen wird entfernt. Das Gel wird rausgenommen. Die Gießkammer des Gels wird aufgebrochen. Die Taschen und der unterer unebener Teil des Gels werden abgeschnitten. Für Färben wird das Gel in InstantBlue Lösung für eine Stunde auf VWR Plattform geschwenkt. Folgend wird das Gel gewaschen und eingescannt.

4.8 Western Blot

Manchmal sind die Ergebnisse von SDS-PAGE nicht eindeutig, sodass eine mehr sensible Methode gewählt werden soll.

Bei Western Blot wird zuerst SDS-PAGE durchgeführt. Danach werden die Proben auf die Membran transferiert. Dies geschieht mit iBlot[®] Gel Transfer Device. Der Packung mit PVDF MiniStock wird aufgebrochen. Der Top Stack und die Trennschicht werden entfernt. Der untere Stack wird in dem Transfergerät platziert, sodass die elektrische Anschlüsse an richtigen Positionen sind. Das Gel wird auf die Transfermembran gelegt. Darauf kommen ein mit Wasser befeuchtetes Filterpapier, der obere Stach und Absorbend Pad. Mit einem Roller werden

die Luftblasen entfernt. Das Gerät wird zugemacht und angeschaltet. Es wird Programm 3 ausgewählt.

Dieses Programm beinhaltet folgende Einstellungen:

- Spannung: 20 V
- Stromstärke: 2 A
- Dauer: 7 min

Währenddessen wird die iBind Lösung vorbereitet. Sie setzt sich aus

- 23,7 mL destilliertes Wasser
- 6 mL iBind™ Buffer
- 300 µL Additive

zusammen.

Dann werden die Antikörper mit der iBind™ Lösung verdünnt.

- Pierce HB (AntiGST Antikörper): 1:400
- PENTA QUIGEN (AntiHis Antikörper): 1:400
- AntiMouse IgG (sekundärer Antikörper): 1:1500

Nachdem das Programm abgeschlossen ist, wird die Transfermembran mit 5 mL iBind Lösung gewaschen. Die Membran darf nicht trocken werden. Inzwischen wird die iBind™ Western System vorbereitet. Die iBind™ Card wird auf den Western System gelegt und mit 5 mL von iBind Lösung feucht gemacht. Auf den zentralen Bereich wird zusätzlich 1 mL iBind Lösung pipettiert. Darauf wird die Transfermembran so platziert, dass die geblottete Seite nach unten gerichtet ist und die schweren Proteine in Richtung der Kammer zeigen. Die Luftblasen werden mit dem Roller entfernt.

Die Kammern werden nach folgendem Muster gefüllt:

- 2 mL verdünnter erster Antikörper
- 2 mL iBind Lösung
- 2 mL verdünnter zweiter Antikörper
- 6 mL iBind Lösung

Die Membran muss mindestens 2,5 Stunden inkubiert werden. Es ist auch möglich das System über Nacht stehen zu lassen.

Die Membran wird mit 1:50 in Puffer A verdünnter NBT/BCIP Stocklösung gefärbt.

4.9 Metallchelatchromatografie (IMAC)

Für die Metallchelatchromatografie (engl. *immobilized metal ion affinity chromatography*) werden die gepackten Säulen verwendet. Die Säulen werden mit dem Waschpuffer equilibriert. Die Auftragung der Säule erfolgt mit der Probepumpe bei der Flussrate von 4 mL/min. Die Säule wird mit 20 CV mit dem Puffer gewaschen und anschließend mit Imidazol-haltigem Puffer eluiert. Dabei wird der Gradient von 0 % auf 100 % Elutionspuffer in 10 CV linear aufgebaut. Nachdem 100 % von Elutionspuffer erreicht sind, wird der Gradient für 8 CV konstant gehalten, damit alle Verunreinigungen von der Säule eluiert werden können. Schließlich wird die Säule mit dem Wasser gewaschen. Die Säule wird im 20 % EtOH gelagert.

Die Proben werden in 96 Well-Platte, mit jeweils 2 mL Füllvolumen pro Well, fraktioniert. Der Durchfluss wird getrennt aufgesammelt.

4.10 Affinitätschromatografie (AC)

Bei der Affinitätschromatografie (auch *affinity chromatography*) wird zuerst die Säule equilibriert. Es folgt die Applikation der Probe mit der Probenpumpe bei der Flussgeschwindigkeit von 4 mL/min. Die Säule wird zunächst mit 20 CV von Waschpuffer gewaschen. Der Elutionspuffer enthält reduzierten Glutathion. Elution erfolgt mit dem linearen Gradienten, der über 20 CV von 0 % auf 100 % Elutionspuffer aufgebaut wird. Die Säule wird anschließend mit dest. Wasser gewaschen und im 20 % EtOH gelagert.

Die Proben werden in 96 Well-Platte, mit jeweils 2 mL Füllvolumen pro Well, fraktioniert. Der Durchfluss wird getrennt aufgesammelt.

4.11 Anionenaustauschchromatografie (IEX)

Bei der Ionenaustauschchromatografie (engl. *ion exchange chromatography*) wird die Säule mit dem Waschpuffer equilibriert (5 CV). Nach der Applikation der Probe wird die Säule mit dem Waschpuffer gewaschen (20 CV) und mit linearem Salzgradienten eluiert (20 CV). Die Proben werden in 2 mL Fraktionen auf der 96-Well-Platte gesammelt. Die Säule wird anschließend re-equilibriert und zuerst im dest. Wasser gewaschen im 20 %-igen EtOH gebracht. So wird die Säule auch gelagert.

4.12 Größenausschlusschromatografie (SEC)

Bei der Größenausschlusschromatografie (engl. *size exclusion chromatography*) kann maximal 15 mL auf die Säule aufgetragen werden. Wenn das Volumen der Probe größer ist, muss sie noch ankonzentriert werden. Dies erfolgt durch Amicon Zentrifugenfilter. Als Erstes wird der Filter mit dem Puffer ca. 10 Minuten equilibriert. Danach wird 15 mL Probe auf den Filter aufgetragen und bei 4500 x g für halbe Stunde zentrifugiert. Die Flüssigkeit auf dem Filter wird zurück in die Probe pipettiert und erneut auf den Filter gegeben und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wird solange wiederholt bis das Gesamtvolumen der Probe 15 mL beträgt.

Die Säule wird mit dem Puffer equilibriert. Die Probe wird durch Superloop auf die Säule mit der Flussrate von 3 mL/min aufgetragen. Die Fraktionen werden in 96-Well-Platte aufgesammelt.

4.13 Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung werden 20 μL der Probe in 1 mL der Bradfordlösung (QuickStart™ Bradford) pipettiert. Die Lösung wird gut gemischt und im dunklen Platz für 5 Minuten inkubiert.

Am Rechner wird das Programm (Carry WinUV) geöffnet, wo die BSA-Kalibriergerade niederlegt ist. Sie wird nach Öffnen einer neuen Bradfordlösungsflasche neu bestimmt.

Bevor der Messung muss der Photometer mit dem Puffer ohne Protein geblänkt werden. Die Probe wird drei Mal gemessen und die Konzentrationen werden angezeigt. Falls der Wert außerhalb des Messbereiches liegt, wird die Probe verdünnt.

4.14 Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung durch Messung von A_{280} mittels NanoDrop

Die Bradford ist eine ziemlich ungenaue Methode der Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung. Wenn die Probe ausreichend sauber ist kann sie auch mit dem Nanodrop bestimmt werden. Dafür wird das Programm für Proteinkonzentrationsbestimmung geladen. Als Methode wird „Protein 280“ gewählt. Es wird bei der Wellenlänge 280 nm gemessen. Der NanoDrop wird mit dem Puffer ohne Protein geblänkt. Dann werden die Bezeichnung der Probe, der Extinktionskoeffizient und der Molekulargewicht angegeben. Es werden 2 μL der Probe gemessen. Die Konzentration wird dann ausgerechnet und am Bildschirm angezeigt. Außerdem wird der DNA/Proteinverhältnis 260/280 angezeigt, woraus die Reinheit bezüglich Kontaminationen mit Nukleinsäuren der Probe geschätzt werden kann. Bei reiner Proteinlösung ist dieser Quotient $< 1,8$.

4.15 MALDI TOF/TOF

3 μL der Probe werden auf einen Membranfilter pipettiert und in kleinen Petrischalen, die mit destilliertem Wasser gefüllt sind, für 15 Minuten entsalzt. Anschließend wird die Probe 1:1 mit Sinapinsäure mithilfe von Vortex gemischt und dann zentrifugiert.

2 μL werden auf den Pot der Metallplatte gegeben und 20 Minuten trocken gelassen. Anschließend wird die Probe mit 4800 MALDI TOF/ TOF™ Analyser gemessen.

4.16 DLS

In einer Quarzküvette QS 1,50 mm werden 45 μL der in VISCOTEK 802 DLS gemessen. Damit keine Verunreinigungen die Messung nicht stören wird die Probe für 1 Stunde bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert. Mit dem Programm OmniSize werden 30 Messungen jeweils 10 Sekunden lang durchgeführt und als die Messung beeinflussende Komponente wird Glycerol (1085 mM) angegeben.

4.17 Aktivitätsassay

Die Enzymkinetik wird nach G.A.Cox *at al* [2] durchgeführt. Die Bestimmung der Parameter erfolgt durch die Fluoreszenzassay. Es wird dabei die Zunahme der Fluoreszenz durch die

Spaltung von markiertem Peptid gemessen.

Die Reaktion wird bei 30 °C für 60 Minuten durchgeführt, wobei jede 5 Minuten die Aktivität gemessen wird. In 400 μL Ansätzen wurde das Substrat mit verschiedenen Konzentrationen vorgelegt. In jeden Well wurden 0,5 μM von Protease pipettiert. Die Messung wird mit TECAN NE115b durchgeführt. Zum Vergleich wird auch die Kinetik der kommerziell erhältlichen Protease von Novagen gemessen.

5 Ergebnisse

Nach der Transformation werden die Vorkulturen für die Testkulturen angesetzt. Durch Testkultivierung sollen die optimalen Wachstumsparameter ermittelt werden, unter denen die Kultur die größten Proteinausbeuten liefert.

Zum Zeitpunkt der Inokulation der Testkulturen erreichen Vorkulturen folgende OD-Werte:

HRV 3C mit GST- und 6 x His-Tag Konstrukt in BL21 (DE3) NEB: 4,3
 HRV 3C mit GST- und 6 x His-Tag Konstrukt in BL21 (DE3) Star: 4,3
 HRV 3C mit 6 x His-Tag Konstrukt in BL21 (DE3) NEB: 3,9
 HRV 3C mit 6 x His-Tag Konstrukt in BL21 (DE3) Star: 2,5

Die Vorkulturen von dem Konstrukt mit GST- und 6 x His-Tag in BL21(DE3) NEB und BL21(DE3) Star sind am besten gewachsen und zeigen auch gleiche OD-Werte. Der Wert für die optische Dichte von HRV 3C mit 6 x His-Tag BL21 (DE3) NEB unterscheidet sich nicht wesentlich von den ersten beiden Konstrukten. Am schlechtesten ist der Konstrukt mit 6 x His-Tag in BL21 (DE3) Star gewachsen.

5.1 Auswertung der Testexpressionen mit pTriJ-HV Plasmid

Mit den Vorkulturen wurden die Kulturen für die Testexpressionen inokuliert. Während der gesamten Kultivierung wurde das Wachstum der Bakterien mittels der Messung der optischen Dichte bei 600 nm beobachtet. Die Werte für die optischen Dichten wurden in den Tabellen zusammengetragen.

Tabelle 1 – Der Wachstumsverlauf der Testexpressionen von BL21 (DE3) NEB-Stämmen, transformiert mit pTriJ-HV-Vektor (6 x His-Tag) in verschiedenen Medien (TB- und LB-Medien) bei 18 °C (über Nacht) und bei 37 °C (4 Stunden). Induziert wurde mit 0,1 bzw. 1 mM IPTG. [I: Zeitpunkt der Induktion]

Medium	Temperatur [°C]	IPTG [mM]	Dauer [h]							
			0,0	2,3	3,2	3,4	4,1	4,8	6,8	23,3
LB	37	0,1	0,08	0,31	0,73 (I)	-	2,5	3,0	3,0	-
		1,0	0,08	0,22	0,65 (I)	-	2,0	2,4	2,4	-
	18	0,1	0,09	0,29	0,67 (I)	-	1,1	1,6	-	1,6
		1,0	0,08	0,29	0,67 (I)	-	1,1	1,1	-	1,1
TB	37	0,1	0,07	0,19	0,54	0,67 (I)	2,0	4,4	7,2	-
		1,0	0,08	0,21	0,57	0,76 (I)	2,0	4,3	6,4	-
	18	0,1	0,08	0,21	0,62	0,77 (I)	1,1	1,7	-	1,7
		1,0	0,07	0,20	0,57	0,72 (I)	1,3	1,3	-	1,7

Die Kulturen in BL21(DE3) NEB wachsen mit einer kurzen Lag-Phase. Die Kulturen in LB-Medium werden bereits nach 3,2 Stunden Kultivierungsdauer induziert und die Kulturen im

TB-Medium erst 15 Minuten danach. Allerdings haben die TB-Kulturen an Ende der Kultivierung höheren optischen Dichten als die LB-Kulturen.

Nach der Induktion wachsen alle Kulturen schlechter. Die Expression belastet anscheinend den Metabolismus der Bakterien, sodass nach wenigen Stunden optische Dichte erreicht wird, die während mehreren Stunden bis zur Ernte unverändert bleibt.

In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse von Testkulturen vom gleichen Konstrukt in BL21 (DE3) Star zusammengefasst.

Tabelle 2 – Der Wachstumsverlauf der Testexpressionen von BL21 (DE3) Star-Stämmen, transformiert mit pTriJ-HV-Vektor (6 x His-Tag) in verschiedenen Medien (TB- und LB-Medien) bei 18 °C (über Nacht) und bei 37 °C (4 Stunden). Keine der Kultur hat den Induktionszeitpunkt erreicht. [X: Kultivierung wurde abgebrochen]

Medium	Temperatur [°C]	IPTG [mM]	Dauer [h]					
			0,0	2,3	3,2	4,1	4,8	6,8
LB	37	0,1	0,04	0,04	0,04	0,04	0,06	0,06 (X)
		1,0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,07	0,07 (X)
	18	0,1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,07 (X)
		1,0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,08 (X)
LB	37	0,1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,08	0,08 (X)
		1,0	0,05	0,05	0,05	0,05	0,07	0,07 (X)
	18	0,1	0,04	0,04	0,04	0,04	0,08	0,09 (X)
		1,0	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,08 (X)

Bei den Kulturen von BL21 (DE3) Star sind über mehrere Stunden kein Wachstum zu erkennen, obwohl die Kolonien auf der Agar-Platten und in der Vorkultur gewachsen sind. Die Kultivierung wurde nach 6,8 Stunden abgebrochen. Es ist aber möglich, dass die Kulturen sich über sehr langes Zeitintervall in der Lag-Phase befinden. Da die Kulturen nicht in kleinem Maßstab wachsen wollen, ist wahrscheinlich, dass bei großen Kulturen die gleichen Probleme auftreten können.

Für die bessere Übersichtlichkeit der Wachstumsverläufe werden die Kulturen in einer Grafik dargestellt und ausgewertet.

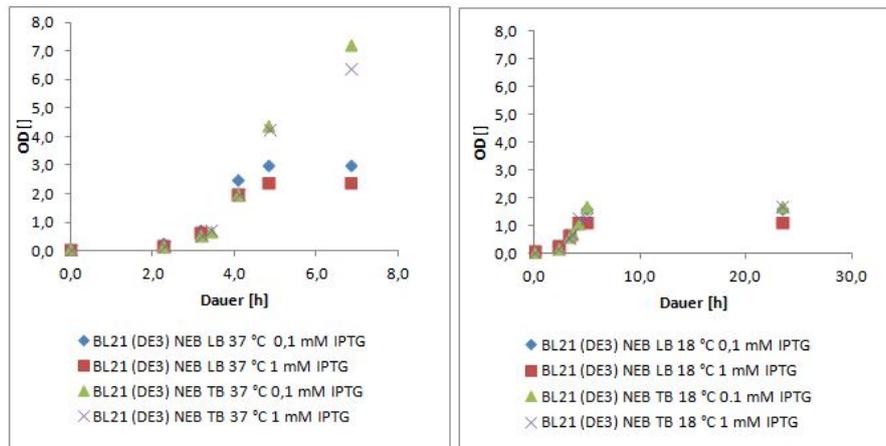


Abbildung 1 – Grafische Darstellung von den Wachstumsverläufen der Testkulturen. Als Stammwirt wurden BL21 (DE3) NEB Zellen verwendet, die mit pTriJ-HV (mit 6 x His-Tag) transformiert wurden.

Aus der Abbildung 1 kann entnommen werden, dass die Kulturen in TB-Medium etwas länger brauchen, um in die exponentielle Wachstumsphase zu kommen. Allerdings wachsen sie dann schneller. Außerdem es wird deutlich, dass die Kulturen in LB-Medium sehr schnell die stationäre Phase erreichen. Testkulturen, die mit geringerer IPTG-Konzentration induziert werden, zeigen etwas besseres Wachstum. Die maximale optische Dichte ist in TB-Medium bei 37 °C und bei Induktion von 0,1 mM IPTG erreicht. Die Kulturen im gleichen Medium wachsen bei gleicher Temperatur ähnlich. Bei 18 °C wachsen alle Kulturen gleich

Der Expressionserfolg der Testkulturen wurde mit SDS-PAGE kontrolliert. Es ist eine Bande auf der Höhe zwischen 25 und 20 kDa zu erwarten.

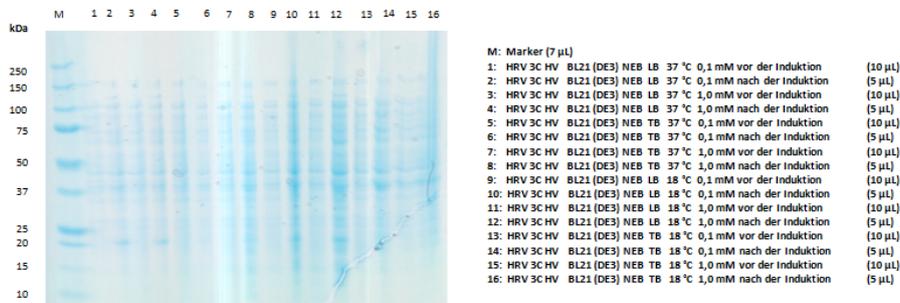


Abbildung 2 – Das SDS-PAGE Gel von Präinduktions- und Induktionsproben von Testkulturen mit pTriJ-HV Konstrukt, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden

Dem Gel zufolge findet in BL21 (DE3) NEB bei 37 °C nur sehr schwache Expression von der

rekombinanten HRV 3C Protease statt. Bessere Ergebnisse sind vor allem auf der Spur zwei und vier zu beobachten. Es handelt sich um die Kultivierung in LB-Medium und der Induktion mit 0,1 bzw. 1 mM IPTG. In den Kulturen, die bei 18 °C gewachsen sind, wiederum eine sehr niedrige Expression in LB-Medien zu erkennen. In TB-Medium scheint keine Expression bei beiden Temperaturen zu finden. Vergleicht man die Expressionsstärken untereinander, so kann nicht eindeutig feststellen, wo die Expression am besten erreicht wurde. Insgesamt kann man sagen, dass die Expression sehr mit pTriJ-HV sehr niedrig ist. Die Kulturen, wo der Konstrukt in die BL21 (DE3) Star Zellen transformiert wurde, wurden aufgrund zu langer Lag-Phase abgebrochen, sodass keine Auswertung der Testkulturen durchgeführt wurde.

5.2 Auswertung der Testexpressionen mit pTriJ-GV Plasmid

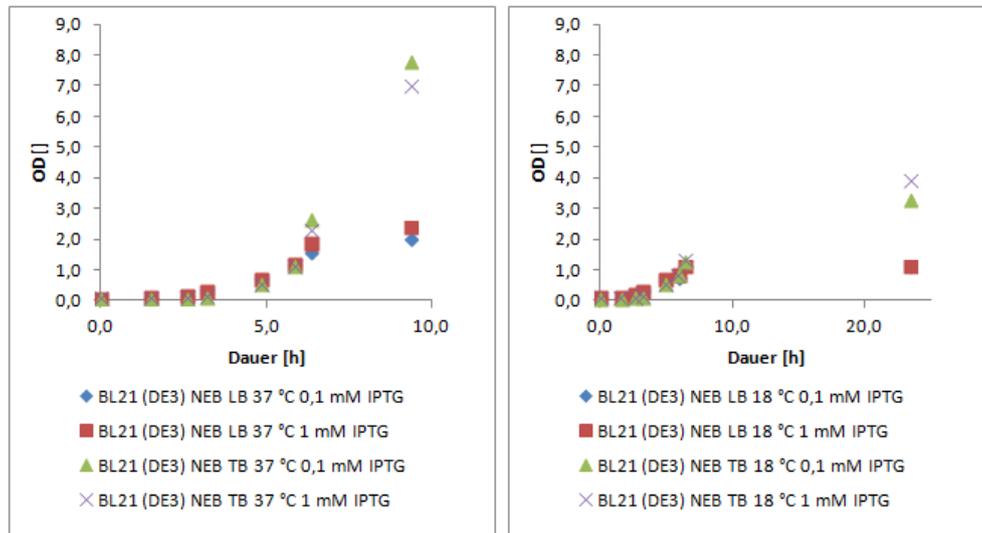
Die Bakterien mit pTriJ-HV-Konstrukt wurden ebenfalls in Testkulturformat getestet. Während der gesamten Kultivierung wurden die optischen Dichten gemessen die Werte sind in der Tabelle unten wiederzufinden.

Tabelle 3 – Der Wachstumsverlauf der Testexpressionen von BL 21 (DE3) NEB-Stämmen, transformiert mit pTriJ-GV-Vektor (GST und 6 x His-Tag) in verschiedenen Medien (TB- und LB-Medien) bei 18 °C (über Nacht) und bei 37 °C (4 Stunden). Induziert wurde mit 0,1 bzw. 1 mM IPTG. [I: Zeitpunkt der Induktion]

Medium	Temperatur [°C]	IPTG [mM]	Dauer [h]									
			0,0	1,5	2,6	3,2	4,8	5,2	5,8	9,3	23,3	
LB	37	0,1	0,09	0,10	0,17	0,27	0,68 (I)	-	1,2	2,0	-	
		1,0	0,09	0,10	0,18	0,30	0,70 (I)	-	1,2	2,4	-	
	18	0,1	0,09	0,10	0,17	0,27	0,64 (I)	-	0,74	-	1,1	
		1,0	0,09	0,10	0,17	0,29	0,69 (I)	-	0,81	-	1,1	
TB	37	0,1	0,09	0,09	0,11	0,16	0,56	0,77 (I)	1,16	7,8	-	
		1,0	0,09	0,09	0,11	0,15	0,55	0,73 (I)	1,12	7,0	-	
	18	0,1	0,09	0,09	0,12	0,16	0,57	0,75 (I)	0,87	-	3,3	
		1,0	0,09	0,09	0,11	0,15	0,54	0,71 (I)	0,84	-	3,9	

Die LB-Kulturen von NEB-Stämmen sind ohne lange Lag-Phasen gewachsen. Sie wurden bereits nach 4,8 Stunden induziert. Die TB-Kulturen von selben Stämmen wurden 20 Minuten später induziert. Die Kulturen von Star-Zellen brauchen länger, um die Induktionsdichte zu erreichen. In LB- Medien wurden die Zellen nach 6,3 Stunden induziert. Zu demselben Zeitpunkt werden auch die Kulturen in TB-Medium induziert, weil sonst die Ernte sehr spät durchgeführt werden müsste.

Tabelle 4 – Grafische Darstellung von den Wachstumsverläufen der Testkulturen. Als Stammwirt wurde BL21 (DE3) NEB Zellen verwendet, die mit pTriJ-GV (mit GST und 6 x His-Tag) transformiert wurden.



Wenn man die Kulturen vergleicht, die sich in IPTG-Konzentration zu dem Zeitpunkt der Induktion unterscheiden, dann wird man feststellen, dass bei 0,1 mM IPTG Konzentration bessere optische Dichten erzielt werden. Ausnahme sind Kulturen von BL21 (DE3) NEB Zellen, die in LB- Medium bei 37 °C kultiviert werden. Allerdings unterscheiden sich die Werte nur geringfügig voneinander. Den sehr ähnlichen Verlauf kann auch bei BL21 (DE3) NEB Zellen in LB-Medium bei 18 °C beobachten. Hier beeinflusst die IPTG-Konzentration bei der Induktion den Wachstumsverlauf der Bakterien nicht.

Nimmt man die Temperatur als Vergleichskriterium, so wird deutlich, dass die Kulturen bei 37 °C fast doppelte Zelldichten erreichen als wenn die gleichen Kulturen bei 18 °C über Nacht kultiviert wurden.

Auch in LB und TB-Medien sind die Unterschiede ersichtlich. In TB-Medien erreichen die Kulturen viel höhere OD-Werte, was nicht weiter verwunderlich ist, denn TB-Medium ist reicher an Nährstoffen, auch wenn die Zellen sich an neue Lebensbedingungen etwas länger anstellen müssen.

Hier ist die Überexpressionsbande auf der Höhe von 50 kDa (48714,7 kDa) zu erwarten.

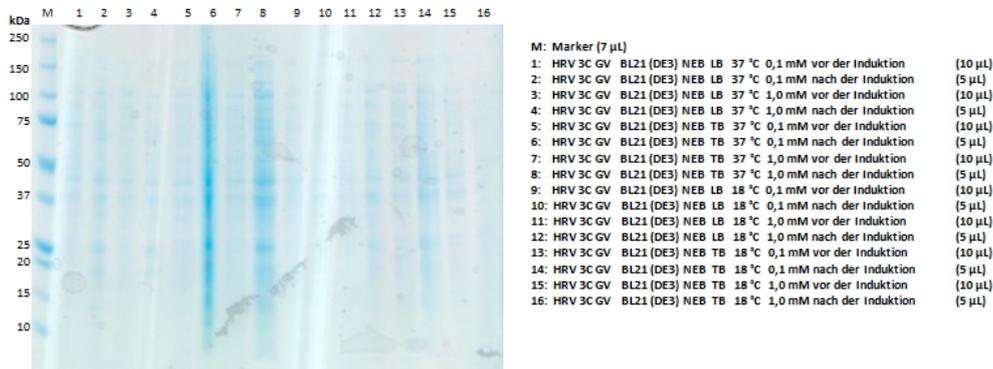


Abbildung 3 – Das SDS-PAGE Gel von Präinduktions- und Induktionsproben von Testkulturen mit pTriJ-GV Konstrukt in BL21 (DE3) NEB, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden.

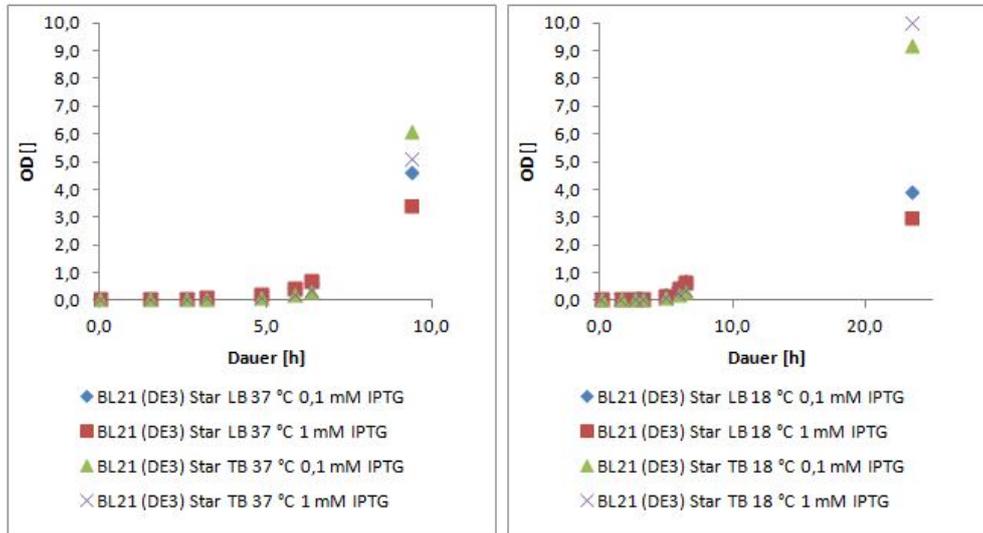
Hier ist zwar keine Expression auf der erwarteten Höhe zu sehen, jedoch bei ersten vier Kulturen sind etwas stärkere Banden auf den Höhen von 20 bzw. 25 kDa zu erkennen, die in der nicht induzierten Probe schwach ausgeprägt sind. Diese Banden sind allerdings nur bei Kulturen, die bei 37 °C gezüchtet wurden, zu beobachten. Die Expression ist hier nicht stattgefunden. Vermutlich ist die Translation der Plasmid-DNA nach Ablesen von GST-Tag abgebrochen worden, sodass nur GST expremiert wurde.

Tabelle 5 – Der Wachstumsverlauf der Testexpressionen von BL21 (DE3) Star-Stämmen, transformiert mit pTriJ-GV-Vektor (GST und 6 x His-Tag) in verschiedenen Medien (TB- und LB-Medien) bei 18 °C (über Nacht) und bei 37 °C (4 Stunden). Induziert wurde mit 0,1 bzw. 1 mM IPTG. [I: Zeitpunkt der Induktion]

Medium	Temperatur [°C]	IPTG [mM]	Dauer [h]								
			0,0	1,5	2,6	3,2	4,8	5,2	5,8	9,3	23,3
LB	37	0,1	0,07	0,07	0,07	0,08	0,19	0,43	0,65 (I)	4,6	-
		1,0	0,07	0,07	0,07	0,09	0,21	0,46	0,70 (I)	3,4	-
	18	0,1	0,07	0,07	0,07	0,08	0,21	0,49	0,71 (I)	-	3,9
		1,0	0,07	0,07	0,07	0,09	0,20	0,45	0,67 (I)	-	3,0
TB	37	0,1	0,07	0,07	0,07	0,08	0,12	0,24	0,38 (I)	6,1	-
		1,0	0,07	0,07	0,07	0,09	0,12	0,24	0,39 (I)	5,1	-
	18	0,1	0,07	0,07	0,07	0,08	0,12	0,24	0,35 (I)	-	9,2
		1,0	0,07	0,07	0,08	0,09	0,12	0,26	0,38 (I)	-	10,0

Bemerkenswert sind auch sehr langen Lag-Phase bei allen Kulturen. Die Bakterienzellen brauchen sehr lange, um sich auf die neue Bedingungen zu gewöhnen, insbesondere in TB-Kulturen. Aufgrund dieser langen Kultivierungsdauer werden die Star-Zellen in TB-Medium früher induziert. Sie erreichen allerdings am Ende der Kultivierung die höchste OD-Werte.

Tabelle 6 – Grafische Darstellung von den Wachstumsverläufen der Testkulturen. Als Stammwirt wurde BL21 (DE3) Star Zellen verwendet, die mit pTriJ-GV (mit GST und 6 x His-Tag)



Bei den Star-Kulturen hat die IPTG-Konzentrationen einen direkten Einfluss auf die Zellwachstum. Im Allgemeinen wachsen die Kulturen nach der Induktion mit 0,1 mM IPTG etwas besser. Die einzigen Ausnahmen sind die Kulturen in TB-Medium bei 18 °C. Lässt man diese Kulturen außer Acht, so ist zu sehen, dass die End-OD bei verschiedenen Kulturen ähnlich ist. Die OD-Werte in TB- Medium sind auch etwas höher. Die Kulturen in TB-Medium weichen von diesen Beobachtungen enorm ab. Sie erreichen die höchsten OD-Werte, die voneinander nicht sehr stark unterscheiden.

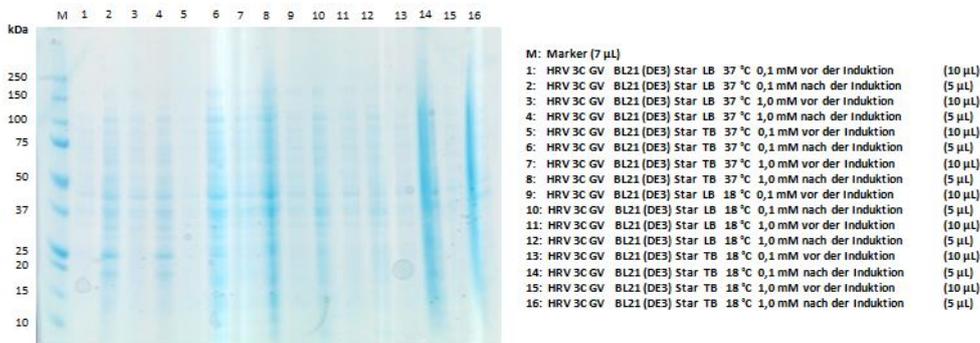


Abbildung 4 – Das SDS-PAGE Gel von Präinduktions- und Induktionsproben von Testkulturen mit pTriJ-GV Konstrukt in BL21 (DE3) Star, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen kultiviert wurden

Auch in der BL21 (DE3) Star ist keine Überexpression auf der theoretischen Höhe zu beobachten. In LB-Kulturen bei 37 °C sind die Banden bei 20 bzw. 25 kDa zu sehen. Sie sind stärker ausgeprägt als bei den Kulturen in BL21 (DE3) NEB. Bei 18 °C sind überhaupt keine Expression zu beobachten. Genauso ist in TB-Kulturen bei 37 °C.

5.3 Pull Downs von pTriJ-Konstrukten

Bevor man mit der Kultivierung und Aufreinigung im Großmaßstab beginnen kann, werden die Pull Downs durchgeführt. Die Ergebnisse werden mit der SDS-PAGE analysiert.

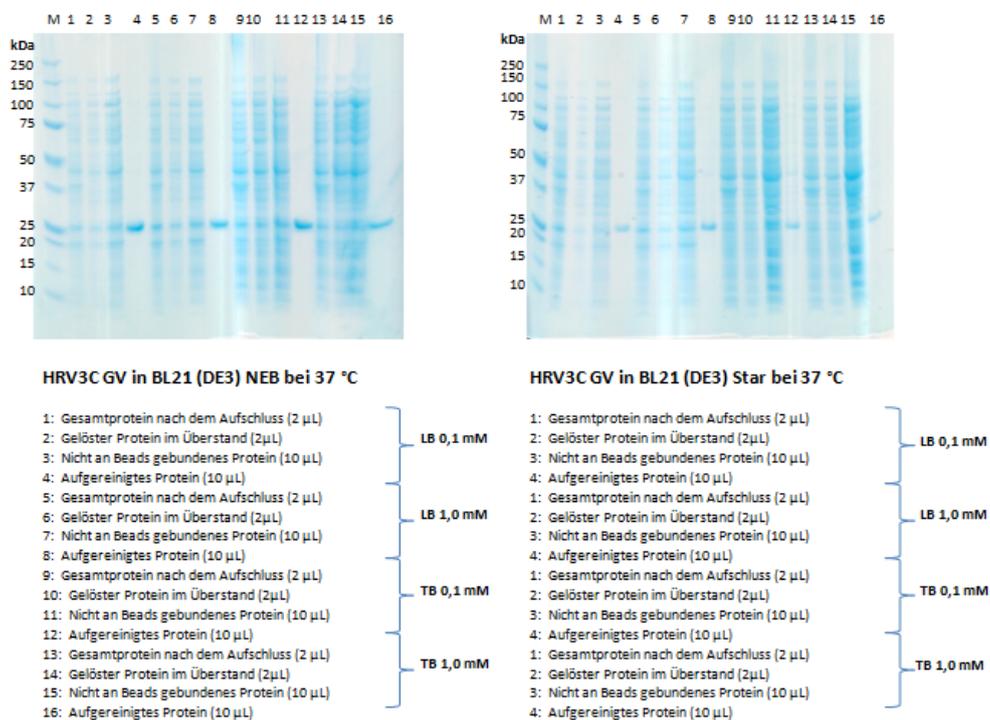


Abbildung 5 – Die SDS-PAGE Gele von den Pull Down Proben aus BL21 (DE3) NEB bzw. Star Stämmen, transformiert mit HRV3C-GV Konstrukt (GST + 6 x His) und kultiviert bei 18 °C.

Wie schon auf dem Gel mit nicht induzierten und induzierten Proben zu sehen ist, beobachtet man bei Konstrukten mit 6 x His und GST-Tags keine Expression von dem Zielprotein. Die Bande soll auf der Höhe von ca. 50 kDa liegen. Dies ist aber nicht auf dem Gel zu beobachten (Abbildung 5), stattdessen wird ein Protein auf der Höhe von 25 kDa aufgereinigt. Vermutlich ist hier nur GST mit-Tag expremiert. Die Expression ist schätzungsweise in Konstrukten in BL21 (DE3) NEB Stamm in LB- und TB-Medien, wenn die Induktion mit 0,1 mM IPTG

erfolgt. Bei allen NEB-Zellen ist zu beobachten, dass ein Teil des Proteins nicht an die Säule bindet. Nach der Zentrifugation wird die Bande im Überstand etwas schwächer als die Bande gleich nach dem Aufschluss, was darauf schließen lässt, dass ein Teil des Proteins unlöslich vorliegt. Die Unterschiede sind aber sehr geringfügig.

Ähnliche Beobachtungen können auch bei Star Kulturen gesammelt werden. Die Expressionsstärke hier ist insgesamt viel niedriger als in NEB- Stämmen.

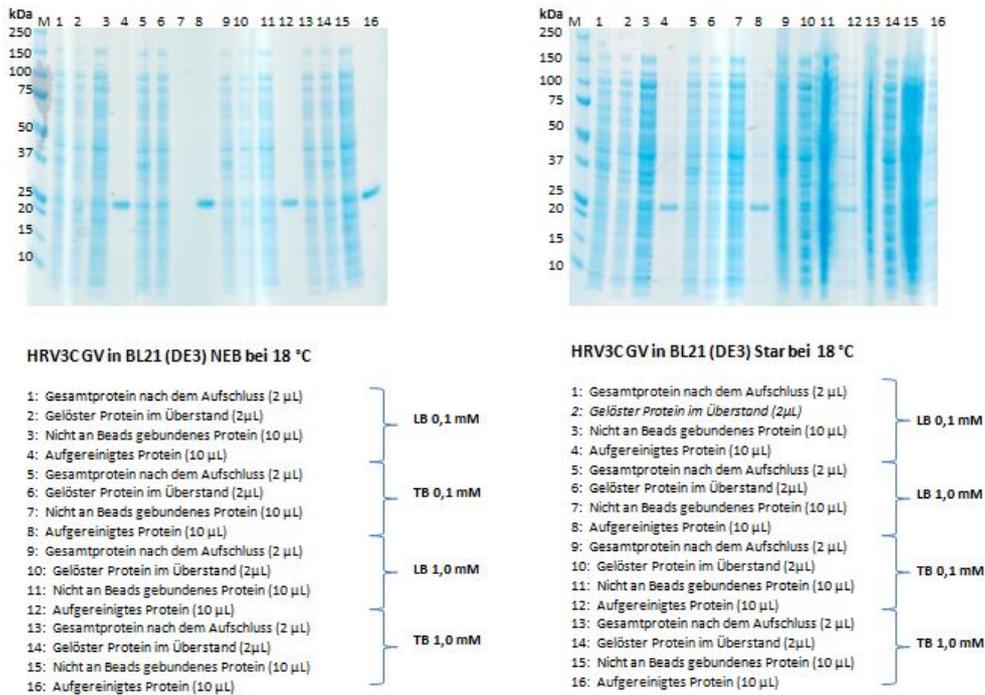


Abbildung 6 – Die SDS-PAGE Gele von den Pull Down Proben aus BL21 (DE3) NEB bzw. Star Stämmen, transformiert mit HRV3C-GV Konstrukt (GST + 6 x His) und kultiviert bei 18 °C.

Die Kulturen mit dem Konstrukt von Zielprotein mit 6 x His und GST-Tags, die bei 18 °C kultiviert werden, exprimieren weder in NEB- noch in Starzellen kein Zielprotein. Die einzige aufgereinigte Bande hat das Molekulargewicht von ca. 25 kDa. Die Elutionsproben von Star Bakterien zeigen dazu mehrere Kontaminationen, die in TB kultivierten Bakterien am stärksten sind.

In der siebten Spur von dem ersten Gel sind keine Banden zu finden. Hier wurde die Probe nicht genommen.

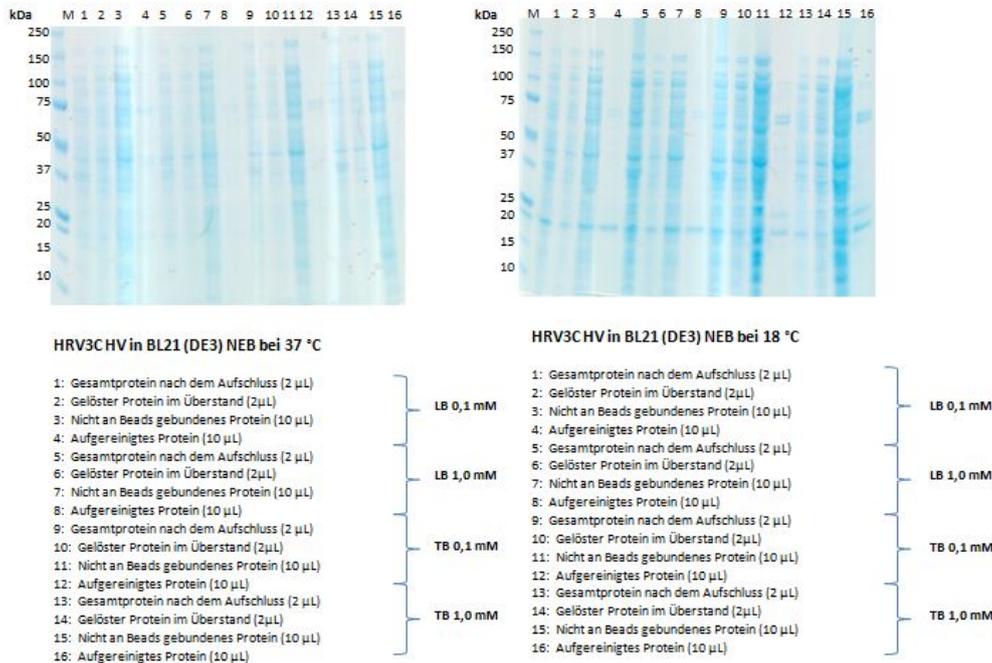


Abbildung 7 – Die SDS-PAGE Gele von den Pull Down Proben aus BL21 (DE3) NEB Stämmen, transformiert mit HRV3C-HV Konstrukt (6 x His-Tag) kultiviert bei 37 °C bzw. 18 °C.

Bei den Konstrukten mit 6 x His-Tag sind die aufgereinigten Banden auf der richtigen Höhe zu finden (ca. 20 kDa).

Auch hier werden die Banden von der Probe direkt nach dem Aufschluss zu den Proben nach der Zentrifugation schwächer und in der Probe mit ungebundenen Proteinen ist ein Teil des Zielproteins zu finden. In der Probe nach der Elution sind außerdem andere Verunreinigungen zu finden. Signifikant sind die Bande unterhalb der 75 kDa Bande. Weitere Verunreinigung befinden sich auf der 25 kDa Höhe. Am unsaubersten sind Proben, die im TB-Medium kultiviert wurden. Die Konzentration von aufgereinigtem Protein ist hier überall ähnlich einzuschätzen. Die Aufreinigung von Zielprotein mit 6 x His-Konstrukt ist bei 18 °C (das zweite Gel) erfolglos gewesen. In den Elutionsproben sind nur Verunreinigungen zu sehen.

Um die Ergebnisse von Pull Down quantitativ zu erfassen, wird die Gesamtproteinkonzentration mit NanoDrop gemessen.

Tabelle 7 – Mittels NanoDrop bestimmten Gesamteinkonzentrationen in den Proben nach der Elution von Pull Downs. Alle Proben wurden doppelt gemessen und anschließend der Mittelwert daraus berechnet.

Konstrukt	Medium	Temperatur [°C]	IPTG [mM]	Konzentration [mg/mL]			
				1	2	Mittelwert	
pTriJ-HV in BL21 (DE3) NEB	LB	37	0,1 1	0,159 0,146	0,176 0,141	0,168 0,144	
		18	0,1 1	0,130 0,082	0,125 0,097	0,128 0,090	
	TB	37	0,1 1	0,303 0,365	0,287 0,325	0,295 0,345	
		18	0,1 1	0,095 0,066	0,101 0,066	0,098 0,066	
	pTriJ-GV in BL21 (DE3) NEB	LB	37	0,1 1	0,738 0,516	0,733 0,538	0,736 0,527
			18	0,1 1	0,378 0,323	0,398 0,349	0,388 0,336
TB		37	0,1 1	0,711 0,642	0,707 0,698	0,709 0,670	
		18	0,1 1	0,397 0,387	0,391 0,37	0,394 0,379	
pTriJ-GV in BL21 (DE3) Star		LB	37	0,1 1	0,356 0,560	0,343 0,578	0,350 0,569
			18	0,1 1	0,550 0,687	0,566 0,703	0,558 0,695
	TB	37	0,1 1	1,295 0,540	1,308 0,538	1,302 0,539	
		18	0,1 1	1,859 2,987	1,819 2,801	1,839 2,894	

Aus der Tabelle 7 kann entnommen werden, dass die Proteinkonzentration von His-getagtem Protein insgesamt sehr niedrig ist. Die besten Ergebnisse sind im TB-Medium bei 37 °C. Die schlechtesten Ergebnisse zeigen die Kulturen in LB- und TB- Medium bei 18 °C. Bessere Ergebnisse zeigen die Kulturen mit dem pTriJ-GV Vektor. Während in NEB Stämmen die Gesamteinkonzentration stets niedriger ausgefallen ist, wenn sie bei 18 °C kultiviert wurden. Die Konzentration von IPTG zu dem Zeitpunkt der Induktion scheint keinen starken Einfluss auf die Expression genommen zu haben. Bei niedrigeren IPTG sind die Proteinausbeuten etwas besser.

Es wurde zusätzlich untersucht, ob die Konstrukte mit dem GST-Tag auch die 6 x His-Tag besitzen. Dafür wurde die Aufreinigung mit NiNTA- Beads durchgeführt. Es wurden auch entsprechende Puffer mit Imidazol verwendet. Für das Experiment wurden die Kulturen mit den höchsten Proteinkonzentrationen genommen, nämlich Star-Kulturen, die im TB-Medium

bei 18 °C kultiviert und verschiedenen IPTG- Konzentrationen induziert wurden.

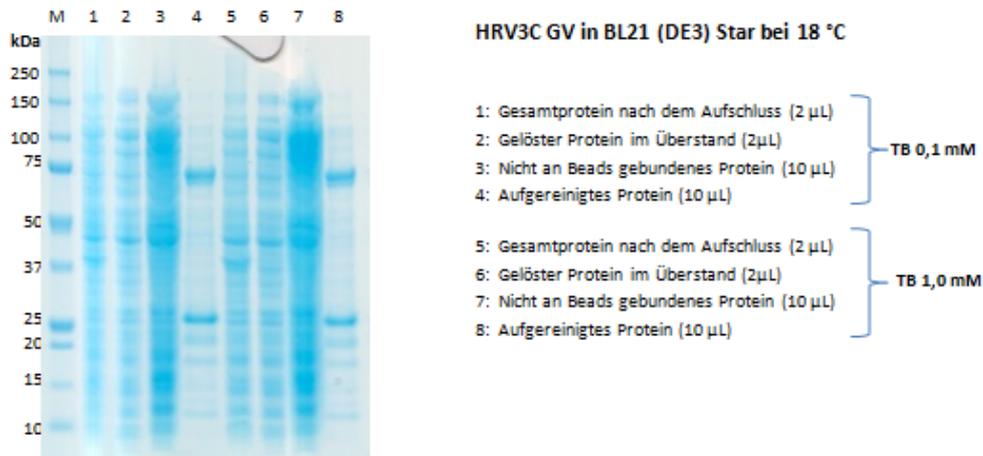


Abbildung 8 – Das SDS-PAGE Gel von den GST-getagten Proteinen nach dem Pull Down mit NiNTA-Agarose-Beads, um festzustellen, ob der His-Tag an den Protein vorhanden ist.

Wie es auf dem Gel zu sehen ist, kann das Protein mit NiNTA-Agarose-Beads aufgereinigt werden. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Protein einen His-Tag besitzt. Die Proben nach der Elution weisen mehrere Kontaminationen auf. Vor allem ist die Bande auf der Höhe von 75 kDa besonders signifikant. Diese Bande sieht schwächer aus als nach der Aufreinigung mit Glutathion- Sepharose-Beads (vgl. Abbildungen 6, rechtes Gel, Spur 9-16).

5.4 Kultivierung und Aufreinigung von HRV3C Protease mit GST-Tag und 6 x His-Tag im Großmaßstab

Für die Hauptkultur wurden folgende Bedingungen ausgewählt:

Expressionsvektor: pTriJ-GV
Stamm: BL21 (DE3) Star
Medium: TB
IPTG-Konzentration: 1,0 mM
Expressionstemperatur: 18 °C
Expressionsdauer: Über Nacht (ca. 16 h)
Kultivierungsvolumen: 12 L

Zum Zeitpunkt der Inokulation hat die Vorkultur den OD-Wert von 2,1 erreicht. Weil die optische Dichte sehr niedrig ist, wird die Hauptkultur sehr dünn angeimpft. Die 12 L Hauptkultur wurden auf 8 Flaschen mit jeweils 1,5 L aufgeteilt und im LEX-System kultiviert.

Tabelle 8 – Wachstumsverlauf von Hauptkultur von BL 21 (DE3) Star mit HRV3C-GV-Konstrukt (GST + 6 x His) in TB-Medium im LEX-System. Vor der Induktion wurde die Temperatur gesenkt (T) und später mit 1 mM IPTG induziert (I). Die Expression findet über Nacht bei 18 °C statt.

Nr. der Schottflasche	Dauer [h]									
	0,0	1,0	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	20,5	
1	0,04	0,06	0,15	0,30	0,47	0,67 (T)	0,78	0,86 (I)	1,3	
2	0,03	0,08	0,16	0,29	0,40	0,57 (T)	0,73	0,76 (I)	2,0	
3	0,05	0,11	0,18	0,30	0,39	0,58 (T)	0,61	0,65 (I)	0,9	
4	0,02	0,05	0,13	0,25	0,37	0,46 (T)	0,58	0,61 (I)	1,0	
5	0,06	0,08	0,19	0,30	0,36	0,53 (T)	0,63	0,69 (I)	1,2	
6	0,02	0,08	0,13	0,23	0,34	0,45 (T)	0,54	0,55 (I)	1,1	
7	0,03	0,06	0,14	0,28	0,37	0,53 (T)	0,57	0,59 (I)	1,4	
8	0,03	0,06	0,16	0,25	0,37	0,50 (T)	0,57	0,59 (I)	1,4	

Die Bakterienkultur wächst mit einer viel kürzeren Lag-Phase als in der Vorkultur. Bereits nach 3,5 Stunden wird die Temperatur auf 18 °C herunter gedreht. Wahrscheinlich war die Kühlung zu stark, sodass die Zellen danach viel schwächer wachsen als erwartet. Zwei Stunden danach werden sie schließlich induziert.

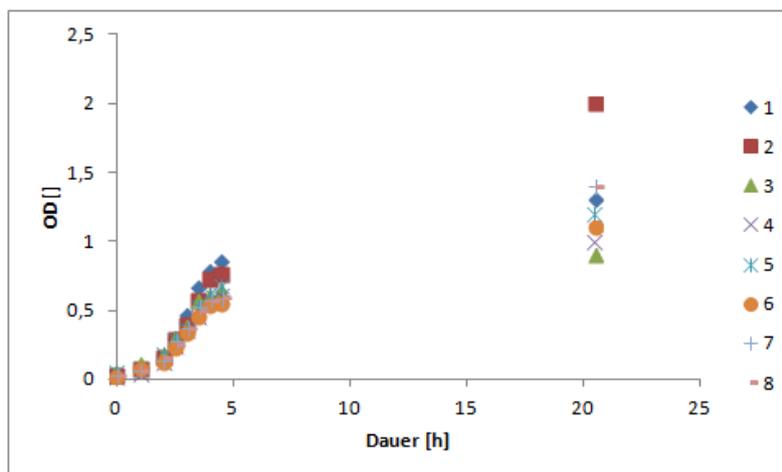


Abbildung 9 – Grafische Darstellung von dem Wachstumsverlauf In verschiedenen Schottflaschen von Hauptkulturen von BL 21 (DE3) Star mit HRV3C-GV-Konstrukt (GST + 6 x His) in TB-Medium und kultiviert im LEX-System. Vor der Induktion wird Temperatur gesenkt (T) und später mit 1 mM IPTG induziert (I). Die Expression findet über Nacht bei 18 °C statt.

Wie in der Abbildung 9 zu sehen ist, wachsen alle Kulturen sehr ähnlich. Nur in der zweiten Flasche gibt es etwas abweichend hoher OD-Wert bei der Ernte.

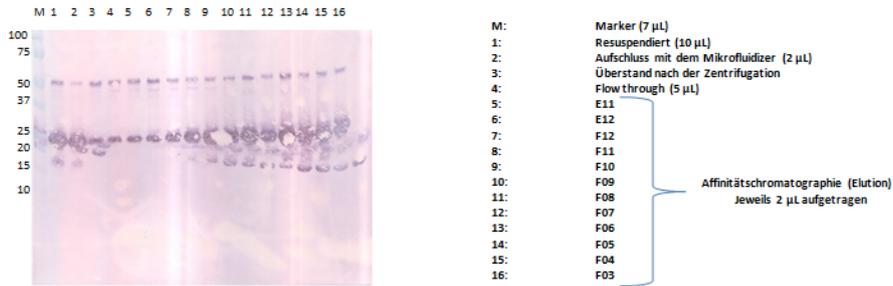


Abbildung 10 – Die Western Blot Membran von der 12 L Kultur vor und nach der Induktion, um die Expression zu analysieren. Western Blot wird mit AntiGST Antikörper als primärer Antikörper und AntiMouse IgG als sekundärer Antikörper durchgeführt.

Um zu zeigen, dass ein Konstrukt mit GST-Tag expremiert wurde, wurde Western Blot mit Antikörper gegen GST durchgeführt. Auf der Membran ist deutlich eine Bande auf der Höhe von 25 kDa zu beobachten, die nur in der induzierten Probe vertreten ist. Es sind außerdem keine weitere Komponente enthalten, gegen die AntiGST Antikörper unspezifisch binden.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Expression von GST erfolgreich geklappt hat. Allerdings, wie die Gele von der Abbildung 6 zeigen, wird kein Zielprotein (erwartet auf der Höhe von ca. 50 kDa) expremiert.

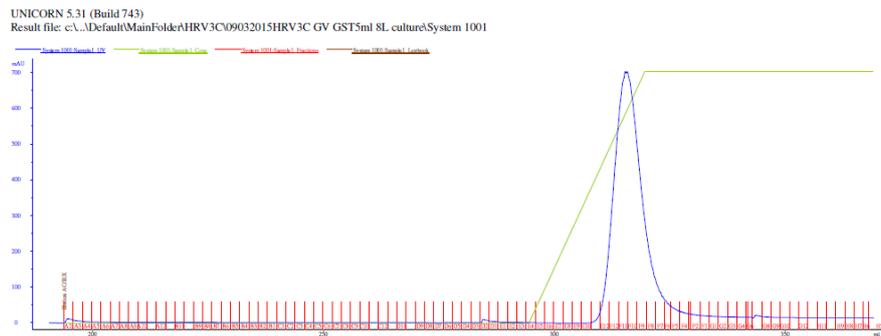


Abbildung 11 – Chromatogramm von der Affinitätschromatografie mit der GSTrap™ HP 5 mL. Die Flussrate beträgt 4 ml/min. Elution erfolgt mit dem linearen Gradienten von AC Elutionspuffer (mit reduziertem Glutathion).

Aus dem Chromatogramm (Abbildung 11) ist zu entnehmen, dass nach Einsetzen von reduzierten Glutathion ein großer Peak zu sehen ist, wo sich das Protein sich am wahrscheinlichsten befindet. Dieser Peak eluiert ziemlich spät und hat kleinen Tailing.

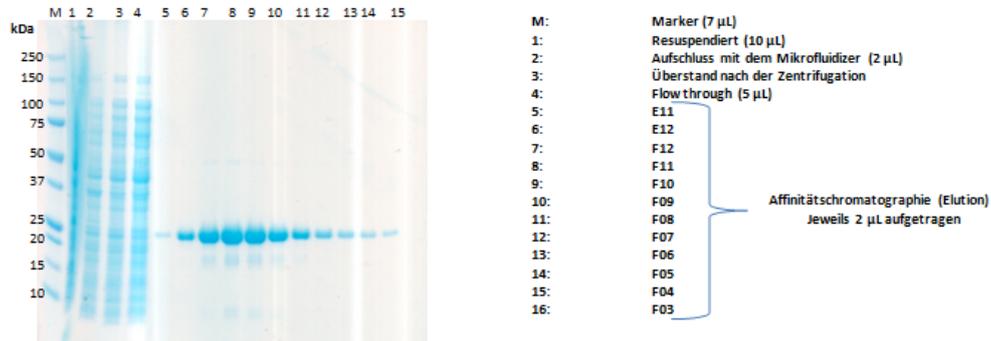


Abbildung 12 – Das SDS-PAGE Gel mit den Proben von der Vorbereitung zur Affinitätschromatografie und den Proben von dem Durchfluss und Fraktionen.

Nach der Affinitätschromatografie wird deutlich, dass das Protein (GST-Tag) sich in reiner Form gewinnen lässt. Nur die wenigen Verunreinigungen sind zu beobachten. Auf der Höhe von 50 kDa ist eine sehr schmale Bande zu sehen. Auch unterhalb der Bande von Zielprotein sind wenige Kontaminationen sichtbar.

Um sicher zustelle, dass sich um GST handelt wird ein Western Blot durchgeführt.

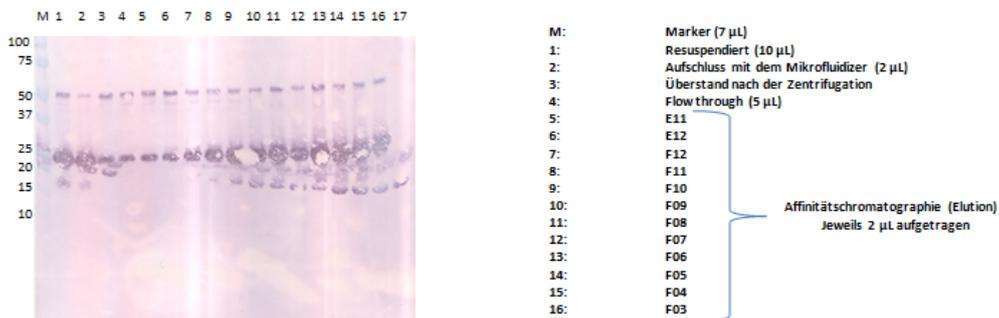


Abbildung 13 – Die Western Blot Membran mit den Proben von der Vorbereitung zur Affinitätschromatografie und den Proben von dem Durchfluss und Fraktionen.

Zu sehen ist, dass in den Proben hauptsächlich ein Protein mit dem Molekulargewicht zwischen 20 und 25 kDa vorhanden ist, was dem Molekulargewicht von GST-Tag entspricht. Weitere Bande bei 50 kDa ist hochwahrscheinlich das rekombinante Protein mit His - und GST- Tags. Die Banden lassen sich erst jetzt erkennen, weil auf der Säule die Ankonzentrierung der Probe stattgefunden hat. In einigen Proben sind außerdem die Banden unterhalb der 20 kDa zu sehen. Es handelt sich wahrscheinlich um Abbauprodukte von GST-Tag oder Zielprotein.

Auf dem SDS-PAGE Gelen von Pull Downs sind die Banden von der HRV3C Protease nicht sichtbar. Deswegen wird ein Vergleich erneut ein Western Blot von den gepoolten Fraktionen

nach der Affinitätschromatografie mit Proben von den Pull Down verglichen.



Abbildung 14 – Die Western Blot Membran von den Proben vor und nach der Affinitätschromatografie verglichen mit den entsprechenden Proben vom Pull Down.

Die Ergebnisse der Affinitätschromatographie werden auf dieser Western Blot Membran mit den Ergebnissen der Pull down verglichen. In der ersten Spur nach Marker folgt eine Probe mit dem von der Säule eluiertes Protein. Es ist eine sehr starke Bande zu sehen, die auf der Höhe zwischen 25 und 20 kDa liegt. Es handelt sich hierbei um den GST Tag. Eine deutlich schmalere Bande etwas über den 50 kDa Bande ist das Zielprotein mit dem gebundenen GST- und His-Tag. Die weiteren schwachen Banden sind die Verunreinigungen bzw. die Abbauprodukte. Es folgt die Spur mit dem Durchfluss von der Säule. In dieser Probe ist die nicht an der Säule gebundene Komponente zu sehen. Mit dem Western Blot ist deutlich zu erkennen, dass ein Teil von GST-Tag ist nicht an die Säule gebunden. Die Proben von Gesamtprotein nach dem Aufschluss mit dem Mikrofluidizer und im Überstand nach der Zentrifugation sehen ähnlich aus. Die starke Bande mit Molekulargewicht im Bereich von GST Tag mit einigen Verunreinigungen. Die Banden auf der Höhe des Zielproteins sind kaum zu erkennen. Die Erklärung ist die niedrige Konzentration von Zielprotein, während es in dem Pool sehr konzentriert ist. Die Ergebnisse von den Pull down sind relativ ähnlich mit den Proben von Large Scale Aufreinigung. Die Proben von Pull down zeigen wenige Kontaminationen, die mit Anti-GST Antikörpern festgestellt werden können. Außerdem ist die Proteinbande im Pool Down etwas kleiner.

Um den GST-Tag von dem Protein zu trennen wird anschließend die Gelfiltration durchgeführt.

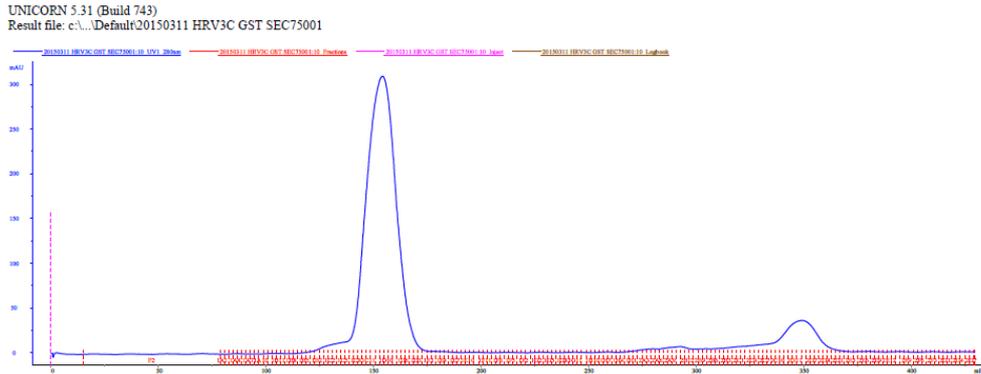


Abbildung 15 – Chromatogramm von der Größenausschlußchromatografie mit der HiLoad 26/600 Superdex™ 75 µg. Die Flussrate beträgt 2,0 mL/min.

Auf den ersten Blick kann man aus dem Chromatogramm entnehmen, dass GST sich von einigen Komponenten getrennt hat. GST wird unter dem höchsten Peak vermutet. Der Peak sieht sehr symmetrisch aus. Unter dem letzten Peak befindet sich wahrscheinlich die rekombinante HRV3C Protease.

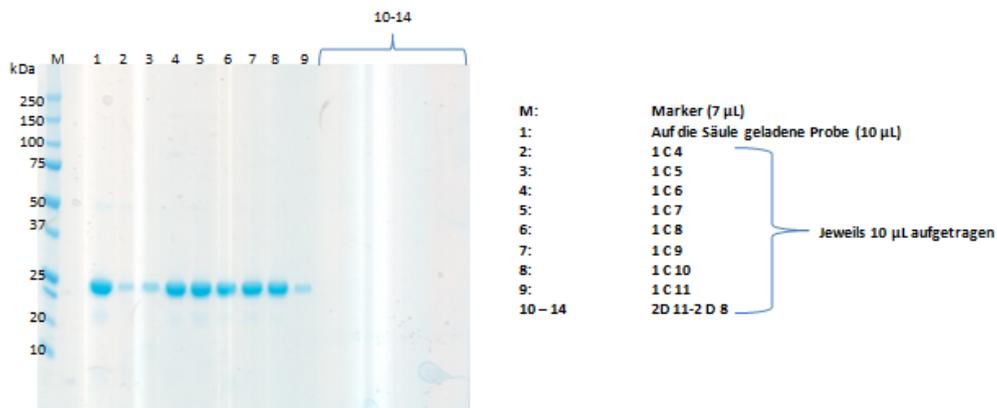


Abbildung 16 – Das SDS-PAGE Gel von den Proben nach der Größenausschlußchromatografie.

Auf dem Gel sind nur die Banden von dem höchsten Peak zu sehen, unter dem der GST-Tag zu finden. Ist. Unter dem letzten Peak, wo das Zielprotein vermutet wird, ist auf dem Gel nichts zu sehen. Auch die Konzentration lässt sich nicht mehr messen.

5.5 Auswertung der Testexpressionen mit pET-28a(+) Plasmid

Aufgrund der schlechten Expressionsergebnissen von mit dem pTriJ-Vektor, wurden einige Änderungen in den Klonierungsvektor vorgenommen. Das Zielgen für HRV 3C Protease wur-

de in pET-28a(+)-Vektor umklontiert. Es wurde auf eine TEV-Schnittstelle verzichtet. Die Protease hat einen zusätzlichen C-terminalen His-Tag, die Aufreinigung erleichtern soll.

Die BL21 (DE3) NEB Zellen von Invitrogen werden mit dem Plasmid transformiert. Daraus wird eine Vorkultur angeimpft.

Die Vorkultur ist über Nacht auf den OD-Wert von 4,3 gewachsen. Daraus wurden die Testkulturen inokuliert.

Anders als bei den ersten Testkulturen wurde keine Pause zwischen Erreichen der Induktions-OD und Induktion gelassen. Sie wurden also sofort induziert.

Tabelle 9 – Der Wachstumsverlauf der Testexpressionen von BL21 (DE3) NEB-Stämmen, transformiert mit pET-28(+) Konstrukt in verschiedenen Medien (TB- und LB-Medien) bei 18 °C (über Nacht) und bei 37 °C (4 Stunden). Induziert wurde mit 0,1 bzw. 1 mM IPTG. [I: Zeitpunkt der Induktion]

Medium	Temperatur [°C]	IPTG [mM]	Dauer [h]									
			0,0	1,0	2,0	2,5	2,8	3,3	6,8	7,3	23,3	
LB	37	0,1	0,10	0,18	0,55	0,82 (I)	-	-	2,3	-	-	
		1,0	0,10	0,18	0,56	0,81 (I)	-	-	1,9	-	-	
	18	0,1	0,09	0,18	0,57	0,83 (I)	-	-	-	-	1,6	
		1,0	0,10	0,19	0,55	0,77 (I)	-	-	-	-	1,4	
TB	37	0,1	0,09	0,10	0,31	0,47	0,63	0,97 (I)	-	3,3	-	
		1,0	0,09	0,12	0,31	0,47	0,63	0,95 (I)	-	2,4	-	
	18	0,1	0,08	0,11	0,30	0,47	0,63	0,93 (I)	-	-	2,6	
		1,0	0,09	0,11	0,31	0,47	0,62	0,93 (I)	-	-	2,4	

Die während der Kultivierung gemessenen OD-Werte werden in der oberen Tabelle zusammengefasst.

Während der Beobachtung des Wachstumsverlaufs der Bakterien ist aufgefallen, dass die Lag-Phase im TB-Medium viel länger gedauert hat. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Umstellung des Stoffwechselprozesses der Bakterien auf neue Nährstoffzusammensetzung des Mediums. Erst nach ca. einer Stunde kommen sie aus der Lag-Phase heraus und fangen an zu wachsen.

Die Zellen im LB-Medium wachsen mit einer viel kürzeren Lag-Phase, wahrscheinlich weil die Vorkultur auch in LB-Medium durchgeführt wurde. Die Mikroorganismen haben also ähnliche Bedingungen, was die Nähkomponente betrifft. Sie wurden bereits nach zweieinhalb Stunden induziert.

45 Minuten später wurden auch die Bakterien im TB-Medium induziert.

Die bei 37 °C induzierten Kulturen wurden nach vier Stunden geerntet und die bei 18 °C induzierten Kulturen wurden über Nacht kultiviert.

Tabelle 10 – Die Daten von den Pull Downs von den Testkulturen, die unter verschiedene Bedingungen kultiviert wurden.

Medium	Temperatur [°C]	IPTG [mM]	End-OD []	Masse des Pellets [g]
LB	37	0,1	2,3	0,15
		1,0	1,9	0,06
	18	0,1	1,6	0,09
		1,0	1,4	0,07
TB	37	0,1	3,3	0,20
		1,0	2,4	0,15
	18	0,1	2,6	0,18
		1,0	2,4	0,15

Bis auf die Probe aus LB-Medium kultiviert bei 18 °C und induziert mit 1,0 mM IPTG erscheinen alle Werte plausibel. Dort scheint entweder der OD-Wert oder das Gewicht falsch ermittelt zu sein. Dies kann passieren, wenn die Probe nicht gründlich durchgemischt wurde. Am wahrscheinlichsten ist der tatsächliche OD der Probe etwas niedriger.

Die Kulturen mit dem hohen OD haben entsprechend mehr Pellet. Die vereinbare ODs haben auch ähnliche Pelletmassen.

Aus niedrigeren OD-Werten kann eine Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Kulturen nach der Induktion nicht mehr so gut gewachsen sind. Ein möglicher Indikator auf die toxische Wirkung der Expression. Wie stark diese Expression ist, kann allerdings erst mit dem SDS-PAGE analysieren.

Die OD-Werte für die vierstündige Expression bei 37 °C sind in LB- und TB- Medium höher, wobei die Kulturen, die mit 0,1 mM IPTG induziert wurden, wiederum in beiden Medien besser gewachsen sind. Bei den Kulturen, die bei 18 °C über Nacht gewachsen sind, haben die Kulturen in TB-Medium ebenfalls höhere OD-Werte als in LB.

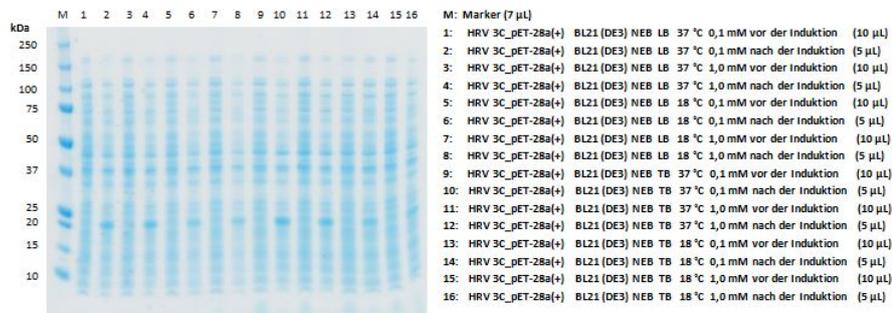


Abbildung 17 – Das SDS-PAGE Gel von den Präinduktions- und Induktionsproben von Testkulturen mit pET-28a(+) Konstrukt, die unter verschiedenen Parameter kultiviert wurden.

Die Analyse der nicht induzierten und induzierten Probe auf dem SDS-PAGE zeigen, dass die

Expression in allen Testkulturen erfolgreich durchgelaufen ist. Eine Bande auf der Höhe von 20 kDa ist nur in induzierten Proben zu sehen und nicht in den Proben vor der Induktion. Also es findet keine „leaky expression“ statt. Besonders starke Banden sind in LB und TB- Medium bei 37 °C zu beobachten. Dennoch muss es noch analysiert werden, ob der Protein auch löslich ist oder in „Inclusion Bodies“ eingeschlossen. Es ist kein Unterschied zwischen Testkulturen, die mit 0,1 mM oder 1 mM IPTG induziert wurden, zu beobachten. Für die Analyse von pull downs wurden die Kulturen genommen, die mit 1 mM IPTG- Konzentration induziert wurden.

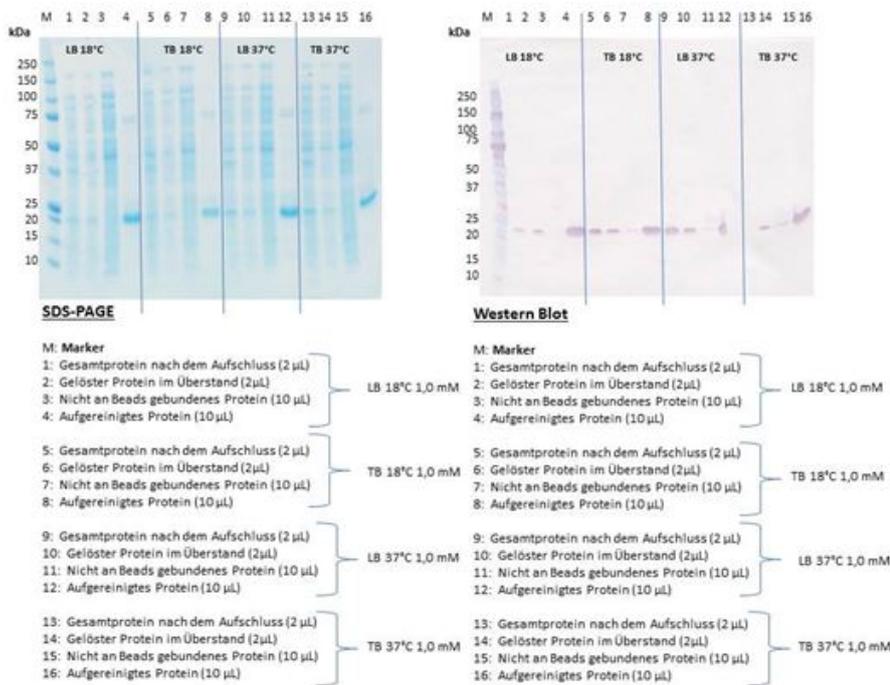


Abbildung 18 – Vergleich von dem SDS-PAGE Gel mit der Western Blot Membran von Pull Down Proben der Testkulturen.

Die Analyse mit dem SDS-PAGE zeigt sehr erfreuliche Ergebnisse. Es ist gelungen sehr viel Protein zu gewinnen. Das Zielprotein hat das Molekulargewicht von 21,363 kDa, was der starke Bande auf der Höhe von etwa 20 kDa entsprechen wurde. In LB-Medium bei 37 °C sowie bei 18 °C sind deutlich stärkere Banden in den Elutionsproben zu beobachten. Alle Elutionsproben weisen geringfügige Verunreinigungen auf der Höhe von ca. 75 kDa.

Der wahrscheinliche Grund ist, dass ein Teil des Proteins, exprimiert in TB-Medium, unlöslich vorliegt. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen wurde ein Western Blot durchgeführt. In den Proben aus LB- Medium kultiviert bei 18 °C ist zu sehen, dass die Proben nach Aufschluss fast genauso stark sind wie nach der Zentrifugation. Also liegt hier fast gesamtes Zielprotein in löslicher Form. In der Probe nach dem Waschschrift (Ungebundenes Protein) ist kein Zielprotein zu beobachten. Dieses Bild entspricht dem von SDS-PAGE.

Die Proben, genommen aus der bei 18 °C in TB-Medium kultivierten Testkultur, zeigen ähnliche Bild. Die Banden in der Probe nach dem Aufschluss und Zentrifugation sind stärker. Die Bande nach der Zentrifugation ist nicht wesentlich schwächer als nach dem Aufschluss, allerdings ein gewisser Verlust an Zielprotein ist zu beobachten. Auch in der Probe nach dem Waschschrift ist eine schwache Bande zu sehen. Sie ist auf dem SDS-PAGE nicht zu sehen. Folglich liegt ein Teil des Proteins ungebunden vor. Die Bande von der Elutionsprobe ist schwächer als von Testkultur aus LB-Medium bei 18 °C.

Deutlich stärkere Banden sind bei den Proben von LB-Medium bei 37 °C zu erkennen. Auch hier liegt nicht das gesamte Protein löslicher Form vor. Eine schwache Bande in der Probe nach dem Waschschrift weist auf das ungebundene Protein hin. Die Elutionsprobe ist vollständig gefärbt worden. Der Grund kann eine Luftblase sein.

Die Bande in der Probe nach dem Aufschluss von TB-Kultur bei 37 °C ist leider nicht zu sehen, aber nach dem SDS-PAGE-Gel zu beurteilen, muss sie stärker sein als die Bande nach der Zentrifugation. Auch hier hat ein Teil des Proteins nicht gebunden.

Für die Kultivierung in dem Großmaßstab kommen vor allem die LB-Kulturen in Frage. Einen besseren Überblick kann die Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford verschaffen.

Tabelle 11 – Die Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung der Proben mit pET28a(+)-Plasmid, transformiert in BL21 (DE3) NEB Stamm, mit dem NanoDrop.

Probenbezeichnung	Gesamtproteinkonzentration [mg/mL]			
	1	2	3	Mittelwert
HRV3C_pET-28a(+) BL21 (DE3) NEB LB 37 °C 1,0 mM IPTG	0,640	0,641	0,644	0,642
HRV3C_pET-28a(+) BL21 (DE3) NEB LB 18 °C 1,0 mM IPTG	0,528	0,528	0,528	0,528
HRV3C_pET-28a(+) BL21 (DE3) NEB TB 37 °C 1,0 mM IPTG	0,322	0,322	0,321	0,322
HRV3C_pET-28a(+) BL21 (DE3) NEB TB 18 °C 1,0 mM IPTG	0,279	0,279	0,279	0,279

Die Gesamtproteinkonzentration nach Bradford zeigt, dass die Konzentration in der LB-Medium bei 37 °C am größten ist. Man findet die Ergebnisse von Gelauswertung wieder. Die Expression in LB-Medium ist stärker als in TB. Bei 37 °C exprimiert das Protein besser als bei 18 °C.

5.6 Kultivierung und Aufreinigung von HRV 3C Protease im pET-28a(+)-Plasmid

Für die Großmaßstabmaßstabkultivierung wird die Kultur mit folgenden Bedingungen gewählt:

Expressionsvektor: pET-28a(+)

Stamm: BL21 (DE3) NEB

Medium: TB

IPTG-Konzentration: 1,0 mM

Expressionstemperatur: 37 °C

Expressionsdauer: 4 h

Kulturvolumen: 12 L

Die Kultivierung ist mit Ansetzen einer Vorkultur gestartet, die zu dem Zeitpunkt der Inokulation den OD-Wert von 5,2 erreicht hat. Mit der Vorkultur wurden acht Flaschen mit je 1,5 L inokuliert.

Tabelle 12 – Wachstumsverläufe von Hauptkultur von BL 21 (DE3) NEB mit pET-28(+)
in TB-Medium im LEX-System. Die Induktion erfolgt mit 1,0 mM IPTG. Die Expression erfolgt 4 Stunden lang bei 37 °C.

Nr. der Schottflasche	Dauer [h]			
	0,0	1,0	2,2	6,2
1	0,11	0,20	1,08 (I)	2,6
2	0,12	0,20	0,98 (I)	2,4
3	0,11	0,19	0,90 (I)	2,4
4	0,11	0,18	0,80 (I)	2,3
5	0,11	0,18	0,87 (I)	2,4
6	0,11	0,18	0,97 (I)	2,9
7	0,10	0,18	0,73 (I)	2,3
8	0,11	0,17	0,73 (I)	2,3

Die Hauptkultur ist sehr schnell gewachsen. Schon nach etwa 2 Stunden wurde die Kultur inokuliert. Nach vier Stunden der Expression haben die Kulturen die optischen Dichten zwischen 2,3 und 2,9, was in dem Bereich von dem OD-Wert der Testkultur liegt (2,3). Aus 12 L wurden 31,7 g Zellpellet geerntet. Der Verlauf der Kultivierung ist unten nochmal grafisch dargestellt.

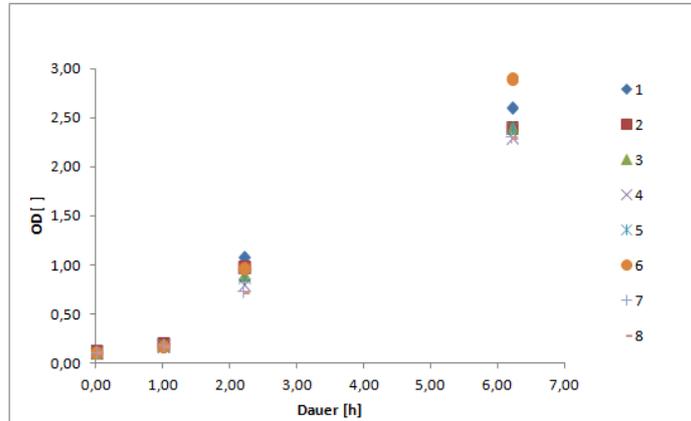


Abbildung 19 – Grafische Darstellung von Wachstumsverläufen von Hauptkulturen von BL 21 (DE3) NEB mit pET-28(+) in TB-Medium im LEX- System. Die Induktion (I) erfolgt mit 1,0 mM IPTG. Die Expression erfolgt 4 Stunden lang bei 37 °C

In alle Schottflaschen kann ähnliche Wachstumsverläufe beobachten, die besonders an Anfang der Kultivierung kaum voneinander unterscheiden und erst bei der Ernte wird die Streuung etwas größer.

Die Betrachtung des Wachstumsverlaufs ist nicht ausreichend über den Erfolg der Expression zu beurteilen. Es muss die SDS-PAGE Analyse der nicht-induzierten und induzierten Proben erfolgen.

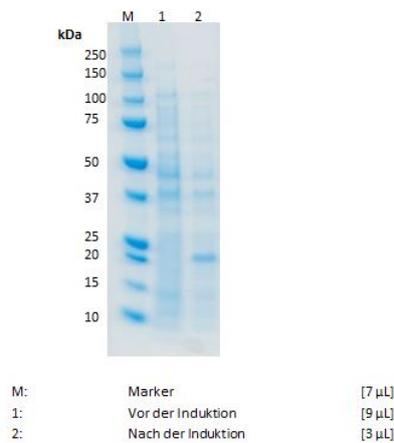


Abbildung 20 – Das SDS-PAGE Gel von nicht induzierten und induzierten mit pET-28a(+)-Vektor transformierten BL21 (DE3) NEB in der Hauptkultur. Die Kultivierung erfolgt im TB-Medium. Expression findet bei 37 °C für 4 h statt. Induktion erfolgt mit 1 mM IPTG.

Auf dem Gel ist deutlich zu sehen, dass die Bakterien das gewünschte Zielprotein exprimieren. Auf der Höhe von 20 kDa ist eine Bande zu sehen, die nur in der induzierten Probe vorhanden ist und nicht in der Vorinduktionsprobe zu sehen. Vor der Induktion findet keine Expression statt („leaky expression“).

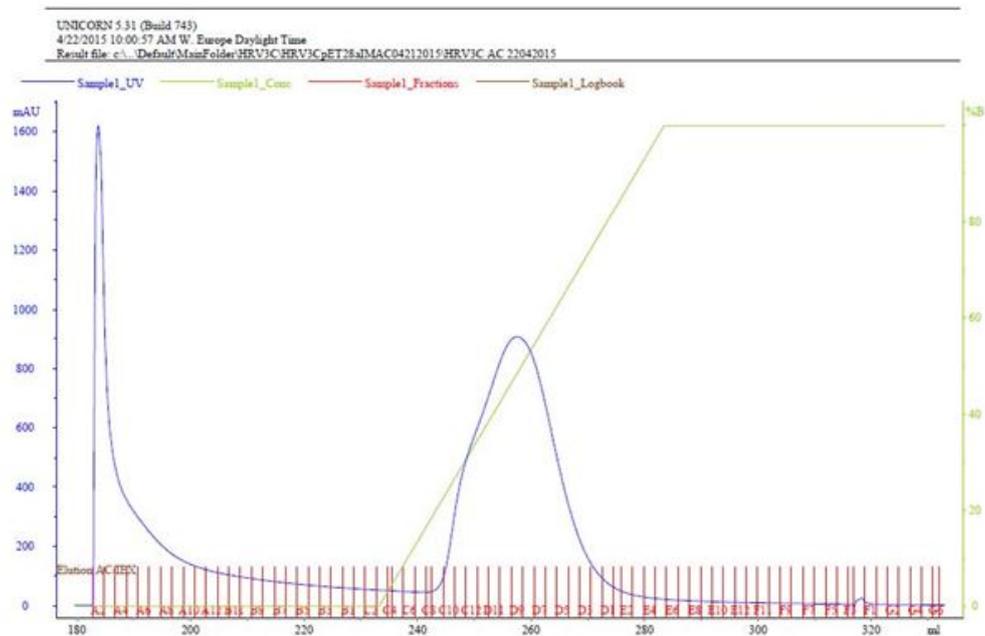


Abbildung 21 – Chromatogramm von der IMAC mit HiTrap™ 5 mL FF crude. Die Flussrate beträgt 4 mL/min. Elution erfolgt mit linearen Gradienten mit Imidazol-haltigen IMAC Elutionspuffer.

Vor dem Gradienten ist ein großer Peak zu sehen. Es handelt sich vermutlich um die nicht an der Säule gebundenen Verunreinigungen, da es davon ausgegangen wird, dass das Zielprotein an die Säule bindet.

Nach dem Einsetzen Imidazolgradient ist ein einziger großer Peak zu sehen. Dort wird das Zielprotein vermutet. Da der Peak nicht symmetrisch ist (ein kleiner Buckel am Anfang), werden die Fraktionen am Anfang des Peaks durch andere Verunreinigungen kontaminiert. Es handelt sich also hiermit also um einen anderen Peak, der mit dem Zielprotein-Peak überlagert. Die Fraktionen am Abstieg des Peaks sind vermutlich sauberer. Bei dem Waschvorgang mit 300 mM Imidazol-Konzentration sind einige Proteine eluiert worden. Es sind die Proteine, die sehr starke Affinität zu der stationären Phase haben.

Genauem Bild über die Reinheit der Probe und über Vorhandensein des Zielproteins in der Probe liefert die SDS-PAGE Analytik.

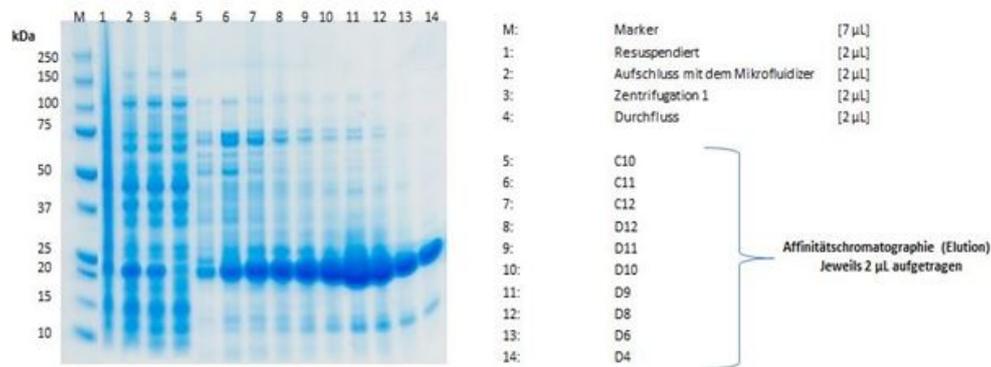


Abbildung 22 – SDS-PAGE Gel mit den Proben vor und nach der Affinitätschromatografie.

In der ersten Spur ist nach der Resuspension genommene Probe zu sehen. Die Spur ist stark verwischt, dennoch kann man Überexpressionsbande von dem Zielprotein sehen. Die Proben nach dem Aufschluss mit dem Mikrofluidizer und nach der Zentrifugation sehen ähnlich aus, wobei die Probe auf der zweiten Spur etwas mehr verwischt ist. In der vierten Spur sind die meisten Verunreinigungen zu finden. Es ist wenig von dem Zielprotein in Vergleich zu der Spur davor in dieser Probe erhalten. Es folgen die Fraktionen mit eluierten Zielprotein.

Das Gel nach der Affinitätschromatografie zeigt wie vermutet eine noch nicht saubere Probe. Die ersten Fraktionen sind stärker kontaminiert, während die letzten Fraktionen beinahe sauberes Protein vorhanden ist. Die Reinheit der Probe wird auf 60% geschätzt.

Um die Reinheit der Probe zu erhöhen, wird eine Ionenaustauscherchromatografie durchgeführt. Damit die Proteine an der Säule binden können, muss die Salzkonzentration im Puffer reduziert werden. Dies geschieht durch eine Verdünnung mit dem gleich zusammengesetzten Puffer ohne Salz. Die Probe wird 1:10 verdünnt. Nach der Verdünnung sind Flocken in der Lösung zu beobachten, sodass ein zusätzlicher Schritt notwendig, um sie zu entfernen. Eine zwanzigminütige Zentrifugation von 4860 x g bei 4 °C führt zu keiner Verbesserung. Es wird eine Filtration vorgenommen. Erst danach kann eine klare Lösung erreicht werden. Die zusätzlichen Aufreinigungsschritte können zu Proteinverlusten führen. Dennoch sind sie wichtig, denn diese Präzipitate zur Verstopfung der Chromatografieanlage oder Säule führen können und somit im schlimmsten Fall enorme Kosten und lange Wartezeiten für die Reparatur nach sich ziehen würden.

Der Verlauf der Anionenaustauscherchromatografie ist auf dem unteren Chromatogramm abgebildet.

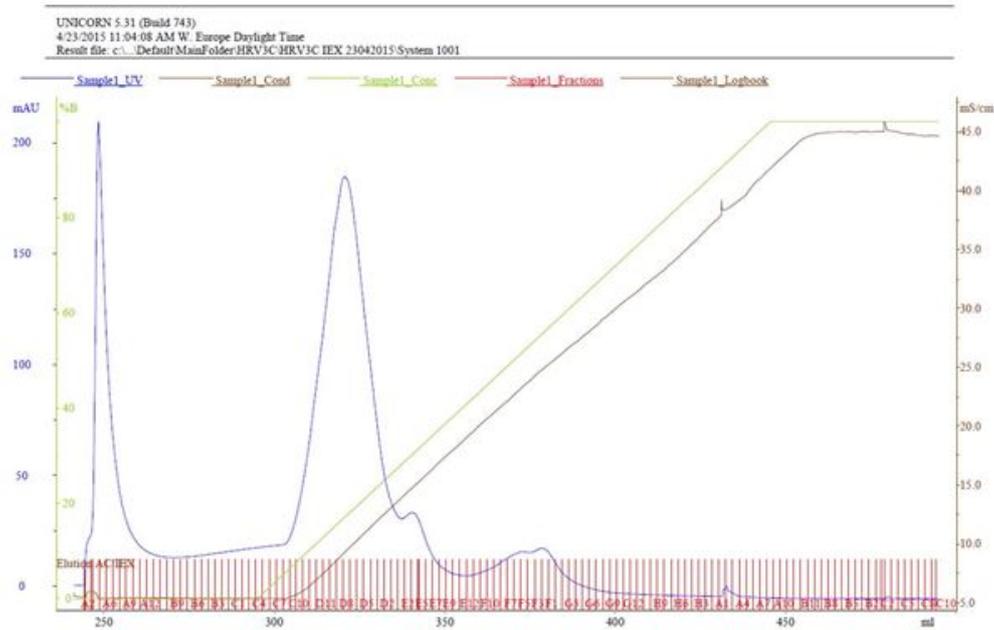


Abbildung 23 – Chromatogramm nach der Ionenaustauscherchromatografie mit HiTap™ Q HP 5 mL. Die Flussrate beträgt 4 mL/min. Es wird mit linearen Salzgradienten eluiert.

Zuerst eluieren die Komponente, die nicht an der Säule binden. Es handelt sich um positiv geladene Proteine. Im Idealfall wären das alle Verunreinigungen, die in der Probe noch vorhanden sind. Die Realität sieht aber anders aus. Gleich nach Beginn der Elution mit dem Salzgradienten ist ein großer Peak zu sehen. Dort wird das Zielprotein vermutet. Dieser Peak überlagert sich mit einem viel kleineren Peak. Anschließend kommen die weiteren Peaks mit Verunreinigungen.

Von besonderem Interesse sind die beiden Peaks zwischen 300 mL und 350 mL. Hier wird das Zielprotein vermutet. Außerdem kann die Aussage getroffen werden, wie stark das Zielprotein in dem folgenden Peak kontaminiert ist.

Also um sich mehr Gewissheit über die Zusammensetzung der ausgewählten Fraktionen zu verschaffen, wird eine SDS-PAGE Analyse herangezogen.

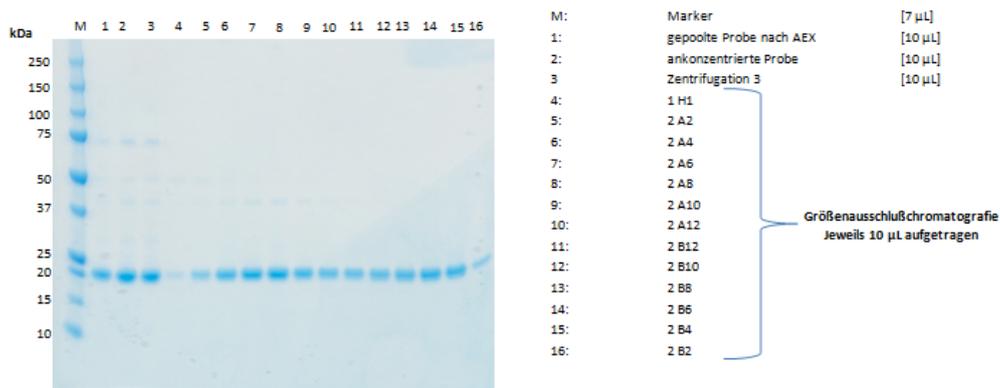


Abbildung 24 – Das SDS-PAGE Gel von den Proben von und nach der Ionenaustauscherchromatografie.

Auf dem oberen Gel sind die Ergebnisse der AEX festgehalten.

Zunächst kommt die Spur mit der verdünnten gepoolten nach IMAC Probe. Durch die Verdünnung sind die Kontaminationen schlechter sichtbar geworden. Doch die Annahme, dass die Probe sauber ist wäre hier irreführend.

Die zusätzlichen Schritte für die Entfernung der Flocken aus der Probe scheinen keinen sichtbaren Einfluss auf das Zielprotein genommen zu haben (Spur 2 und 3).

In dem Durchfluss ist noch sehr viel Protein vorhanden. Die weiteren Kontaminationen sind nicht zu sehen.

Durch die Anionenaustauscher wurden die meisten Kontaminationen entfernt. Die Reinheit der Probe ist auf 90 % einzuschätzen. Wobei die letzten fünf Proben unsauber sind. Es werden Fraktionen von C9 bis D5 gepoolt. Es wird auf die letzten Fraktionen wegen der Bande bei 20 kDa verzichtet. Die Verunreinigung ist signifikant und kann aufgrund der geringen Molekularmassenunterschied zu Zielprotein nicht durch Gel-Permeation-Chromatografie nicht getrennt werden. Dieser Entscheidung ist auch mit dem Verlust des Zielproteins verbunden. Die Kontaminationen in der gepoolten Probe sollen durch Gel-Permeation-Chromatografie abtrennbar sein.

Es sollen maximal 15 mL auf die Säule aufgetragen werden. Deswegen muss die Probe noch verdünnt werden. Dies geschieht mit Konzentratoren. Nach der Ankonzentrierung sind einige Präzipitationen zu sehen. Diese können diesmal durch eine Zentrifugation abgetrennt werden. Folglich wird die Probe mit dem Loop auf die Säule aufgetragen.

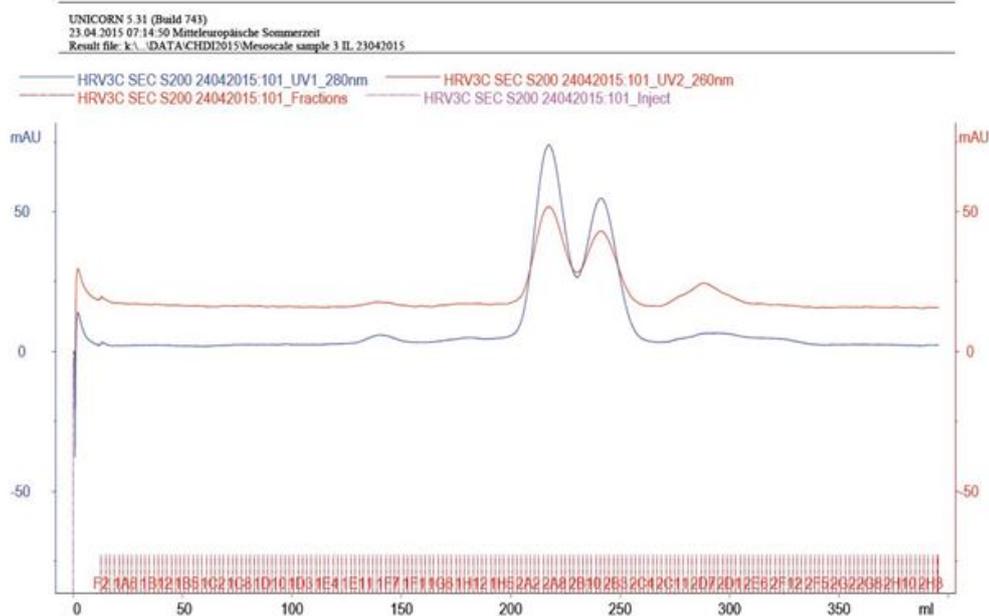


Abbildung 25 – Chromatogramm von Größenausschlusschromatografie mit HiLoad 26/600 Superdex™ 200 pg. Die Flussrate beträgt 2,0 mL/min.

Auf dem Chromatogramm sind zwei große Peaks zu erkennen, die ungefähr zwischen 200 mL und 250 mL liegen. Die Vermutung ist, dass das Protein Aggregate gebildet hat und deswegen zu unterschiedlichen Zeiten eluierte. Die beiden Peaks sind nicht vollständig voneinander getrennt. Es gibt eine Überlagerung zu erkennen. Ihre Masse unterscheidet sich also nicht ausreichend genug, um eine bessere Auflösung hinzubekommen.

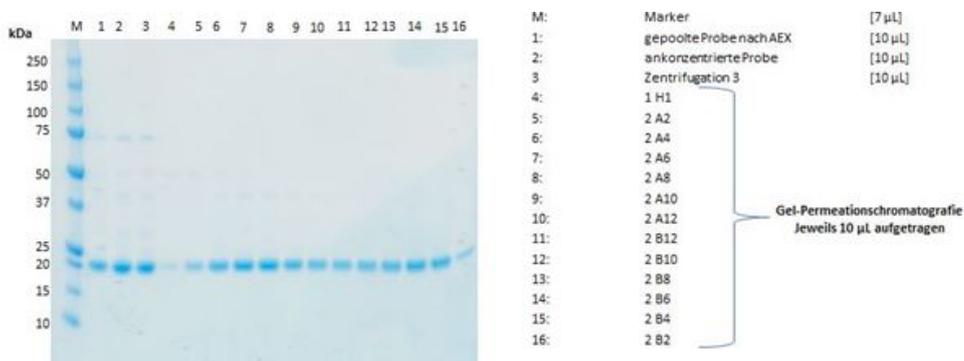


Abbildung 26 – Das SDS-PAGE Gel von für die Größenausschlusschromatografie vorbereiteten, sowie nach der Chromatografie aufgenommene Fraktionen.

Nach dem Marker folgen die nach AEX zusammengemischten Fraktionen, die zuerst ankonzentriert und danach durch Zentrifugation von ausgefallenen Komponenten getrennt werden. Während die ersten beiden Proben durch die Stärke der Bande unterscheiden, sind die Proben vor und nach der Zentrifugation nicht sichtlich verändert.

Das Gel zeigt, dass in beiden Peak das Zielprotein zu finden ist. In allen aufgetragenen Fraktionen ist die Reinheit der Proteinlösung sehr hoch und liegt geschätzt zwischen 99 % und 100 %.

Die Peaks werden in zwei verschiedene Pools gesammelt.

Vor dem Aktivitätstest wird ein zusätzlicher Test durchgeführt, um zu sehen, dass die Protease aktiv ist. Wenn das nicht der Fall sein soll, lohnt sich auch kein Assay durchzuführen. Bei diesem Versuch wird zusätzlich ermittelt bei welcher Temperatur und Konzentration die Protease am besten schneiden. Dabei werden zwei Temperaturen (29 °C und 4 °C) gewählt. Es wird die Konzentration zwischen 1 µg, 5 µg und 10 µg variiert. Die Proben von 29 °C werden nur 2 Stunden inkubiert, während die Inkubation bei 4 °C über Nacht dauert, um sicher zu gehen das gesamte Protein geschnitten wird. Die Konzentration des Testproteins bleibt unverändert (125 µg/mL).

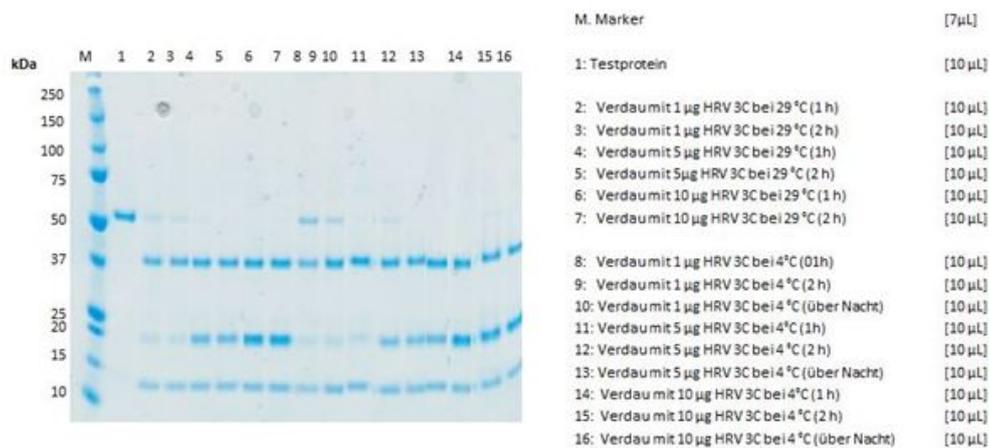


Abbildung 27 – Das SDS-PAGE Gel nach dem Verdautes mit den Protease aus beiden Pools zu verschiedenen Zeitpunkten. Der Verdautes wurde mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen bei 37 °C bzw. 18 °C mit 10 µg von Testprotein durchgeführt.

Zunächst sieht man, dass die Zugabe der Protease zu keinen zusätzlichen Kontaminationen geführt hat. Auf dem Gel spielen nur vier Banden eine Rolle. Die erste Bande über 50 kDa (53,1 kDa) ist das Testprotein, der nach dem Verdau in zwei Banden aufgespaltet wird. Die schwere Untereinheit hat das Molekulargewicht von 39,1 kDa und die leichtere von 14 kDa. Die Bande auf der Höhe von ca. 20 kDa ist die Protease selbst. Die Stärke dieser Bande spiegelt die unterschiedlichen Konzentrationen der HRV 3C Protease in der Probe.

Des Weiteren ist nach der Analyse des zweiten Pools deutlich zu sehen, dass die Protease in allen Fällen geschnitten hat. In der ersten Spur nach dem Marker ist das ungeschnittene Protein zu sehen, deren Molekulargewicht etwas über 50 kDa liegt. Es sind außer dem Protein

keine weitere Banden zu beobachten. Bereits nach einer Stunde kann man deutliche Ergebnisse erkennen. Am schlechtesten wird das Protein geschnitten, wenn die Konzentration der Protease bei 1 μg liegt, wobei bei 4 °C schlechter geschnitten wird als bei 29 °C, was nicht sehr verwunderlich ist. Allerdings wird die Probe bei 29 °C nicht komplett geschnitten, ein sehr geringer Teil bleibt übrig. Die Verlängerung der Inkubationsdauer würde eventuell zur vollständig geschnittenen Protein führen. Bei 5 μg und 10 μg von HRV 3C Protease führt bereits nach 1 Stunde zur komplett geschnittenen Protein.

Meisten muss man bei 4 °C arbeiten, um die Verluste der Proteinaktivität zu vermeiden, so dass 1 μg ausreichen würde, um 10 μg von Protein mit Zielsequenz vollständig über Nacht zu schneiden. Soll es dabei unter dem Zeitdruck gearbeitet werden, so kann man die Konzentration um das Fünffache erhöhen, um bereits nach zwei Stunden das Protein geschnitten zu haben.

5.7 Optimierung der Aufreinigung

Zu Verbesserung der Aufreinigung wurden einige Veränderungen vorgenommen. Zuerst wurde der Einfluss von einen zusätzlichen Waschschrift mit 300 mM NaCl Konzentration eingeführt. Erhofft wurde, dass mehr Kontaminationen entfernt werden können.

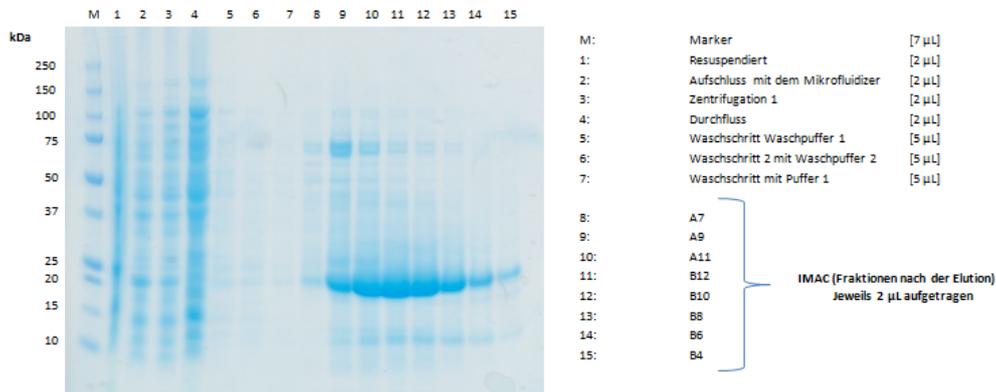


Abbildung 28 – SDS-PAGE von den Proben genommen vor und nach der IMAC. Zusätzlich wurden die Proben nach dem Waschschrift mit IMAC Waschpuffer mit der Salzkonzentration von 300 mM aufgetragen.

Wie in der Abbildung 28 zu sehen ist, hat die Vorüberlegung mit Einbau von zusätzlichen Waschschrift mit eine Waschpuffer mit der NaCl-Konzentration von 300 mM, hat nur bedingt geholfen. Zwar wurden einige Kontaminationen, wie auf der Spur sechs zu sehen ist, aus der Probenmenge entfernt, aber auch ein Teil des Proteins (Bande auf der Höhe von ca. 20 kDa) geht verloren.

Im Vergleich zu dem SDS-PAGE Gel vor der IMAC (Abbildung 22) konnte das ähnliche Bild beobachtet werden.

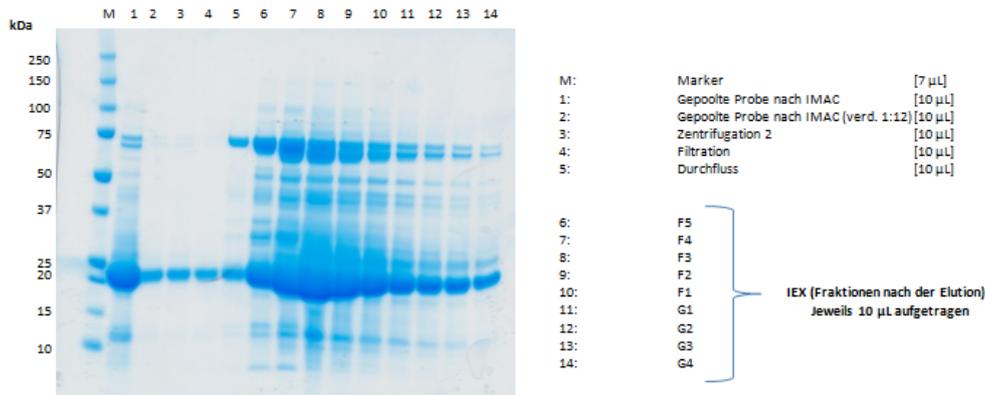


Abbildung 29 – SDS-PAGE von den Proben genommen vor und nach der IEX. Aufgrund der Systemfehlers wurde falsche Methode für die Elution ausgewählt

Auf der Abbildung 29 ist das Gel nach der Ionenaustauscherchromatografie dargestellt. Nach IMAC wurden die Proben zusammengefügt und auf die Spur 1 neben den Marker aufgetragen. Zu sehen ist, dass noch viel Protein in der Probe vorhanden ist. Einige Verunreinigungen sind noch deutlich sichtbar. Da die Konzentration von Salz in der Probe noch hoch und das die Bindung des 3C Protease an die stationäre Phase beeinflussen kann, wird die Probe 1:12 verdünnt. Nach der IMAC sind 30 mL rausgekommen, die auf das Gesamtvolumen von 360 mL mit dem IEX Waschpuffer ohne Salz aufgefüllt wurden, sodass die NaCl-Endkonzentration 25 mM beträgt. Die Probe ist auf der Spur 2 zu sehen. In dieser Probe sind die Verunreinigungen sehr schwach zu sehen. Auch wie bei der vorherigen Aufreinigung sind viele weiße Flocken gebildet worden, die nicht durch die Zentrifugation (Spur 3) getrennt werden können. Erst die Filtration mit Membranfilter (0,2 µm) bringt die gewünschte Trennung (Spur 4). Die Manipulationen scheinen keinen Einfluss auf die 3C Protease zu haben. Im Durchfluss ist noch viel Zielprotein zu sehen. Bei der Einstellung des Programms für die Aufreinigung ist ein Fehler aufgetreten. Anstatt der programmierten Methode wurde eine falsche Methode ausgewählt. Die Elution wurde im Step Gradient durchgeführt. Also eluierten das Protein zusammen mit allen anderen Kontaminationen, was in den Spuren von 6 bis 14 zu beobachten ist. Die Proben wurden zusammengefügt und zentrifugiert, weil die Probe sehr milchig war. Nach der Zentrifugation ist die Probe durchsichtig geworden, es gibt aber viel Pellet. Anschließend wird die Probe nochmal 1 zu 40 verdünnt. Nach der IEX sind es 4 mL (500 µL pro Fraktion) von Gesamtproteinlösung rausgekommen.

160 mL wurden für den zweiten IEX Lauf auf die Säule aufgetragen.

Beim zweiten Versuch wurde die richtige Methode durchgeführt.

Nach den ersten Aufreinigung wurden festgestellt, dass das Zielprotein bei 20 % Gradienten von Elutionspuffer eluiert. Für die bessere Trennung von dem anderen Verunreinigungen, wird nach einem Waschschrift ein Stufengradient auf 20 % von Elutionspuffer für 10 CV eingestellt.

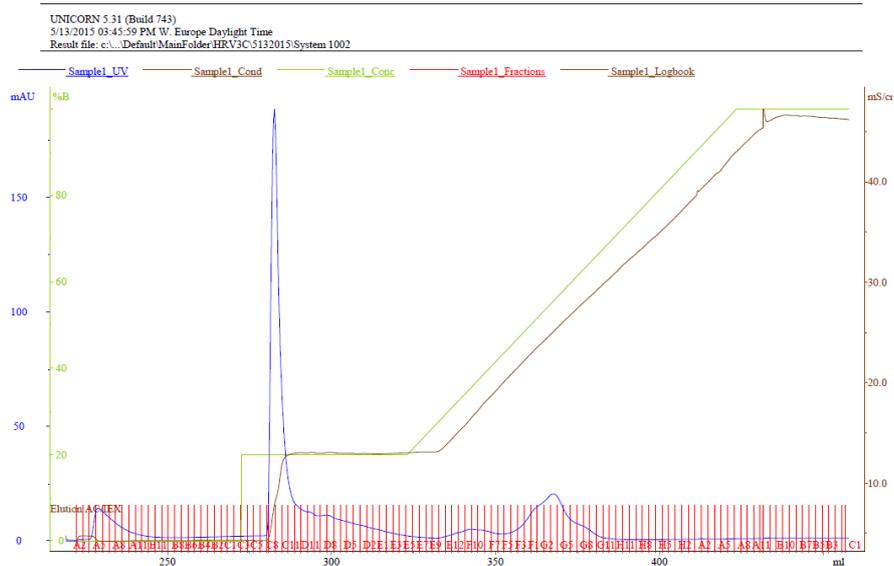


Abbildung 30 – Chromatogramm von der IEX mit HiTrap™ Q HP 5 mL. Die Flussrate beträgt 4 mL/min. Elution erfolgt mit einem Stufengradienten von 20 % IEX Elutionspuffer über 10 CV, wo die HRV 3C Protease eluieren sollte, und die weiteren Bestandteile der Probe werden mit linearen Gradienten eluiert.

Auf der Abbildung 29 kann man einen einzigen Peak unter den Stufen beobachten, der im Vergleich mit der Abbildung 23 besser getrennt ist. Der Peak ist relativ schmal und hat einen leichten Tailing.

Das SDS-PAGE Gel liefert die Ausschlüsse über die Reinheit der Probe.

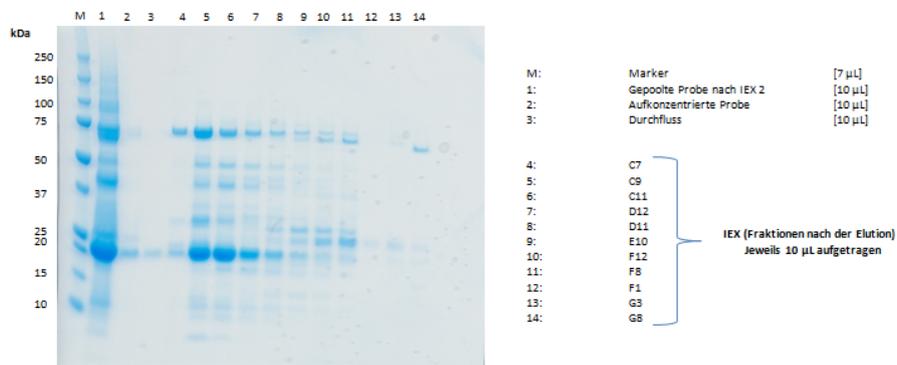


Abbildung 31 – SDS-PAGE von dem Gel vor und nach der Ionenaustauscherchromatografie.

Auf dem Gel ist leider zu beobachten, dass nicht viel von der Protease vorhanden ist. Im Vergleich zu Kontaminationen ist sie schwächer ausgeprägt, trotz der Auftragung von 10 μL Probe pro Spur.

Die anschließende Größenausschlusschromatografie hat dazu beigetragen, dass die Probe noch zusätzlich verdünnt wird. Genau wie bei der vorherigen Aufreinigung sind es zwei sehr kleine Peaks gewesen. Am Ende wurden sehr niedrige Konzentrationen von 0,0036 mg/mL für den ersten Pool und 0,005 mg/mL für den zweiten Pool gemessen. Die weitere Verarbeitung der Probe erscheint nicht mehr zweckmäßig.

5.8 Proteinanalytik

5.8.1 SDS-PAGE

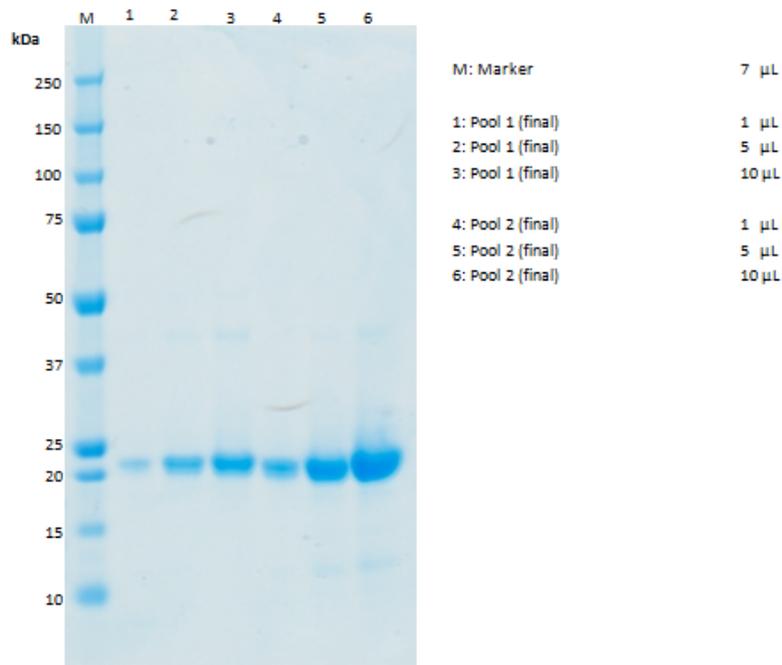


Abbildung 32 – SDS-PAGE von finalen Proben aus dem ersten und den zweiten Pool zur Bestimmung der Reinheit.

Auf dem Gel (Abbildung 32) sind die finalen Proben aus den beiden Pools in verschiedenen Volumina aufgetragen worden. Zunächst ist die theoretisch zu erwartete Bande in beiden Pools zu sehen. Die Menge von Zielprotein in den ersten Pool ist geringer als in zweiten. Dies äußert sich in schwächeren Bandenstärken im Vergleich zu den Banden mit jeweils gleichen Volumina in dem zweiten Pool. Die Proben sind ziemlich rein, nur auf der Höhe von ca. 40-45 kDa ist eine Kontaminationsbande zu sehen. Im Pool 2 kann außerdem eine sehr schwache Bande

unterhalb der 15 kDa Marke beobachten. Die Reinheit der Probe in beiden Pools kann auf 99 % geschätzt werden.

5.8.2 Aktivitätsassay

Damit die Messergebnisse am besten bestimmt werden können, wird der Abstand zu der Messeinheit manuell bestimmt.

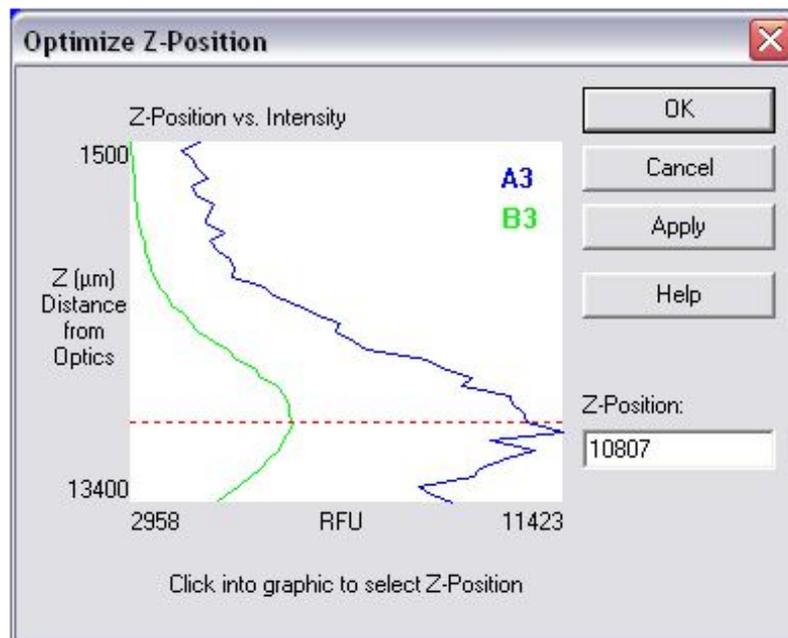


Abbildung 33 – Ermittlung des optimalen Abstandes für die Messung der Intensivität von zwei mit der Probe gefühlten Wells.

Auf der Grafik ist die Z-Position (Abstand zwischen Messprobe und Optik) gegen Intensivität aufgetragen. Die maximale Intensivität für zwei Wells wurde bei 10807 μm ermittelt.

Um die Aktivität der Protease bewerten zu können wird zusätzlich die Aktivität der kommerziell erhältliche Protease von Novagen gemessen.

Bei der Messung der Aktivität wurde die Steigung der Fluoreszenz ermittelt, was dem Substratumsatz pro Minuten entsprechen wurde (Umsatzgeschwindigkeit). Die Umsatzgeschwindigkeit wird anschließend gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Als Ergebnis entsteht die Grafik für Michaelis-Menten Kinetik.

In der Abbildung 35 werden die Michaelis-Menten-Kinetiken untereinander Verglichen. Bis auf die zweite Grafik kann der hyperbolische Verlauf angenommen werden. In der zweiten Grafik sind bei niedriger Substratkonzentration keine Aktivitäten festzustellen. Während ab

Substratkonzentration von 250 μM steigt die Umsatzgeschwindigkeit exponentiell an. Die Verläufe der Michaelis-Menten-Kinetiken für die Protease von Novagen und aufgereinigten Protease in zweiten Pool ähnlich, dennoch sind die Werte für Umsatzgeschwindigkeiten bei der isolierten Protease etwas kleiner.

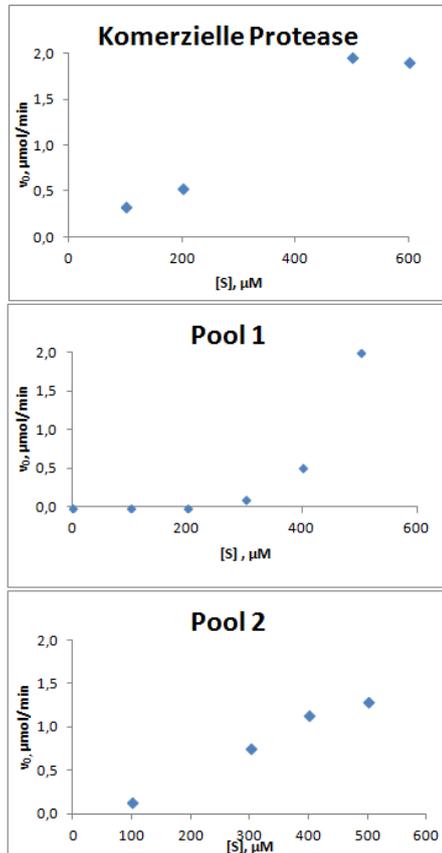


Abbildung 34 – Vergleich der Michaelis-Menten Kinetiken von kommerziellen Protease und der aufgereinigten Protease in zwei Pools.

Durch Lineweaver-Burk werden die reziproken Werte der Umsatzgeschwindigkeit und Substratkonzentration gegeneinander aufgetragen, sodass der Graph linearisiert wird. Der Schnittpunkt mit der Ordinate ist der reziproke Wert der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit. Der zweite wichtige Punkt liegt an der Schnittstelle von Trendlinie und der Abszisse. Es handelt sich um negativen reziproken Wert von K_m .

Um die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit ausrechnen zu können, muss man mathematisch den x-Wert gleich Null setzen. Anschließend wird der reziproke Wert ausgerechnet.

Die Berechnung von K_m -Wert ist etwas komplizierter. Zuerst muss y-Wert gleich Null gesetzt werden. Durch einer Umformung wird die Gleichung nach x aufgelöst. Im letzten Schritt wird der negative reziproke Wert bestimmt.

Die Schwierigkeit der Bestimmung der kinetischen Parameter mittels Lineweaver-Burk sind die Werte bei niedrigen Substratkonzentrationen, weil sie stärker in die Rechnung eingehen und dadurch die Steigung der Gerade verfälschen können. Praktisch war es allerdings schwieriger die Werte bei geringeren Konzentrationen genau zu bestimmen.

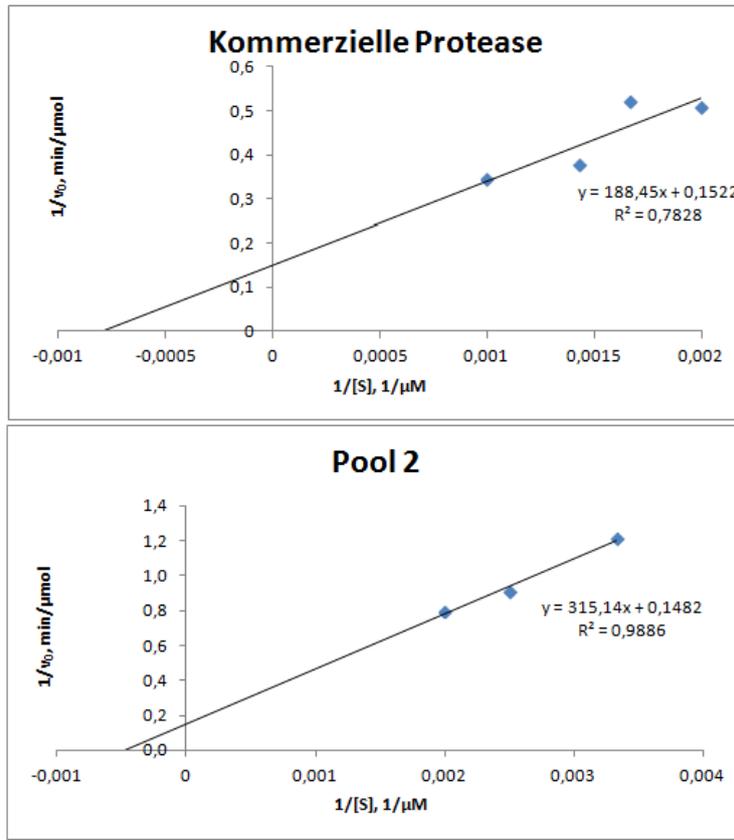


Abbildung 35 – Aus Michaelis-Menten ermittelte Lineweaver-Burk-Diagramme zur Bestimmung der wichtigen kinematischen Parameter. Es werden die kommerziell erhältliche HRV 3C Protease mit der aufgereinigten Protease aus dem zweiten Pool verglichen.

Wenn man die wie oben beschrieben, die Gleichungen berechnet, so kommen folgende Werte raus.

Kommerzielle Protease: $v_{\max} = 6,57 \mu\text{mol}/\text{min}$; $K_m = 1238,17 \text{ mM}$

Pool 1: Aufgrund der nicht deutlichen Ergebnisse von Aktivitätsassay keine Berechnung von kinetischen Parameter möglich.

Pool 2: $v_{\max} = 6,75 \mu\text{mol}/\text{min}$; $K_m = 2119,77 \text{ mM}$

Im Vergleich von kommerziellen Protease mit aufgereinigten Protease wurde festgestellt, dass die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit ähnlichen Wert hat. Die Abweichung beträgt 2,63 %.

Die Abweichung von dem K_m -Wert der aufgereinigten Protease beträgt fast das Doppelte.

5.8.3 MALDI TOF/TOF

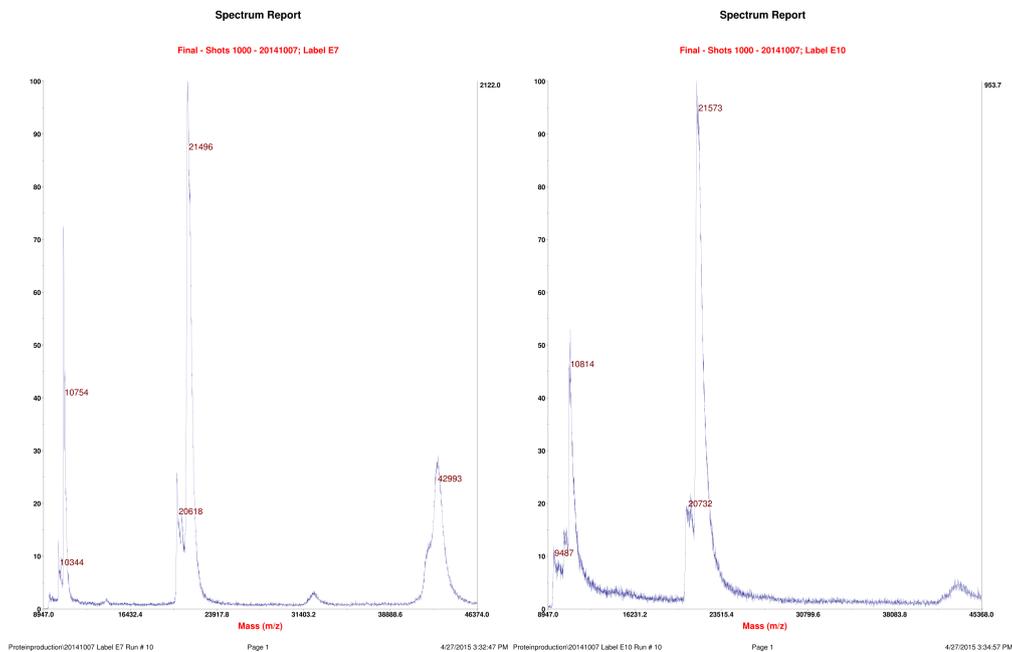


Abbildung 36 – Mittels MALDI TOF/TOF gemessene Molekulargewichte von in der Probe erhaltenen Komponenten.

In den beiden Chromatogramme wurden bei den höchsten Peaks die Molekulargewichte bei 21496 kDa im ersten Pool und bei 21573 kDa im zweiten Pool gemessen. Beide Werte kommen den theoretischen Wert von 21363 kDa am nächsten. Da es bereits mit nachgewiesen wurde, dass die Protease in beiden Proben erhalten ist, muss es sich also um die Protease handeln. Interessant ist auch der Peak daneben. Bei beiden unterscheidet sich das Molekulargewicht um ca. 1 kDa. Es kann entweder um eine Verunreinigung handeln oder um die Protease ohne abgespalteten Tag. Der ersten beiden Peaks in beiden Chromatogrammen sind die doppelt ionisierte Probe, die die Hälfte des Molekulargewichtes der Probe betragen. Interessant wird der letzte Peak mit dem Molekulargewicht von 42993 kDa im ersten Chromatogramm. Das Molekulargewicht wurde dem doppelten von HRV 3C Protease entsprechen. Und doppelt ionisiert wurde der Peak mit dem Peak von dem Zielprotein überlagern. Es kann also höchstwahrscheinlich um den Dimer von der Protease handeln.

5.8.4 DLS

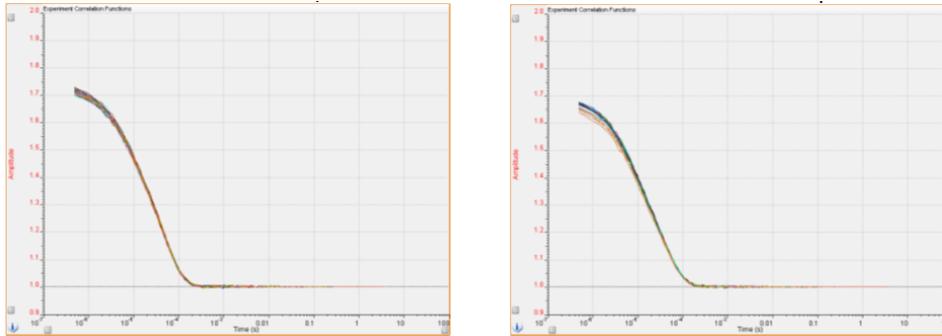


Abbildung 37 – Aus 30 Messungen ermittelte Korrelationsfunktion von HRV 3C Protease in beiden Pools. Daraus errechnete Verteilung der hydrodynamischen Radien: Pool 1 (links): 3,25 nm mit Polydispersität von 27,2 % und Pool 2 (rechts): 2,23 nm mit Polydispersität von 31,5 %

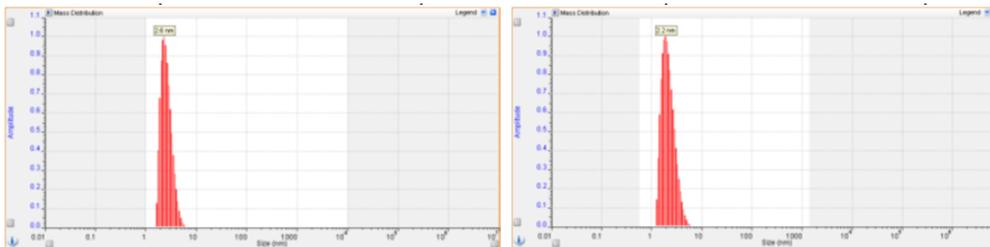


Abbildung 38 – Massenverteilung der beiden Proben: Pool 1 (links) und Pool 2 (rechts).

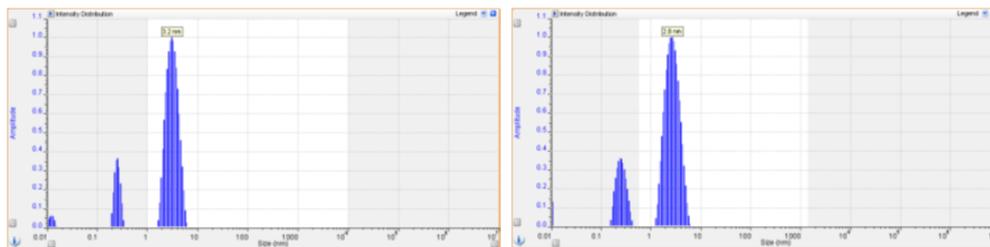


Abbildung 39 – Intensitätsverteilung nach der Messung der Proben aus beiden Pools: Pool 1 (links) und Pool 2 (rechts).

Genau gesehen wird bei der DSL-Messung die Diffusionskoeffizient bestimmt wird. Aus dem der hydrodynamischer Radius berechnet wird. Es handelt sich dabei um eine elektrische Dipolschicht, der durch die Bewegung im flüssigen Medium verursacht wird.

Auf der Abbildung ?? sieht man, dass die Kurve sehr nah bei einander sind. Aus 30 Messungen je 10 Sekunden lang, können folgende Werte für die hydrodynamische Radien beider Proben ermittelt werden:

Pool 1: 3,25 nm mit Polydispersität von 27,2 %

Pool 2: 2,23 nm mit Polydispersität von 31,5 %

In dem Pool 1 haben die Teilchen größeren hydrodynamischen Radius, was der Theorie von Bildung von Dimeren bekräftigt.

6 Diskussion

6.1 Expression von pTriJ-Konstrukte

Am Anfang der Bachelorarbeit wurden zwei Konstrukte mit 6 x His und bzw. ohne GST miteinander verglichen. Beide Konstrukte wurden in pTriJ- Vektor kloniert, der bei der Firma für den internen Gebrauch verwendet wird. Der Vektor soll hohen Ausbeuten an dem Zielprotein in verschiedenen Wirten erlauben. Die Konstrukte werden in BL 21 (DE3) NEB und Star Bakterienstämme transformiert.

In vielen Kulturen ist eine lange Lag-Phase zu beobachten. Außerdem fangen die Kulturen im TB-Medium später zu wachsen als die Kulturen im LB- Medium. Dies ist wahrscheinlich mit der Gewöhnung der Bakterien an neue Lebensbedingungen zurückzuführen. Die Kulturen im LB sollen idealerweise ohne jegliche Verzögerung anfangen zu wachsen, weil die Bedingungen ähnlich sind wie in der Vorkultur. Zweite Beobachtung ist das Wachstum der Bakterien nach der Induktion, dann wachsen sie schneller und überholen schnell die Kulturen in LB-Medium, was nicht sehr verwunderlich ist, denn die Konzentration an Nährkomponenten höher ist.

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse der Testkulturen zeigen, dass His-getagte 3C Protease sehr schlecht von Star-Stämmen getragen wird. Die Bakterien wachsen mit einer sehr langen Lag-Phase, dass die Kultivierung in Großmaßstab nicht in Frage kommen würde.

Das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Bakterien sagt noch nicht über die Expression von dem Zielprotein aus. Mit den Pull Downs (Aufreinigung im Kleinmaßstab) will man rausfinden, wo die besseren Ausbeuten an HRV 3C Protease zu finden sind. Die Expressionsraten von der HRV 3C Protease sind von beiden Konstrukten in beiden Stämmen (BL21 (DE3) NEB und Star) sehr niedrig, während nur His-getagte Konstrukte teilweise expremiert werden, vor allem bei 4 °C über Nacht. Bei 37 °C für 4 Stunden ist die Expression kaum zu beobachten. Der mögliche Grund für diese Erkenntnisse ist der schnelle Abbau der Protease in cytoplasmatischen Raum, was auch von R.T. Libby *et al*[6] beobachtet wurde. Bei niedrigeren Temperaturen kann der Abbau der Protease vermieden werden.

Bei den Konstrukten mit der 6 His Tag und GST-Tag scheint zwar, dass die Expression erfolgreich gewesen. Dennoch wenn man das Molekulargewicht mit dem theoretischen vergleicht, dann wird deutlich, dass das Molekulargewicht doppel so hoch sein soll. Wenn es nur die 3C Protease expremiert würde, dann hätte sich nicht an den Beads gebunden. Bei dem Vergleich von den Induktionsproben ist jeweils nur eine starke Bande zu sehen.

6.2 Aufreinigung von HRV 3C Protease mit GST- und 6 x His-Tag im Großmaßstab

Die Aufreinigung der HRV 3C Protease mit GST- und 6 x His-Tag ist relativ einfach. Der Konstrukt hat wegen Vorhandensein von 6 x His- und GST-Tag mehrere Vorteile, so kann die Protease für Schneiden von beiden Fusionstags verwendet werden und kann nach der Anwendung wieder leicht entfernt werden. Nach der Affinitätschromatografie ist die Probe weitgehend sauber und hat nur wenige Kontaminationen, die sich mittels Größenausschlusschromatografie leicht voneinander trennen lassen. Leider ist das größte Problem dabei HRV 3C Protease in ausreichender Menge zu erhalten. Entweder wird die Protease schnell abgebaut

oder sie wird nur selten expremiert. In allen Proben ist hauptsächlich GST-Tag vorhanden.

6.3 Kultivierung und Aufreinigung von HRV 3C Protease mit pET-28a(+)-Plasmid

Die besseren Proteinausbeuten von der Protease liefern die mit HRV3C_opt_pET28a(+)-HV transformierte BL 21 (DE3) NEB Bakterienstämme. Außer neuem Vektor wurden auch einige andere Veränderungen vorgenommen, wie das Einbringen von His-Tag an C-Terminus. Zusätzlich wurde auch auf die TEV-Schnittstelle verzichtet. Die Neuerungen sollen bei der Transformation den Metabolismus der Zelle möglichst nicht beträchtigen. Die optimalen Proteinausbeuten wurden im TB-Medium erzieht. Dabei wurde die Kultur mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression findet bei 37 °C für 4 Stunden statt. Insgesamt werden 12 L Hauptkultur, die auf zwei Teile je 6 L aufgeteilt werden. Bei der ersten Aufreinigung dient für die Entwicklung der allgemeinen Aufreinigungsstrategie, während der zweite Teil der Kultur für die Optimierung der ersten Aufreinigung dient.

Nach der Kultivierung folgt der Aufschluss mit dem Mikrofluidizer und anschließender Ultrazentrifugation. Der Überstand wird auf die HiTrap™ 5 mL FF crude Säule aufgetragen. Durch den linear steigenden Imidazolgradient wird die HRV 3C Protease eluiert. Im Vergleich zu der Protease mit dem GST-Tag enthält die Probe viele Kontaminationen, sodass ein zusätzlicher chromatografischer Schritt notwendig ist. Es wird Ionenaustauscherchromatografie verwendet. Für die Wahl der Säule wird eine Anionenaustauschersäule gewählt, da die Protease in der Probe negativ geladen ist (Anion). Der theoretische pI-Wert der 3C-Protease liegt bei 6,14 (berechnet mit ExpASY). Und der pH-Wert von Puffer liegt bei 8,0.

Auch nach der Ionenaustauscherchromatografie bleiben einige Kontaminationen in der Probe, die aber leicht mit der Größenausschlusschromatografie entfernt werden können. Für die eine HiLoad 26/600 Superdex™ Säule verwendet wird. Nach Angaben des Herstellers kann die Säule die Proteine im Bereich von 10 kDa bis 600 kDa trennen.

Insgesamt kann aus Reinigung 1,35 mg von HRV 3C Protease pro L Kultur gewonnen werden, was leicht mehrere Aufreinigungen davor übertrifft, doch an die Werte J. Younell (25-30 mg pro L Kultur) kommt nicht annähernd heran.

Dennoch ist die Methode für den Laborgebrauch geeignet.

Über die Optimierung der Methode kann wenig gesagt werden, weil nach einem Fehlerlauf bei der IMAC viel Protease verloren gegangen und der Vergleich nicht mehr plausibel wäre.

7 Zusammenfassung

Ursprünglich war gedacht die Expression mit den pTriJ-Konstrukten, die entweder His oder GST und His-Tag haben, durchzuführen. Da die Expression und Aufreinigung von pTriJ Konstrukten schlecht gewesen ist, und die Kulturen mit transformierten pTriJ-GV Vektor hauptsächlich GST expremierten. Sogar in Large Scale Kultivierung ist die Detektion der Protease zunächst unmöglich. Sie lässt sich aber leicht in relativ reiner Form mittels Affinitätschromatografie gewinnen. Die verbleibenden Verunreinigungen können ohne weitere Probleme mit durch SEC entfernt werden. Die Konzentration der Protease ist viel zu gering. Es wurde beschlossen die Sequenz von dem Zielprotein in ein anderen Vektor, pET28a(+)-Vektor, zu umklonieren. Es wurde auf die TEV-Schnittstelle verzichtet und der His-Tag wurde C-Terminal angebracht.

Dadurch konnten bessere Expressionsergebnisse erreicht werden. Im Testformat wurden verschiedene Wachstumsparameter getestet, um optimale Kultivierungsbedingungen für die Hauptkultur zu finden.

Aus dem Zellpellet wird das Protein aufgereinigt. Zuerst werden die Bakterien Zellwand aufgeschlossen, um die zellinternen Komponenten freizusetzen. Dies geschieht durch Kombination vom enzymatischen Aufschluss mit dem Lysozym und mechanischen Aufschluss mit dem Microfluidizer. Weil das HRV3C Protease hauptsächlich in löslicher Fraktion vorhanden ist, werden die unlöslichen Zellkomponenten durch Ultrazentrifugation entfernt. Der Rohextrakt wird zuerst mit IMAC aufgereinigt. Die Reinheit der Probe wird mit SDS-PAGE festgestellt. Es stellt sich heraus, dass die Probe noch viele Verunreinigungen hat, sodass die IEX notwendig ist. Da bisher mit dem Puffer gearbeitet wurde, die ein pH-Wert von 8 haben und der pI-Wert der Protease bei 6,12 liegt, wird entschieden die Anionenaustauscher zu wählen.

Nach der Anionenaustauschchromatografie liegt die Reinheit der Probe bei ca. 90 %. Die bleibenden Verunreinigungen können aufgrund ihres Molekulargewichtes durch SEC getrennt werden.

Bei der SEC ist das Zielprotein in zwei Peaks zu finden. Es ist höchstwahrscheinlich, dass ein Teil des Proteins als Dimer und ein Teil als Monomer vorliegt.

Nach dem die Protease in reiner Form gewonnen wurde, folgt die Analytik. Die Reinheit der Probe wird mit SDS-PAGE festgestellt. Die Proteinkonzentration mit NanoDrop gemessen. Der hydraulische Radius ist mit DLS bestimmt worden. Vor allem die Daten von MALDI TOF/TOF und DSL weisen auf die Bildung von Aggregaten hin. Auch Aktivität des Proteins wird gemessen und mit der kommerziell erhältlichen Protease von Novagen verglichen.

Einige Verbesserungen werden vorgenommen, doch aufgrund eines Programmfehlers kann daraus kein Protein gewonnen werden.

Literatur

- [1] G.M. Birch, T. Black, S.K. Malcolm, M.T. Lai, R.E. Zimmerman, and S.R. Jaskunas. Purification of Recombinant Human Rhinovirus 14 3C Protease Expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 6(5):609 – 618, 1995.
- [2] G. A. Cox, R. B. Johnson, J.A. Cook, M. Wakulchik, M. G. Johnson, E. C. Villarreal, and Q. M. Wang. Identification and Characterization of Human Rhinovirus-14 3C Protease: Diamidation Isoform. *Biological Chemistry*, 274:13211–13216, 1999.
- [3] G. J. Davis, Q.M. Wang, G. A. Cox, R. B. Johnson, M. Wakulchik, C. A. Dotson, and E. C. Villarreal. Expression and Purification of Recombinant Rhinovirus 14 3CD Proteinase and Its Comparison to the 3C Proteinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 346(1):125 – 130, 1997.
- [4] Y. Feng, Q. Xu, T. Yang, E. Sun, J. Li, D. Shi, and D. Wu. A novel self-cleavage system for production of soluble recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 99:64–69, 2014.
- [5] J. A. Knott, D. C. Orr, D. S. Montgomery, C. A. Sullivan, and A. Weston. The expression and purification of human rhinovirus protease 3C. *European Journal of Biochemistry*, 182(3):547–555, 1989.
- [6] R. T. Libby, D. Cosman, M. K. Cooney, J. E. Merriam, C. J. March, and T. P. Hopp. Human Rhinovirus 3C Protease: Cloning and Expression of an Active Form in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 27:6262–6268, 1988.
- [7] J. M. Risse and K. Friehs. Sekretion und Affinitätschromatografie rekombinanter Proteine. *BIOspektrum*, 16. Jahrgang:550–552, 2014.
- [8] Q.M. Wanga and S.H. Chen. Human rhinovirus 3C protease as a potential target for the development of antiviral agents. *Current Protein and Peptide Science*, 8(1):19–27, 2007.
- [9] J. Youell and K. Firman D. Fordham. Production and single-step purification of EGFP and a biotinylated version of the Human Rhinovirus 14 3C protease. *Protein Expression and Purification*, 79:258–262, 2011.