

Facharbeit
aus dem Fach
Chemie

Thema: Reinigung von Spermidin Synthase mittels Ni-Chelat Chromatographie in Form eines Spermidin-Avitag (Biotin)-His6-Fusionsproteins, gewonnen aus HEK-Zellen.

Verfasser/in: Felix Kuhne
Leistungskurs: 3C1
Kursleiter/in: LAss Herr Gallenberger
Abgabetermin: 25.01.2008

Erzielte Note: in Worten:

Erzielte Punkte: in Worten:

Abgabe beim Kollegstufenbetreuer am

.....
(Unterschrift des Kursleiters/der Kursleiterin)

Gymnasium Penzberg
Naturwissenschaftlich- technologisches und Sprachliches Gymnasium

Leistungskurs Chemie 06/08

**Reinigung von Spermidin Synthase
mittels Ni-Chelat Chromatographie in Form eines
Spermidin-Avitag (Biotin) –His6–Fusionsproteins,
gewonnen aus
HEK-Zellen**

Facharbeit bei Roche Diagnostics GmbH in Penzberg

Abteilung New Reagents

Juli 2007 – Januar 2008

Vorgelegt von

Felix Kuhne

Betreuer:

Sonja Freiburghaus, Roche Diagnostics GmbH, New Reagents, Penzberg

Dr. Herbert Andres, Roche Diagnostics GmbH, New Reagents, Penzberg

Inhaltsverzeichnis

Einführung	5
-------------------------	---

Einleitung

1. Proteine.....	5
2. Krebs.....	7
3. Tumormarker.....	7
4. Spermidin Synthase.....	7
5. Nachweismethode (ELISA).....	9
6. Rekombinante Proteine.....	10

Material

1. Einsatzstoffe/Materialien/Geräte.....	11
2. Lösungen/Pufferlösungen (Gebrauchslösungen).....	12

Methoden

1. His-tag als Reinigungshilfe.....	12
2. HPLC.....	15
3. Photometer.....	16
4. BCA-Assay.....	16
5. SDS-PAGE.....	17

Durchführung & Ergebnisse

1. Vorgehensweise.....	18
2. Durchführung und Ergebnisse.....	19
2.1 Zellaufschluss.....	19
2.2 Ni-Chelat Chromatographie.....	20
2.3 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay.....	24
2.4 Reinheitsüberprüfung mittels SDS-PAGE.....	24

Diskussion

- 1. Expressionssysteme.....26
- 2. Alternative Reinigungsverfahren.....27
- 3. Analytikmethoden.....28

Abkürzungsverzeichnis.....30

Quellenverzeichnis.....32

Danksagung.....34

Erklärung.....35

Anlagen.....36

Einführung

Im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten von Krebspatienten lassen sich Substanzen nachweisen, die als *Tumormarker* bezeichnet werden. *Tumormarker* sind Eiweißstoffe oder andere biologische Substanzen, deren erhöhte Konzentrationen auf einen Tumor oder das Rezidiv eines solchen hindeuten können. *Tumormarker* werden derzeit nicht zum "Krebs-Screening", sondern nur zur Verlaufskontrolle herangezogen. Ein potenzieller *Tumormarker* ist das Enzym *Spermidin Synthase*. Die folgende Arbeit behandelt die Isolierung des *rekombinanten Enzyms* aus **Human Embryonic Kidney (HEK)-Zellen**. Der praktische Teil der vorliegenden Facharbeit wurde in der diagnostischen Forschung der Firma Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, durchgeführt. Gegenstand des praktischen Teils war die Reinigung des aus *HEK-Zellen* gewonnenem Enzym *Spermidin Synthase*.

Einleitung

1. Proteine

Proteine stellen mit ihrer Vielfalt an Erscheinungsformen und den von ihnen abhängigen Funktionen im Körper ein eigenes Spezialgebiet dar, welches heute noch ungeklärte Fragen aufwirft.

Proteine, überwiegend aus Aminosäuren aufgebaute Biopolymere, sind ein entscheidender Bestandteil der lebenden Materie. Im menschlichen Organismus finden sich mehr als 100.000 unterschiedliche Proteine. Sie bestimmen die Struktur und Funktion jeder Zelle. Enzyme zum Beispiel katalysieren unterschiedliche Reaktionen im Stoffwechsel und lassen sich entsprechend ihres jeweiligen Wirkmechanismus` in Klassen unterteilen. Zum Beispiel katalysieren bestimmte Enzyme intermolekulare Gruppenübertragungen und gehören damit, wie auch das Enzym *Spermidin Synthase*, zur Klasse der Transferasen.

Auf Unterschieden in Löslichkeit und Molekülstruktur beruht die Einteilung in globuläre und fibrilläre Proteine. Erstere (u.a. alle Enzyme) sind insbesondere auf Grund der an den Moleküloberflächen lokalisierten, geladenen, hydrophilen Aminosäureresten in

Wasser und verdünnten Salzlösungen löslich. Letztere (z.B. Kollagene im Bindegewebe oder Keratine) sind durch parallel zueinander angeordneten Polypeptidketten charakterisiert und in Wasser und verdünnten Salzlösungen unlöslich.

Am Aufbau der Proteine sind 20 unterschiedliche (proteinogene) Aminosäuren (AA) beteiligt und durch Peptidbindungen miteinander verknüpft. Der Aufbau der Proteine ist charakterisiert durch die Primärstruktur (Anzahl und Sequenz der AA), Sekundärstruktur (H-Brücken; α -Helix bzw. β -Faltblatt), Tertiärstruktur (räumliche Anordnung der als α -Helix und/oder β -Faltblatt Struktur vorliegenden Abschnitte der Polypeptidkette) und ggf. Quartärstruktur (bei Ausbildung intermolekularer Wechselwirkungen zwischen zwei oder mehreren identischen oder verschiedenen Polypeptidketten, die zu stabilen oligomeren Proteinen assoziieren).

Werden Proteine auf Temperaturen über 60 °C erhitzt, entstehen irreversible, tiefgreifende strukturelle Veränderungen (random coil), die in der Regel gleichzeitig zum Verlust der biologischen Aktivität führen. Diese Denaturierung beruht auf der Zerstörung der Tertiär- bzw. ggf. Quartärstruktur. Auch eine Behandlung von Proteinen mit Säuren, Laugen oder chaotropen Reagenzien (z.B. Harnstoff, Guanidiniumchlorid) kann zum Verlust der nativen Struktur führen.

Durch die Vielfalt an Erscheinungsformen variiert auch die Masse der Proteine. Molekülmassen von ca. 10 kDa bis zu mehreren Millionen kDa sind möglich.

Die molekularen Eigenschaften der Proteine, wie Masse, Ladung und Löslichkeit macht man sich bei der Isolierung und Reindarstellung von Proteinen zunutze. Zu den wichtigsten Reinigungsmethoden gehören Affinitäts-, Ionenaustausch- und Gelchromatographie. Die Reinheit des Proteins kann mittels verschiedener analytischer Methoden, wie z.B. HPLC (u.a. als IEC und SEC einsetzbar) und SDS-PAGE überprüft werden.

Proteine spielen in der molekularen Diagnostik sowie in der therapeutischen Anwendung eine wichtige Rolle. Die Biotechnologie hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einem bedeutenden Wissenschafts- und Wirtschaftszweig entwickelt. In der Biotechnologie werden lebende Organismen verfahrenstechnisch eingesetzt. Gentechnik (rekombinante DNA-Technik) und Prozesstechnik (Proteinproduktion durch Fermentation und Aufreinigung des Zielproteins) stellen wichtige Gebiete der Biotechnologie dar. Proteine spielen eine überaus bedeutende Rolle in unserem Körper und dienen in der Diagnostik teilweise als Indikatoren zur Erkennung, sowie in der Therapie als Wirkstoff zur Bekämpfung bestimmter Krankheitsbilder.

(Fallert-Müller, 1999/2000, Teil 2 – S.252 ff.)

2. Krebs

Krebs entsteht durch manifestierte Genmutationen in Körperzellen. Unter Umständen fällt die zelleigene Fähigkeit zur DNA-Reparatur aus, d.h. Fehler in der DNA-Sequenz werden nicht mehr korrigiert, sondern unverändert weiter an die Tochterzellen vererbt. Falls durch die Mutation(en) die Fähigkeit zur Apoptose (programmierter Zelltod) verloren geht, ist das entstehende Körpergewebe zu unbegrenztem Wachstum fähig. Krebs zeichnet sich zusätzlich dadurch aus, dass Krebszellen in benachbartes gesundes Gewebe eindringen und dort Metastasen (Tochtergeschwülste) bilden. Da sich das Immunabwehrsystem häufig gegenüber Krebszellen tolerant verhält, kann jede Art von Gewebe befallen werden. Falls im Verlauf der Krankheit lebenswichtige Organe befallen werden, führt die Krankheit nicht selten zum Tod. (Alberts, 1983, S. 215 f./S. 940)

3. Tumormarker

Ein großer Fortschritt wäre die Möglichkeit zur Frühdiagnose von Krebs durch Bestimmung von tumorspezifischen Substanzen im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten von Patienten. Je früher ein Tumor erkannt wird, desto besser fallen die Heilungschancen aus. *Tumormarker* sind Eiweißstoffe oder andere biologische Substanzen, deren erhöhte Konzentrationen auf einen Tumor oder das Rezidiv eines solchen hindeuten können. Einen humoralen, d.h. in Serum gelösten *Tumormarker* zur Krebserkennung könnte das Enzym *Spermidin Synthase* darstellen. (Pschyrembel, 1994, S. 1541/S. 1580)

4. Spermidin Synthase

Spermidin Synthase ist ein Enzym, welches als Transferase im Polyaminstoffwechsel die Reaktion von Putrescin zu Spermidin unter Addition einer Aminopropylgruppe an Putrescin katalysiert. Die Aminopropylgruppe stammt hierbei von decarboxyliertem S-Adenosyl-L-methionin und wird vom Enzym an das biogene Diamin Putrescin addiert. Das entstehende Spermidin ist durch die Amino-Gruppen positiv geladen und dient vermutlich, wie die anderen Polyamine auch, zur Verpackung von DNA. Die Verpackung der DNA dient u.a. dem Schutz vor denaturierenden Faktoren, wie zum Beispiel hohen Temperaturen, Wassermangel und sonstigen osmotischen Belast-

ungen. Spermidin wurde in hohen Konzentrationen erstmals in Spermazellen gefunden, worauf sich auch der Name begründet. In Spermazellen ist die DNA dicht in den Köpfen der Spermazellen verpackt. Bei einer erhöhten Zellteilung, wie sie auch bei einem Tumor stattfindet, wird ebenfalls eine erhöhte Konzentration an Spermidin benötigt. *Spermidin Synthase* ist folglich bei erhöhter Zellteilungsrate ebenfalls vermehrt im Blut nachweisbar und eignet sich daher eventuell als Indikator von unkontrolliertem Zellwachstum. Der wissenschaftliche Name der *Spermidin Synthase* lautet S-Adenosyl-L-methioninamin:Putrescin 3-aminopropyltransferase. Das als *Spee* benannte Enzym hat eine Molekülmasse von ca. 35 kDa und gehört zu den einkettigen Proteinen (Enzymen). (Lehninger, 1994, S.819 ff.) (Fallert-Müller, 1999/2000, Teil 2 – S.225 f.)

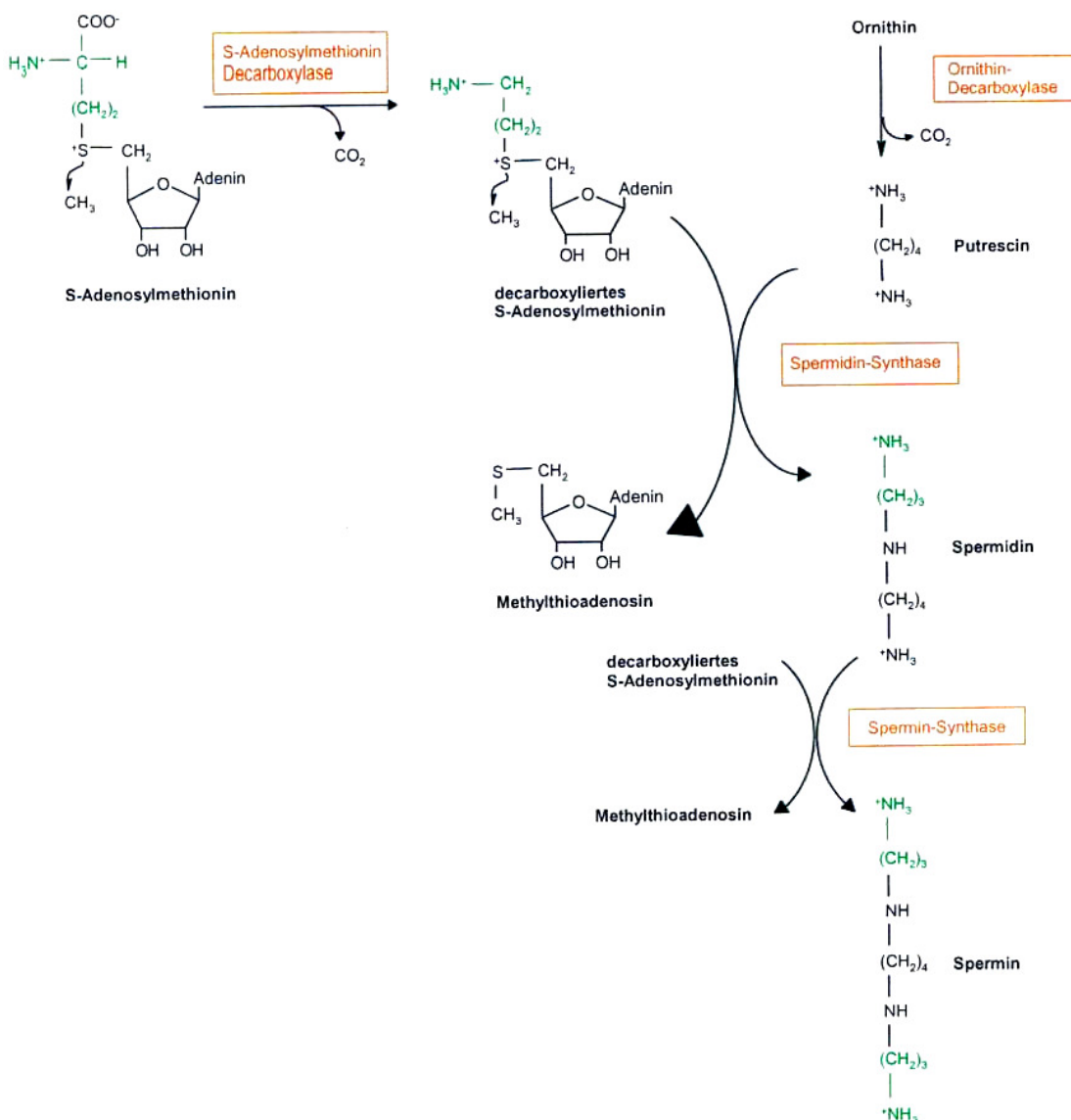


Abb. 1 – Biosynthese der Polyamine Spermidin und Spermin aus Putrescin und decarboxylierten S-Adenosylmethionin („Methamin“). (Hinselmann, 2005, S.20)

5. Nachweismethode (ELISA)

Um *Spermidin Synthase* als *Tumormarker* diagnostisch verwenden zu können, muss zunächst ein Antikörper gegen das Enzym entwickelt werden. In einem Immunoassay kann der Antikörper das Enzym aus dem Blut/Serum abfangen und binden. Zur Entwicklung eines solchen Antikörpers muss zu Beginn das Enzym selbst isoliert und gereinigt werden. Anschließend werden mit dem gereinigten Enzym z.B. Kaninchen oder Schafe immunisiert und der gegen das Enzym gerichtete Antikörper aus dem Serum der Kaninchen bzw. Schafe isoliert. Mittels des isolierten Fang-Antikörpers lässt sich schließlich ein so genannter **Enzym-Linked Immunosorbant Assay (ELISA)** als immunologische Nachweismethode etablieren. (Rehm, 2002) Ein **allgemeines Schema** zeigt Abb. 2.

„Im ersten Schritt wird die Festphase mit dem so genannten Fangantikörper beschichtet. Im zweiten Schritt wird die Probe mit dem Analyten zugegeben. Dabei kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Analyt und Antikörper. Danach wird der Detektionsantikörper zugegeben, der im vierten Schritt mit einem Sekundärantikörper (Konjugat) markiert wird. Das Enzym (hier: horse-radish-peroxidase = POD) setzt eine dem Analyten proportionale Menge eines chromogenen Substrates (**Tetramethylbenzidin**) um. Der gebildete Farbstoff lässt sich photometrisch quantifizieren.“, vgl. Hinselmann, 2005, S.14)

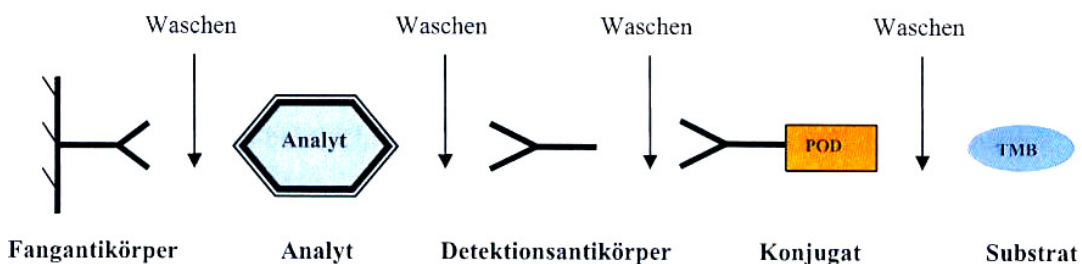


Abb. 2 – Schema des oben beschriebenen Sandwich-ELISA. (Hinselmann, 2005, S.14)

6. Rekombinante Proteine

Um *Spermidin Synthase* für diagnostische Zwecke herstellen zu können, bedient man sich der rekombinanten Expression des Enzyms in eukaryontischen Zellen und isoliert das Enzym aus dem Zellüberstand. Ein Vektor mit Informationen des gewünschten Proteins wird in die Wirtszelle transfiziert, welche das Enzym anschließend exprimiert. Der Vektor, dessen Rolle meist ein Plasmidring übernimmt, enthält neben dem für das bestimmte Protein verantwortlichen Gen einen Promotor, welcher als Startpunkt für die Transkription des Gens fungiert. Ein *tag* für die Affinitätschromatographie zur Isolierung des gewünschten Proteins wird angehängt. Die Translation findet statt. Erfolgreich exprimierende Zellen werden durch ein auf dem Vektor befindliches Antibiotikum-Resistenzgen selektiert. Es wird zwischen homologer Expression (Protein und Expressionswirt sind von gleicher Spezies) und heterologer Expression (Protein und Wirt sind unterschiedlicher Spezies) unterschieden. (Stiegler, 1999)

Alternativ kann ein zellfreies Expressionssystem verwendet werden. Zell-Lysate (z.B. E-coli oder Weizenkeim-Extrakt) können mRNA Moleküle *in vitro* translatieren.

Um eine humanidentische Proteinherstellung zu erhalten, wird bei der Expression der als *Tumormarker* verwendeten *Spermidin Synthase* eine Humanzelle als Expressionssystem verwendet. Die posttranslationalen Modifikationen, wie zum Beispiel die Glykosylierung des gewünschten Proteins, stimmen hierbei mit der einer humanen Proteinbiosynthese überein. Embryonale Nierenzellen, so genannte **Human Embryonic Kidney**-Zellen werden hierzu häufig verwendet. Die *HEK-293 Zelllinie* ist eine vergleichsweise unkompliziert wachsende humane Zelllinie, die mit bestimmten Chemikalien transformierbar ist.

Material

1. Einsatzstoffe/Materialien/Geräte

Einsatzstoffe	Hersteller	Bestellnummer	Molekulargewicht bzw. Dichte
HEPES	Roche	10 242 608	MG 238,3
CHAPS	Roche	10 810 126	MG 614,9
Glycerol	Merck	1.04093	MG 92,10;D 1,26 g/mL
Thioglycerol	Fluka	88641	MG 108,16;D 1,247 g/mL
Complete,EDTA-free	Roche	11 873 580 001	---
Benzonase	Merck	1.01653	
2MgCl ₂ x 6H ₂ O	Merck	1.05833	MG 203,3
Imidazol	Fluka	56749	MG 68,08
NaCl	Merck	1.06404.1000	MG 58,44
NaOH	Merck	1.06495.1000	MG 40,00
Methanol	J.T. Baker	8045	MG 32,04
Essigsäure	Fluka	32810	MG 60,05
Stainer A Colloidal Blue	Novex	1316309	---
Stainer B Colloidal Blue	Novex	1316404	---
SDS Sample Buffer (4x) NuPAGE	Invitrogen	NP0007	---
MES SDS Running Buffer (20x) NuPAGE	Invitrogen	NP0002	---
„HEK 293/ST BirA“; Spee-Avi-His/Roller; Pellet aus 500 ml à 4,2 x 10 ⁵ , 28 %	Roche	TT 0702080; (14.Feb.2007, S. Voit, LR-DE2)	---

Material	Hersteller	Bestellnummer
His-Trap HP 1 mL	GE Healthcare	17-5247-01
Spritzenfilter Acrodisc 0,8/0,2 µm /25mm	Pall	4187
Spritzenfilter Acrodisc 0,2 µm /13 mm	Pall	4454
40 mL- Potter	VWR	432-1273
VacuCap 60 Filtereinheit, 0,2 µm	Pall	4632
VacuCap 90 Filtereinheit, 0,2 µm	Pall	4622
VacuCap 60 Filtereinheit, 0,45 µm	Pall	4634
VacuCap 90 Filtereinheit, 0,45 µm	Pall	4624
Gradientengel NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen	NP0321BOX

Geräte	Hersteller	Bestellnummer
pH-Meter, Calimatic	Knick	
Centrifuge 4K15	Sigma	45-81-01ZK-04
HPLC L-6200	Merck Hitachi	6315-037
SDS Elektrophorese Powerease 500	Invitrogen	
Photometer Uvikon 930	Kontron	45-84-PHC 1
Centrifuge 5415 D	Eppendorf	
Thermomixer comfort	Eppendorf	
Milli-Q-Aufbereitungssystem	Millipore	

2. Lösungen/Pufferlösungen (Gebrauchslösungen)

a) **Lysepuffer LP1** (50 mL):

50 mM Hepes/NaOH, pH 7,5/500 mM NaCl/5% Glycerol/1% CHAPS

b) **Auftragspuffer Ni-Chelat** (1000 mL):

50 mM Hepes/NaOH, pH 7,5/500 mM NaCl/5% Glycerol/0,1% CHAPS/10 mM
Thioglycerol

c) **Wasch-/ Elutionspuffer Ni-Chelat** (1000 mL):

50 mM Hepes/NaOH, pH 7,5/500 mM NaCl/5% Glycerol/0,1% CHAPS/10 mM
Thioglycerol/500 mM Imidazol

d) **Lysepuffer LP2** (25 mL): wird kurz vor Gebrauch frisch hergestellt.

25 mL LP1/21,7 µL Thioglycerol ad 10 mM/1 Tablette Complete, EDTA free

(Herstellung siehe Anlage **Protokoll** – „3.2 Pufferlösungen (Gebrauchslösungen)“)

Methoden

1. His-tag als Reinigungshilfe

Um Proteine zu isolieren, macht man sich deren molekulare Eigenschaften, wie z.B. Masse, Ladung und Hydrophobizität zunutze. Da sich das Zielprotein von den in der Ausgangslösung ebenfalls vorkommenden Proteinverunreinigungen in der Regel nicht in allen Kriterien (vollständig) unterscheidet, werden mehrere klassische Verfahrensschritte, wie z.B. Ionenaustauscher, HIC- und/oder Gelfiltration sinnvoll hintereinander durchgeführt, um zu reinem Zielprotein zu gelangen. Dabei ist jeder Säulenschritt zu optimieren, d.h. es sind die optimalen Bedingungen (Puffersalze, pH-Werte, Salzkonzentrationen, Flussraten und Versuchstemperaturen) zu entwickeln. Steht eine Affinitätssäule für das gewünschte Zielprotein zur Verfügung, kann die Aufreinigung

sehr viel schneller und effizienter als mit den oben genannten Methoden durchgeführt werden.

Die Reinheit von monoklonalen Antikörpern lässt sich zum Beispiel mit Hilfe von ProteinA in nur einem einzigen Chromatographieschritt von ca. 15 % Reinheit in der Ausgangslösung auf über 98 % Reinheit im ProteinA-Eluat steigern. Für viele Proteine stehen allerdings ohne weiteres keine Affinitätsäulen zur Verfügung. Eine andere effiziente Methode zur spezifischen Proteinisolierung ist die so genannte *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC) (Abb.3). (Lehninger, 1994, S.158 ff.) (QIAexpressionist, 2001, S.18 f.)

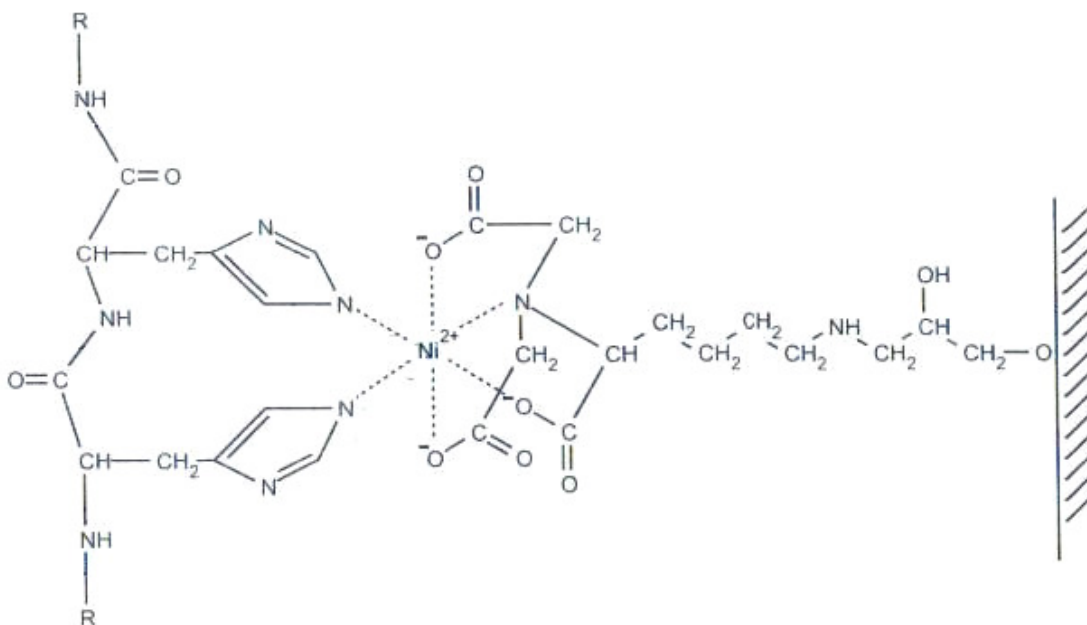


Abb. 3 – Struktur eines durch einen Linker an die Festphase gebundenen *Ni-Chelat-Liganden*, der mit dem Imidazolring des Histidins interagiert. (QIAexpressionist, 2001, S.18 f.)

Ni²⁺-NTA (*Nitrilotriacetic acid*) ist ein häufig verwendeter IMAC-Ligand und wurde im Rahmen der vorliegenden Facharbeit zur Reinigung der *Spee* eingesetzt. NTA kann zweiwertige Metallionen (wie z.B. Ni²⁺) koordinativ binden und damit stabile Komplexe bilden. Die restlichen zwei freien Plätze am Ni²⁺-Ion dienen zur Adsorption von zwei Histidinresten des Zielproteins, um dieses spezifisch zu binden. Die Elution erfolgt in diesem Fall meistens mit Imidazol-haltigen Pufferlösungen. Damit wird eine kompetitive

Verdrängung des über den Histidin-Imidazolring am NTA-Liganden gebundenen Zielproteins erreicht. Um die Affinität des gewünschten Proteins zu verstärken, wurde in die Sequenz der *Spee* auf DNA-Ebene ein so genannter *His6-tag* (im Polypeptid bestehend aus sechs aufeinander folgenden Histidinen) integriert. Damit besitzt das Enzym eine höhere Affinität zum Ni^{2+} -NTA-Liganden, als die in der Ausgangslösung ebenfalls vorkommenden Proteinverunreinigungen und lässt sich damit sehr einfach und effizient von den anderen Proteinen in nur einem einzigen Aufreinigungsschritt isolieren.

Der *His-tag* gilt als einfach konstruiert (Sequenz aus i.d.R. 6-12 Histidinen) und nur wenig immunogen. Es gibt noch eine Vielzahl von anderen *tags*. Ein weiterer, hier ebenfalls in das Enzym *Spermidin Synthase* eingebauter *tag*, lautet *Avitag*. Auf DNA-Ebene wurde hier eine Aminosäuresequenz, welche die Aminosäure Lysin enthält, in das Enzym eingebaut. Das Enzym BirA kann schließlich unter ATP-Verbrauch das eingebaute Lysin der *Avitag*-Aminosäuresequenz biotinylieren und so den *tag* in seine funktionstüchtige (Streptavidin -bindungsfähige) Form überführen. (Schlößmann, 2003)

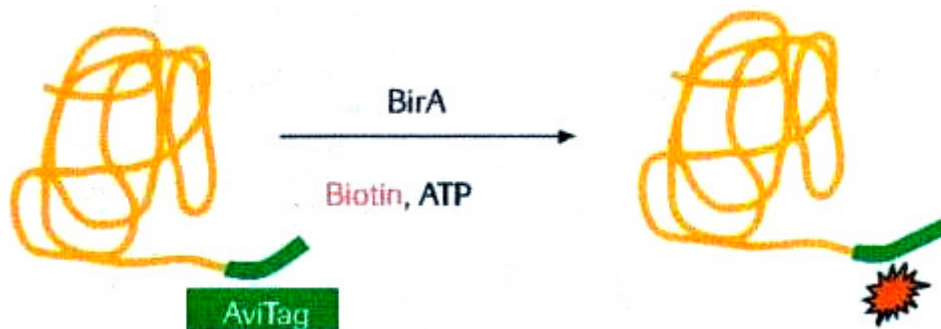


Abb. 4 – Biotinylierung des Targetproteins am *Avitag*. Die Reaktion wird von dem bakteriellen Enzym BirA unter ATP-Verbrauch katalysiert. (Schlößmann, 2003)

Die AA-Sequenz des Enzyms *Spermidin Synthase* und die hier eingebauten *tags* sind nachfolgend gezeigt:

MEPGPDGPAASGPAAIREGWFRETCSLWPGQALSLQVEQLLHRRRSRYQDILVFRSKTY
 GNVLVLDGVIQCTERDEFSYQEMIANLPLCSPNPRKVLIIIGGGDGGVLREVVKHPSVESV
 VQCEIDEDVIQVSKKFLPGMAIGYSSSKLTLHVGDFEFMKQNQDAFDVIITDSSDPMGPA
 ESLFKESYYQLMKTALKEDGVLCCQGECQWLHLDLIKEMRQFCQSLFPVVAYAYCTIPTY
 PSGQIGFMLCSKNPSTNFQEPVQPLTQQQVAQMQLKYYNSDVHRAAFVLPEFARKALND
 VSAAAGLNDIFEAQKIEWHEHHHHHH

Aminosäuresequenz	Funktion
<i>Spee (Spermidin Synthase)</i>	Zielprotein
Alanin	Linker, „spacer“
<i>Avitag</i>	Agiert über Lysin mit Biotin
Histidin (<i>His6-tag</i>)	Agiert mit Metallchelate (<i>Ni-Chelat</i>)

Abb. 5 – Die Sequenz wird durch einen „spacer“ aus AAA mit dem *Avitag*, einer Sequenz von 15 Aminosäuren, verbunden. Der *Avitag* wird durch einen *tag* von sechs aufeinander folgenden Histidinen ergänzt. Der *Hexa-His-tag* macht es möglich, das gegebene Protein an eine *Nickel-Chelat* Säule zu binden.

Unter Verwendung der bei Roche vorhandenen MAK<Biotin>-Affinitätssäule lässt sich das Enzym *Spermidin Synthase* weiter spezifisch reinigen (ist im Rahmen der Facharbeit nicht erfolgt). Außerdem lässt sich das durch den *Avitag* markierte Enzym an mit Streptavidin beschichteten ELISA-Platten spezifisch binden (Biotin-Avidin-Bindung) und die Enzymkonzentration in der Lösung auf diese Weise quantifizieren (Testmethode wurde im Rahmen der Facharbeit nicht angewandt).

2. HPLC

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography) ist eine unter hohem Druck durchgeführte Säulenchromatographie. Als Trägermaterialien (stationäre Phase) werden poröse Materialien (Kieselgel, Aluminiumoxid) verwendet. Die Partikel haben einen Durchmesser von 5 bis 50 µm und bilden daher einen erheblich größeren Strömungswiderstand als bei herkömmlichen Säulenchromatographieverfahren. Die mobile Phase wird wegen des erhöhten Strömungswiderstandes unter hohem Druck (bei Proteinreinigungen/Analytik 5-50 bar) und hoher Flussrate durch die Säule gepresst. Die HPLC ist charakterisiert durch eine hohe

Anzahl an theoretischen Böden und einer damit verbundenen exzellenten Trennleistung. Die Methode kann als Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Permeations-, oder Affinitätschromatographie betrieben werden. Sie findet breite Anwendung in allen Bereichen der Chemie, Biochemie und Pharmazie. (Eisner, 2000, S.24 f.)

3. Photometer

Mit Hilfe des Photometers können sehr niedrige Konzentrationen einer Substanz quantifiziert werden. Bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren die meisten Proteine aufgrund der in der Peptidsequenz enthaltenen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin. Messprinzip des Photometers: Photonen des monochromatischen Lichts (Licht einer bestimmten Wellenlänge) werden mit zunehmender Proteinkonzentration in der Lösung stärker absorbiert. Es werden zwei Messungen durchgeführt. Die erste Messung ist eine Referenzmessung mit Wasser oder Puffer. Mit dieser häufig als Leerwert bezeichneten Probe wird das Photometer auf den Messwert „Null“ kalibriert. Die Messung der Protein enthaltenden Probe wird anschließend unter gleichen Bedingungen (Lichtquelle, Probenbehälter, Lösungsmittel, Strahlungsempfänger) durchgeführt. Die Berechnung erfolgt nach dem Lambert-Beer-Gesetz ($E = \lg I_0/I = \epsilon \times c \times d$; hier: $\lg I_0/I$ bedeutet dekadischer Logarithmus des Quotienten aus Intensität eingehender zu ausgehender Strahlung und ϵ = proteinspezifischer Extinktionskoeffizient). Mit Hilfe des Photometers lassen sich auch so genannte Scans von Proteinlösungen durchführen. Hierbei wird die zu messende Probe in einem bestimmten Wellenlängenbereich, z.B. 200-400 nm auf ihre Absorption hin untersucht (gescannt). Im UV-Bereich von 200 nm absorbieren hier insbesondere die Peptidbindungen im Protein, bei 280 nm erhält man ein Absorptionsmaximum, dass auf die aromatischen Aminosäuren Trp, Tyr und Phe zurückzuführen ist (s.o.). (Ergebnis der Spektralanalysen *Ni-Chelat* Eluat, siehe Anlage 1, Seite 4). (Eisner, 2000, S.27 ff.)

4. BCA-Assay

Der BCA-Assay (*Bicinchoninsäure-Assay*) ist nach Fallert-Müller, 1999/2000, Teil 1 – S.118, eine Methode zur quantitativen Proteinbestimmung. Das Verfahren beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ (durch z.B. Protein), wobei das Cu^+ -Ion anschließend

einen Farbkomplex mit BCA ausbildet. Dadurch ist ein kolorimetrischer Nachweis von Proteinen bei 562 nm möglich. (Durchführung siehe Anlage **Protokoll** – „4.3 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay“.)

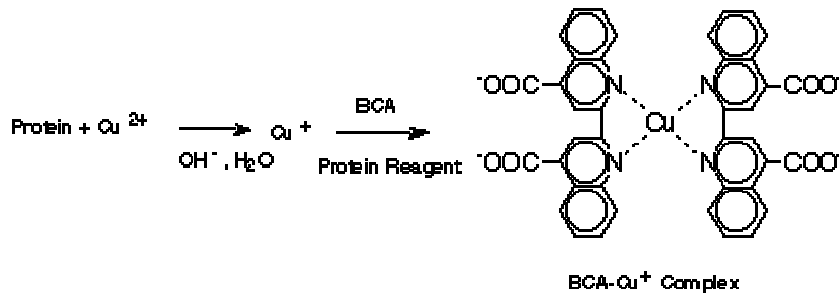


Abb.6 – Quantitativer Nachweis von Protein durch Bildung des Cu⁺-Bicinchoninsäure-Komplexes.
(<http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Biochemie/Proteinbest/Zusatzinfo.html>)

5. SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eignet sich zur Bestimmung der Reinheit von Proteinproben. Die Methode kann auch dazu verwendet werden, die Molmasse eines Proteins im Vergleich zu bei der Elektrophorese mitgeführten Markerproteinen (Standard) zu bestimmen.

Proteinproben werden vor dem Elektrophoreselauf vorbereitet. Hierzu werden diese in Probenpuffer, der u.a. Natriumdodecylsulfat (engl. **Sodium Dodecyl Sulfate**) enthält, für ca. 10 min bei 95°C erhitzt. Sekundär- (α -Helix, β -Faltblatt) und Tertiärstruktur werden durch Anlagerung der SDS-Moleküle an das Peptidrückgrat aufgelöst. Das Protein liegt somit nach dieser Behandlung nur noch als Peptidfaden in der Lösung vor, dessen intrinsische Ladungen (Lys, Asp, Glu) durch die angelagerten, negativ geladenen SDS-Moleküle vollkommen überlagert werden. Oligomere zerfallen durch SDS-Behandlung in Monomere, falls sie nicht durch Disulfidbrücken untereinander vernetzt sind. Diese Bindung kann durch Zugabe von reduzierenden Agentien, wie Mercaptoethanol, aufgebrochen werden.

Das SDS-Polyacrylamidgel enthält Poren, durch die sich kleinere Proteine schneller hindurch bewegen können, als größere. Die Probe wird mittels Pipette auf das SDS-Gel aufgetragen und anschließend elektrische Spannung angelegt (Anode unten, Kathode oben). Die negativ geladenen Proteine wandern als Anionen in Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei eine Funktion der Molekülmasse.

Die intrinsischen Ladungen des Proteins, sowie die Struktur des Proteins, sind nach der SDS-Behandlung hinsichtlich Wanderungsgeschwindigkeit im Gel vernachlässigbar. Nach Beendigung des Elektrophoreselaufs kann das Gel mit Hilfe von Coomassie-Reagenz angefärbt, dann mittels verdünnter Essigsäure fixiert und wieder entfärbt werden. Die im Gel unterschiedlich gewanderten Proteine werden durch dieses Verfahren als blaue Banden vor transparentem Hintergrund deutlich sichtbar. Eine Quantifizierung der Banden mittels Scan ist möglich. Damit lässt sich auch der Anteil an Proteinverunreinigungen in der Ausgangsprobe ermitteln. Bei so genannten Gradientengelen werden die Poren des Polyacrylamidgels in Richtung Anode zunehmend enger. Damit ist eine bessere Trennung von Proteinen mit sehr ähnlichen Molmassen möglich. (Fallert-Müller, 1999/2000, Teil 2 – S.331) (Lehninger, 1994, S.155 ff.)

Durchführung & Ergebnisse

1. Vorgehensweise

Die *rekombinanten HEK-Zellen* werden unter reduzierenden Bedingungen in Anwesenheit eines Proteaseinhibitor-Cocktails und Benzonase zwecks DNA-Verdau lysiert. Der nachfolgende Chromatographieschritt (Ni-NTA) erfolgt ebenfalls unter reduzierenden Bedingungen. Die Reinigung lässt sich wie folgt kurz zusammenfassen: Der Zellysat-Überstand wird auf eine *Ni-Chelat*-Säule aufgetragen. Schwach gebundene Proteine (Verunreinigungen) werden in einem Waschschrift mit 20 mM Imidazol entfernt. Das Targetprotein-*Avi-Bi-H6* wird schließlich in einem Schritt mit 200 mM Imidazol eluiert. In Abhängigkeit von der Konzentration des Targetproteins und dem Anteil an Proteinverunreinigungen im Load erzielt man im Pool eine Reinheit des Targetproteins von 20-80 %. Je höher die Expressionsleistung der Wirtszelle, desto höher ist die Reinheit bereits im Zell-Lysat und entsprechend besser das Ergebnis im Pool nach Reinigung über Ni-NTA. (Der Reinigungserfolg kann mittels SDS-Gel-Scan oder ELISA bestimmt werden. Dieses wurde im Rahmen der Facharbeit nicht durchgeführt.) (Allgemeines Prozessschema siehe Anlage Protokoll, Abb.1, S.10)

2. Durchführung und Ergebnisse

2.1 Zellaufschluss:

Für den Zellaufschluss wurde bei -80°C zwischengelagertes Zellpellet (Zellkultur TT 0702080 „HEK 293/ST BirA“; Spee-Avi-His/Roller; Pellet aus 500 mL, $4,2 \times 10^5$ Zellen/mL; 14.Feb.2007 - S. Voit, LR-DE2) verwendet. Die Zellen wurden unter Zugabe von Lysepuffer und Benzonase aufgetaut und bei Raumtemperatur lysiert. Die Lyse bei Raumtemperatur soll der hinzugegebenen Benzonase Gelegenheit zum DNA-Verdau geben. Ein DNA-Verdau ist erforderlich, um die Viskosität des Zellaufschlusses zu reduzieren. Die langkettigen DNA-Moleküle im Aufschluss werden dabei durch die Benzonase-Behandlung in kurzkettige Oligonukleotide zerlegt. Um die Benzonase zu aktivieren wurde MgCl_2 zur Zellkultur gegeben. Die Zellmembranen wurden durch Verwendung eines Potter-Homogenisators aufgebrochen. Dabei wird insbesondere die äußere Zellmembran zerstört, womit das Zellinnere einschließlich des Enzyms *Spermidin Synthase* in Lösung überführt wird. Zur Abtrennung der ungelösten Bestandteile wurde die Lösung hochtourig zentrifugiert. Der erhaltene Zellniederschlag (Sediment) wurde verworfen. Der das Enzym *Spermidin Synthase* enthaltende Überstand (leicht trüb) wurde anschließend filtriert und danach eine Probe für die Analytik entnommen. Die Messung mittels Photometer ergab im filtrierten Lysat (**21 mL Spee-Avi-Bi-H6-Aufschluss**) eine Gesamtkonzentration an Protein von **191,98 E**. Es wurde im Einzelnen wie folgt vorgegangen:

- Gesamte Zellkultur von $2,1 \times 10^8$ Zellen wurde unter Zugabe von 21 mL LP2 aufgetaut.
- Zugabe von 1 mM MgCl_2 (= 21 μL 1 M MgCl_2 in 21 mL Aufschluss).
- Zugabe von 10 U/mL Benzonase (= 0,84 μL Benzonase (250 U/ μL)/21 mL Aufschluss).
- Entstehende Suspension wurde nach Befüllung eines Potters mit einem Tight-Pistill unter Anwendung von 20-25 Hüben homogenisiert.
- Zentrifugation (30 min/13000 x g/20 °C).

- Der Überstand wurde mit Hilfe einer Spritze und eines Acrodisc® (0,8/0,2 µm) filtriert.
- Vom Filtrat wurden 200 µL für die Analytik abgenommen (bei 4°C zwischengelagert).
- Das Volumen der filtrierten Lösung wurde mit Hilfe einer 25 mL Pipette bestimmt; Endvolumen Aufschluss = **21 mL Spee-Avi-Bi-H6-Aufschluss**.
- Es wurde ein Aliquot entnommen, mit LP2 1:20 verdünnt und die Proteinkonzentration bestimmt:
 - Küvette 1: Mischungsverhältnis 1:20; 40 µL Spee Aufschluss + 760 µL LP2.
 - Küvetten 2: 800 µL LP2 (Leerwert) zum Nullabgleich des Photometers.
- Die optische Dichte (Absorption) der 1:20-verdünnten Probe wurde mittels Photometer bei 280 nm gegen LP2 (Leerwert/Blindprobe) gemessen.

Ergebnis der Messung: **OD₂₈₀ = 0,4571 E/mL** (Rohdaten siehe Anlage 1, Seite 1).
- Gesamtprotein im filtrierten Lysat: $0,4571 \text{ E/mL} \times 20 \times 21 \text{ mL} = \mathbf{191,98 \text{ E}}$.

2.2 Ni-Chelat Chromatographie:

Es wurde eine mit *Ni-Chelat* beladene His-Trap Säule verwendet. Nachdem die Ventile des HPLC-Geräts durchgespült worden waren, wurde die Säule mit Wasser und anschließend mit dem im Teil **Methoden** – „2.1 Pufferlösungen (Gebrauchslösungen)“ beschriebenen Auftragspuffer *Ni-Chelat* eingewaschen (Äquilibrierung). Anschließend wurden die **21 mL Spee-Avi-Bi-H6-Aufschluss** auf die Säule aufgetragen. Durch die Interaktion des *His6-tags* der *Spee* mit dem *Ni-Chelat* Komplex der His-Trap Säule wurde das Enzym an die Gelmatrix gebunden. Die im Lysat vorkommenden Proteinverunreinigungen wurden im **Durchlauf** (45 mL) aufgefangen. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt. Eine Gesamtproteinkonzentration von **131,58 E** wurde ermittelt. Als nächstes wurde mit dem im Teil **Methoden** – „2.1 Pufferlösungen (Gebrauchslösungen)“ beschriebenen Wasch-/ Elutionspuffer gewaschen. Die Pumpe

wurde hierbei anfangs auf 4 % 500 mM Imidazol eingestellt. Durch das 20 mM Imidazol wurden schwach gebundene Proteine von der Säule gewaschen. Das Targetprotein *Spermidin Synthase* bindet durch den *His6-tag* stark an den *Ni-Chelat* Komplex und wird mit 20 mM Imidazol nicht entfernt. Die Proteinkonzentration ergab eine Gesamtkonzentration im **Wasch/Eluat 20 mM Imidazol** (65 mL) von **71,89 E**. Als nächster Schritt wurde die Pumpe des HPLC-Geräts auf 40 % 500 mM Imidazol eingestellt. Das Targetprotein wurde so mittels 200 mM Imidazol Wasch-/ Elutionspuffer eluiert. Die Gesamtkonzentration an **Eluat** (13 mL) ergab einen Wert von **11,089 E**. Als letzter Schritt wurde die Säule mit 500 mM Imidazol Wasch-/ Elutionspuffer (Pumpe auf 100%) gereinigt. Es wurde wie folgt vorgegangen:

- His-Trap HP-Säule:

Durchmesser (d)	=	0,7 cm
Höhe (h)	=	2,5 cm
Säulenvolumen (SV)	=	1,0 mL
Beladungskapazität	=	20 mg Protein-H6
- Flußgeschwindigkeit für alle Schritte 1 mL/min = 60 mL/h = 156 cm/h.
- Chromatographie bei Raumtemperatur.
- Ventile A, B, C des HPLC-Geräts wurden durchgespült (separat mit H₂O).
- Die Säule wurde montiert.
 - Für 10 min. mit filtriertem Wasser eingewaschen (10 SV Milli-Q-Wasser).
 - Anschließend 20 min. mit Auftragspuffer *Ni-Chelat* (20SV) gespült.
- Zellysat-Überstand (**21 mL *Spee-Avi-Bi-H6-Aufschluss***) aus 2.1 wurde auf die Säule aufgetragen.
- Durchlauf gesammelt und bei 4 °C gelagert.
- Es wurde mit Auftragspuffer *Ni-Chelat* nachgewaschen, bis Extinktion stabil zwischen 20 und 25 mE.
 - **Endvolumen 45 mL** (Durchlauf).

- Vom Durchlauf wurde eine 1:20 Verdünnung hergestellt und die Proteinkonzentration bestimmt:
 - Küvette 1: Mischungsverhältnis 1:20; 40 µL Durchlauf + 760 µL LP2 (1:2 verdünnt mit Auftragspuffer).
 - Küvette 2: 800 µL LP2 (1:2 verdünnt mit Auftragspuffer) zur Nullstellung des Photometers.

- Die optische Dichte (Absorption) der 1:20-verdünnten Probe wurde mittels Photometer bei 280 nm gegen LP2 (1:2 mit Auftragspuffer) (Leerwert/Blindprobe) gemessen.

Ergebnis der Messung: **OD₂₈₀ = 0,1462** E/mL.

(Rohdaten siehe Anlage 1, Seite 2).

Gesamtprotein im Durchlauf/Nachwasch: 0,1462 E/mL x 20 x 45 mL = **131,58 E**.

- Bei t = 113 min. wurde auf **Wasch-/ Elutionspuffer** (20 mM Imidazol) umgestellt; Einstellung Pumpe: 4% 500 mM Imidazol.

→ **Endvolumen: 65 mL** (Imidazol 20 mM).

- Von der Fraktion Wasch/Elution (20 mM Imidazol) wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt und die Proteinkonzentration bestimmt:

→ Küvette 1: Mischungsverhältnis 1:10; 80 µL Probe Wasch/Elution + 720 µL 20 mM Imidazol.

→ Küvette 2: 800 µL 20 mM Imidazol (Leerwert) zur Nullstellung des Photometers.

- Die optische Dichte (Absorption) der 1:10-verdünnten Probe wurde mittels Photometer bei 280 nm gegen 20 mM Imidazol (Leerwert/Blindprobe) gemessen.

Ergebnis der Messung: **OD₂₈₀ = 0,1106** E/mL.

(Rohdaten siehe Anlage 1, Seite 3).

Gesamtprotein in Fraktion Wasch/Elution: 0,1106 E/mL x 10 x 65 mL = **71,89 E**.

- Bei $t = 118$ min. wurde auf **Elutionspuffer** (200 mM Imidazol) umgestellt, welcher das Targetprotein-*Avi-Bi-H6* eluiert; Einstellung Pumpe: 40% 500 mM Imidazol.
→ **Endvolumen 13 mL** (Eluat).
- Von der Fraktion Elution (200 mM Imidazol) wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt und die Proteinkonzentration bestimmt:
→ Küvette 1: Mischungsverhältnis 1:10; 80 μ L Probe Wasch/Elution + 720 μ L 200 mM Imidazol.
→ Küvette 2: 800 μ L 200 mM Imidazol (Leerwert) zur Nullstellung des Photometers.
- Die optische Dichte (Absorption) der 1:10-verdünnten Probe wurde mittels Photometer bei 280 nm gegen 200 mM Imidazol (Leerwert/Blindprobe) gemessen.

Ergebnis der Messung: **OD₂₈₀ = 0,0853** E/mL.
(Rohdaten siehe Anlage 1, Seite 4).
Gesamtprotein in Fraktion Wasch/Elution: 0,0853 E/mL x 10 x 13 mL = **11,089 E**.
- Bei $t = 217$ min. wurde auf Wasch-/ Elutionspuffer (500 mM Imidazol) umgestellt, um die Säule zu reinigen;
Einstellung Pumpe: 100% 500 mM Imidazol.

Bilanz der NTA-Chromatographie:

SPEE-Avi-Bi-H6	E 280 nm	Volumen [mL]	Summe E	% vom Auftrag
Auftrag	0,4571	21	191,98	100 %
Durchlauf	0,1462	45	131,58	68,54 %
Imidazol 20 mM	0,1106	65	71,89	37,45 %
Imidazol 200 mM	0,0853	13	11,089	5,78 %

2.3 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay:

Wie im Teil **Methoden** – „4. BCA-Assay“ angesprochen, ist der BCA-Assay eine Methode zur quantitativen Proteinbestimmung. Der Test stellt eine kolorimetrische Nachweismethode dar. Die Messungen erfolgen bei 562 nm.

Der BCA-Assay wurde gemäß Instruction-Manual von Pierce durchgeführt. Details zur Vorgehensweise siehe **PIERCE BCA™ Protein Assay Kit, No. 23225, 23227.**

Zusammengefasst wurde wie folgt vorgegangen:

- Es wurde ein Gemisch („Working Reagent“) aus 50 mL BCA™ Protein Assay Reagent A und 1 mL BCA™ Protein Assay Reagent B (blauer Farbstoff) hergestellt.
- Jeweils 100 µL der Proben Auftrag, Durchlauf, Imidazol 20 mM und Imidazol 200 mM (Eluat) wurden mit 2 mL des Working Reagents versetzt. Jede Probe wurde doppelt angesetzt und gemessen.
- Anschließend wurden die Proben für 30 min. bei 37°C inkubiert und daraufhin abgekühlt.
- Schließlich wurden die Proben im Photometer gegen einen entsprechend behandelten Leerwert bei 562 nm gemessen.
- Eine Standardkurve mit BSA wurde erstellt und anhand dieser und einem Excel-Programm die Proteinkonzentrationen der Proben Auftrag, Durchlauf, Imidazol 20 mM und Imidazol 200 mM (Eluat) ermittelt. (**Messergebnisse** siehe Anlage 2.)

2.4 Reinheitsüberprüfung mittels SDS-PAGE:

Die Reinheit des gewonnenen Targetproteins *Spee* wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Wie unter Methoden – „5. SDS-PAGE“ beschrieben, wurden Proben der NTA-Chelat-Fraktionen Auftrag, Durchlauf, Wasch und Eluat mit SDS Sample Buffer versetzt und, wie beschrieben, auf die Elektrophorese vorbereitet. Die Reduktion der Proben erfolgte durch Zugabe von DTT (*Dithiothreitol*). Diese Behandlung führt zur

Spaltung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken. Falls das reduzierte Protein sich vom nicht-reduzierten in der SDS-Gel-Wanderungsgeschwindigkeit nicht unterscheidet, weist dieses darauf hin, dass das native Protein nicht über Disulfidbrücken verfügt. Dieses trifft auf das hier untersuchte Enzym *Spermidin Synthase* zu, welches im nativen Zustand als Monomer vorliegt und keine Disulfidbrücken enthält. Für die vorliegende Analyse wurden Gradienten-Gele (4-12 %) verwendet. Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen:

- Auftrag und Durchlauf wurden, ausgehend von ihrer Extinktion bei 280 nm, ad 6 E, die Imidazol-Eluate ad 1 E mit *Ni-Chelat*-Auftragspuffer verdünnt.
- Anschließend wurden je 20 µL vom Auftrag/Durchlauf/Imidazol/Eluat mit 20 µL SDS Sample Buffer (sowohl mit als auch ohne DTT) versetzt.
- Es wurde bei 95° C 10 min. lang erhitzt und das entstandene Kondenswasser durch Zentrifugieren wieder der Lösung zugeführt.
- Ein Laufpuffer wurde hergestellt (25 mL SDS-Laufpuffer + 475 mL H₂O).
- Die Taschen des Gels wurden gespült und anschließend wie folgt befüllt:
 - 15 µL Mark 12™ Unstained Standard.
 - je 20 µL (nicht reduziert) Auftrag/Durchlauf Imidazol (20 mM)/Eluat.
 - 20 µL Probenpuffer ohne Reduktionsmittel.
 - je 20 µL (reduziert) Auftrag/Durchlauf/Imidazol (20 mM)/Eluat.
- Nach der durchgeführten Elektrophorese wurde das Gel für 10 min. in Fixierungslösung (40 mL H₂O/50 mL Methanol/10 mL Essigsäure) eingelegt.
- Das Gel wurde zur Anfärbung erst 15 min. in Lösung (55 mL H₂O/20 mL Methanol/20 mL Stainer A) eingelegt und anschließend mit 5 mL Stainer B angefärbt (Coomassie-blau).
- Das Gel wurde schließlich in Wasser entfärbt und später getrocknet (siehe Anlage 3, Seite 1).

Diskussion

1. Expressionssysteme

Die Expressionsrate und Qualität eines rekombinanten Proteins hängt hauptsächlich vom verwendeten Expressionssystem ab. Es stehen verschiedene Expressionssysteme zur Verfügung. Nachfolgende Übersichtstabellen fassen Vor- und Nachteile der wichtigsten Expressionssysteme zusammen. (Stiegler, 1999)

- Bakterien: *Escherichia coli*

Vorteile

- ⇒ leicht zu isolieren; sehr gut charakterisiert
- ⇒ leicht kultivierbar; unkomplizierte Kultur
- ⇒ effizient; sehr hohe Expressionsraten
- ⇒ rasche Fermentation; kurze Generationszeit

Nachteile

- ⇒ keine posttranslationalen Modifikationen wie bei Eukaryonten möglich; z.B. Glykosylierung (Anfügen von Zuckerketten)
- ⇒ Bildung von Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies (IBs))

- Pilze: *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe)

Vorteile

- ⇒ schnelles Wachstum
- ⇒ keine Bildung von Einschlusskörperchen
- ⇒ alternatives „splicing“ möglich
- ⇒ einige posttranslationale Modifikationen möglich

Nachteile

- ⇒ bei Glykosylierung entsteht anderes Glykosylierungsmuster
- ⇒ glykosylierte Proteine können Immun-/ Abwehrreaktionen auslösen (Immunogen)

- Insektenzellen: *Baculo Virus*

Vorteile

⇒ gute Expressionsraten

Nachteile

⇒ einige Postranslationale Modifikationen nicht möglich

- Säugetierzellen: z.B. *CHO-Zellen* (**C**hinese **H**amster **O**vary)

Vorteile

⇒ verschiedene Genübertragungssysteme etabliert

⇒ Amplifikation (Vervielfachung) des eingeschleusten Gens möglich

⇒ posttranslationale Modifikationen ähnlich wie beim Menschen

Nachteile

⇒ aufwendige und teure Kultur

⇒ Expressionsraten relativ niedrig

Im Fall der *Spermidin Synthase* wurde das *HEK-Expressionssystem* bevorzugt. *HEK-Zellen* sind einfach zu kultivieren und erbringen für viele Anforderungen ausreichende Expressionsraten. *HEK-Zellen* eignen sich insbesondere für transiente Expressionen, welche häufig für eine schnelle Materialbereitstellung durchgeführt werden.

2. Alternative Reinigungsverfahren

Native, nicht-modifizierte Proteine werden aus Fermenterüberständen oder Zellaufschlüssen in der Regel „klassisch“ mittels Ionenaustauscher-, Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC) oder Gelpermeationsschromatographie isoliert. Bei Verwendung eines Ionenaustauscher-Gels bindet das Targetprotein auf Grund seiner Ladung an positiv oder negativ geladene Gruppen, welche immobilisiert vorliegen. Ist die DNA-Sequenz des gewünschten Proteins bekannt, kann auf spezifischere Mittel zurückgegriffen werden. Die Variante der auf DNA-Ebene integrierten *tags* ermöglicht die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie. Beispiele für alternative *tags* zum im

Rahmen der Facharbeit vorgestelltem *His6-tag* sind beispielsweise vergleichsweise lange *tags* wie MBP (Maltose Bindeprotein), GST (Gluthation-S-transferase) oder CBD (Chitin Bindedomäne). Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass ein solcher *tag* mit dem Targetprotein interagiert und dadurch die Funktionalität des gewünschten Proteins beeinträchtigt. Zusätzlich muss der *tag* nach Aufreinigung des Zielproteins mit einer Protease abgespalten werden, da dieses durch den angehängten *tag* stark immunogen wirkt. Die Abspaltung bedeutet einen weiteren Arbeitsschritt, wobei das Risiko eines Verlustes an Protein nicht ausgeschlossen ist. Die Verwendung von kleinen *tags*, wie beispielsweise der *His6-tag* kann hier weiterhelfen. Die weniger immunogenen kleinen *tags* müssen nicht von einer Protease abgespalten werden. Alternativen sind beispielsweise der Strep-tag II, welcher eingesetzt wird, um unter physiologischen Bedingungen bioaktive Proteine anzureichern. Eine weitere Möglichkeit ist der im Rahmen der Facharbeit verwendete *Avitag*, welcher über das in seiner AA-Sequenz befindliche biotinylierte Lysin eine Bindung mit Streptavidin eingehen kann. Streptavidin ist ein tetrameres Protein mit vier Untereinheiten, wobei jede Untereinheit eine potenzielle Bindungsstelle für ein Biotinmolekül (Vitamin H) darstellt. Die Biotin-Streptavidin-Bindung ist die stärkste bekannte, nicht kovalente Bindung ($K = 10^{15} \text{M}^{-1}$). Der Vorgang der Biotinylierung ist verhältnismäßig unkompliziert und beeinträchtigt in der Regel nicht die biologische Aktivität des getagten Proteins. Mit einem *tag* markierte Proteine lassen sich nicht nur einfach isolieren, sondern z.B. im Fall des *Avitags* ebenso bequem mittels spezifischem ELISA quantifizieren. Im Rahmen der Facharbeit wurde nur der *His-tag* des Enzyms als Reinigungshilfe eingesetzt. Die Reinheit hätte durch Verwendung der im Labor vorhandenen MAK<Biotin>-Affinitätssäule noch weiter verbessert werden können. Dieser Reinigungsschritt wurde jedoch nicht mehr durchgeführt. *Tags* werden häufig in Proteine für diagnostische Zwecke eingebaut. Therapeutische Proteine, wie z.B. Erythropoietin (EPO), werden jedoch in der Praxis nicht durch den Einbau von *tags* modifiziert. Man ist hier darauf bedacht, ihren (weitgehend) humanidentischen Charakter zu erhalten und auf einen Einbau von potentiell immunogen wirkenden Epitopen, wie *tags*, zu verzichten.

(<http://www.texys.de/biodata/expression.html>) (<http://www.avidity.com/apps.html>)

3. Analytikmethoden

Zur quantitativen und qualitativen Analyse von Proteinen ist eine Vielzahl von Methoden verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wurden als quantitative Methoden die Absorption des Proteins bei 280 nm sowie der BCA-Test verwendet. Die Reinheit der

über NTA-Chelat erhaltenen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE überprüft, jedoch aus Zeitgründen kein quantitativer Gel-Scan durchgeführt, mit Hilfe dessen der Anteil an im NTA-Eluat noch vorhandenen Proteinverunreinigungen hätte ermittelt werden können. Da das rekombinante Enzym Spermidin Synthase, außer über einen *Histag*, auch noch über einen *Avitag* verfügt, besteht die Möglichkeit, der spezifischen Quantifizierung des Enzyms in allen Fraktionen mittels ELISA und somit die Ermittlung der Reinheit des Enzyms. Aus Zeitgründen wurde diese Methode im Rahmen der Facharbeit nicht durchgeführt. Anhand des SDS-PAGE-Ergebnisses wurde eine Reinheit mittels NTA-Chelat von ca. 50 % erreicht (visuelle Schätzung). Die HPLC stellt eine weitere Methode zur Ermittlung der Reinheit dar. Als HPLC-Trennsäulen eignen sich IEC, SEC oder HIC-Säulen. Über die Methoden zur Bestimmung des Gehalts und der Reinheit von Proteinen hinaus sind in modernen Analytiklabors häufig weitere Methoden, wie z.B. Kapillarelektrophorese und Massenspektrometrie etabliert. Mit Hilfe dieser Methoden lassen sich auch geringe Unterschiede in der Ladung des Moleküls bzw. Modifikationen am Protein, wie Methionin-Oxidationen und Desamidierungen, detektieren. Diese Analyse-Methoden sind weniger für die Produktion diagnostischer, jedoch von erheblicher Bedeutung für die Produktion therapeutischer Proteine.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Amino Acid
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
Bi	Biotin
CBD	Chitin Bindedomäne
CHO	Chinese Hamster Ovary
Da	Dalton
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzym-linked-immunosorbent Assay
EPO	Erythropoietin
GST	Gluthation-S-transferase
HEK	Human Embryonic Kidney
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEC	Ion Exchange Chromatography
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
MAK	Monoklonaler Antikörper
MBP	Maltose Bindeprotein

mRNA	Messenger- Ribonucleic acid
NTA	Nitrilotriacetic acid
OD	Optische Dichte
OD ₂₈₀	Optische Dichte (Extinktion) bei 280 nm
Phe	Phenylalanin
POD	Horse-radish-peroxidase, Meerrettich- Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEC	Size Exclusion Chromatography
Spee	Spermidin Synthase
TMB	Tetramethylbenzidin
Trp	Tryptophan
Typ	Tyrosin

Quellenverzeichnis

1. Literaturverzeichnis

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D., Molecular Biology Of The Cell, New York, Garland Publishing, Inc. New York & London, 1983

Eisner W., Gietz P., Glase M., Justus A., Laitenberger K., Liebenow K. J., Schierle W., Stein-Bastuck R., Sternberg M., Elemente Chemie II Gesamtband, Stuttgart, Ernst Klett Verlag GmbH, 2000

Fallert-Müller A., Lexikon der Biochemie in zwei Teilen, Groß-Zimmern, Elsevier Spektrum akademischer Verlag, 1999/2000

Hinselmann L., Entwicklung eines Sandwich-ELISA für Spermidin Synthase, einem potenziellen Tumormarker in Serum, Dresden, 2005

Lehninger A. L., Nelson D. L., Cox M. M., Prinzipien der Biochemie, Bielefeld, Spektrum akademischer Verlag, 1994

Pschyrembel, 257. Aufl., Walter de Gruyter Verlag Berlin, 1994

QIAexpressionist, The, The QIAexpress System, 03/2001

Rehm H., Proteinbiochemie, Heidelberg, Spektrum akademischer Verlag, 2002

Schlößmann T., Wedekind F., RTS AviTag Biotinylation Reagents For Enzymatic Monobiotinylation Of Proteins, Penzberg, ROCHE BIOCHEMICA NO.2/2003

Stiegler G., Kreße G., Buckel P., Biotechnologische Herstellung von Arzneimitteln, Martinsried, Sonderdruck aus Spektrum der Wissenschaft, 02/1999

2. Internetquellen (siehe beigefügte CD)

<http://www.avidity.com/apps.html>

<http://www.krebsinformationsdienst.de/themen/untersuchung/tumormarker.php>

<http://www.nugi-zentrum.de/Experimente/Biochemie/Proteinbest/Zusatzinfo.html>

<http://www.texys.de/biodata/expression.html>

3. Bildquellen

Hinselmann L., Entwicklung eines Sandwich-ELISA für Spermidin Synthase, einem potenziellen Tumormarker in Serum, Dresden, 2005

QIAexpressionist, The, The QIAexpress System, 03/2001

Schlößmann T., Wedekind F., RTS AviTag Biotinylation Reagents For Enzymatic Monobiotinylation Of Proteins, Penzberg, ROCHE BIOCHEMICA NO.2/2003

4. Mündliche Quellen

Ein Großteil der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Informationen wurden durch Gespräche mit Frau S. Freiburghaus und Herrn Dr. H. Andres der Roche Diagnostics GmbH Penzberg, New Reagents (LR-TR3), Penzberg, in Erfahrung gebracht.

Danksagung

Die vorliegende Facharbeit wurde vom 23. Juli 2007 bis zum 22. Januar 2008 angefertigt. Im praktischen Teil der Arbeit, welcher vom 23. Juli bis zum 27. Juli 2007 andauerte, wurde ich unter Leitung von Herrn Dr. Herbert Andres und Frau Sonja Freiburghaus betreut.

Nur durch die gute Einführung in die vorliegende Themenstellung, wofür sich Herr Dr. Herbert Andres viel Zeit nahm, sowie die exzellente Betreuung von Seiten Sonja Freiburghaus, wurde mir diese Arbeit ermöglicht.

Ich danke deshalb Herrn Dr. Herbert Andres und Frau Sonja Freiburghaus vielmals für deren Unterstützung, Geduld und Verständnis.

Ein Dankeschön auch an die Roche Diagnostics GmbH Penzberg, welche die Materialien zur Verfügung gestellt hat.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Quellenverzeichnis aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

..... , den

Ort

Datum

.....

Unterschrift des Schülers

Aufschluss filtriert 1:20
(21 ml)

FIXED WAVELENGTH

11-01-2007 13:08

Wavel.	No.	Value_S
280.0	1	0.4571_1

MONTRON INSTRUMENTS

UVIKON 930

OD = 9,142
Gesamt

Anlage Nr.: 1 Seite 1 von 5
Folie Nr. : Ordner Nr.
Protokollseiten: bis
Datum : 24.9.07
Bearbeiter: S. Freiburghaus

Durchlauf 1:20 in LPZ (1:2 verdünnt mit
(45 ml) Auftragspuffer)

FIXED WAVELENGTH

11-01-2007 17:28

Wavel.	No.	Value_S
280.0	1	0.1462_1

KONTRON INSTRUMENTS

UVIKON 930

Anlage Nr.: 1 Seite 2 von 5
Folie Nr. : Ordner Nr.
Protokollseiten: bis
Datum : 24.7.07
Bearbeiter: S. Freiburghaus

Wäsche - 20 mM Imidazol 1:10 verdünnt mit entsprechendem
(65 ml) Puffer

FIXED WAVELENGTH

11-01-2007 17:26

Wavel.	No.	Value_S
280.0	1	0.1106_1

KONTRON INSTRUMENTS

UVIKON 930

Anlage Nr.: Seite 3 von 5
Folie Nr. : Ordner Nr.
Protokollseiten: bis
Datum : 24.7.07
Bearbeiter: S. Freiburghaus

Eluat Spee-Avi-Bi-H6
(13 ml)

1:10 verdünnt mit Trisidazol
(200 mM)

FIXED WAVELENGTH

11-01-2007 17:30

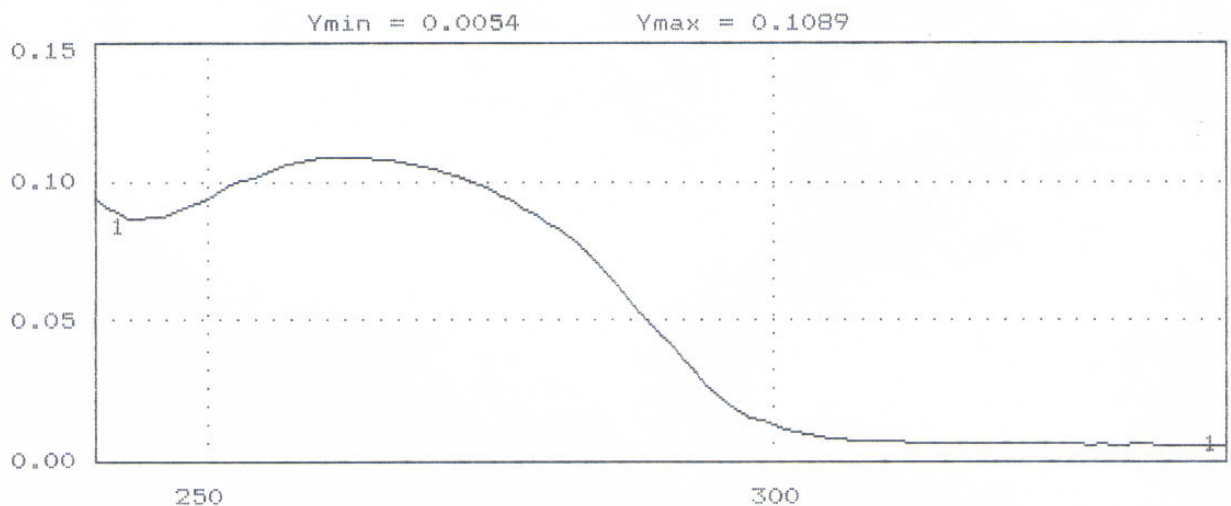
Wavel.	No.	Value_S
280.0	1	0.0853_1

KONTRON INSTRUMENTS

UVIKON 930

WAVELENGTH SCAN

11-01-2007 17:32

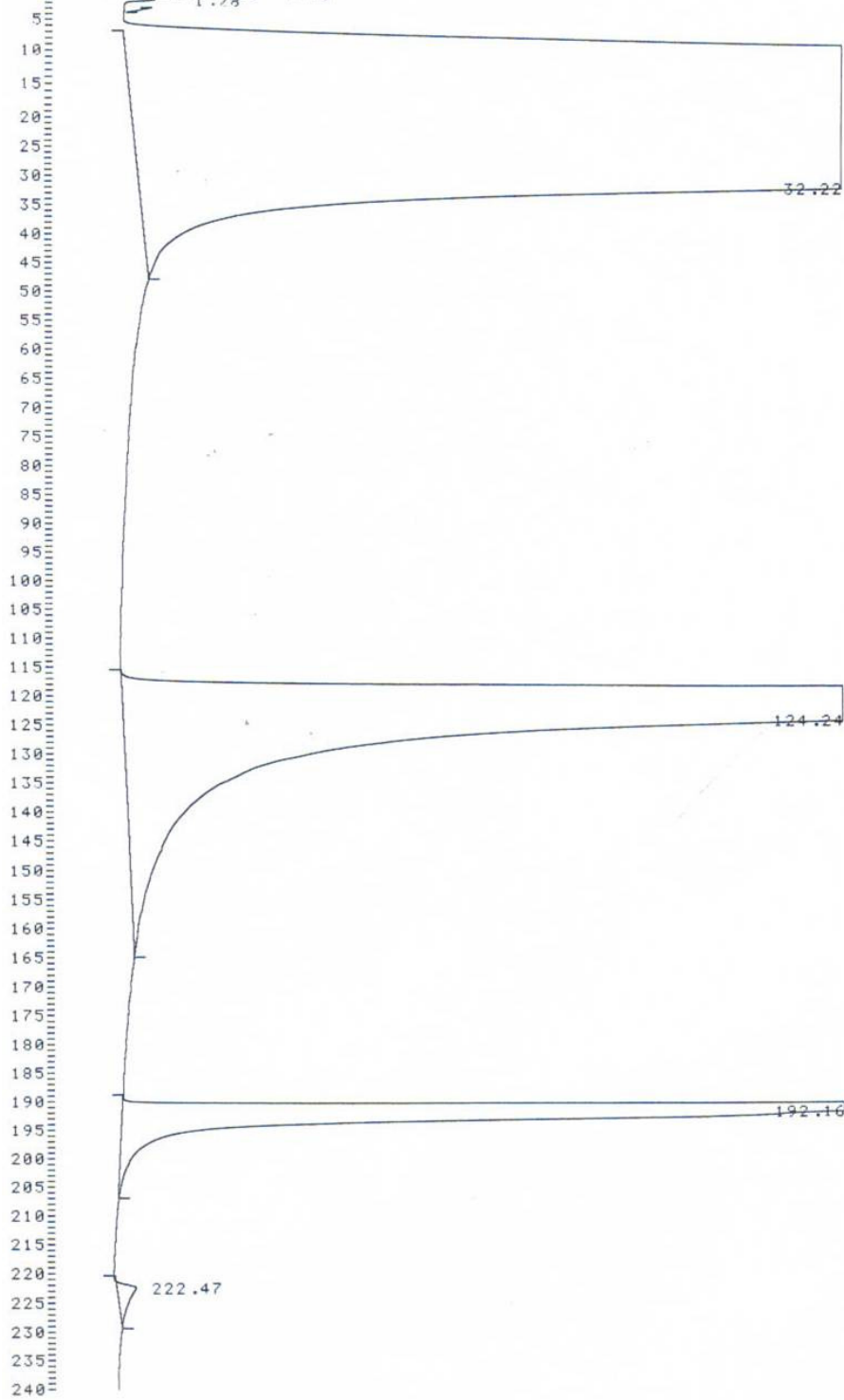


KONTRON INSTRUMENTS

UVIKON 930

Anlage Nr.: ...1... Seite ...4... von ...5...
Folie Nr.: Ordner Nr.:
Protokollseiten: bis
Datum : ...24.7.07.....
Bearbeiter: S. Freiburghaus

CH. 1 C.S 1.25 ATT 10 OFFS 5 07/24/07 02:05
 A-21 SENS. 2810 F-HA



Anlage Nr.: Seite 5 von 5
 Folie Nr.: Ordner Nr.
 Protokollseiten: bis
 Datum : 24.7.07
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

D-2500

07/24/07 02:05

METHOD: NI.CHELAT TAG: 2 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
2	32.22	1641935091	64.758	BB
3	124.24	680257514	26.829	BB
4	192.16	206815453	8.156	BB
5	222.47	6459799	0.254	BB
TOTAL		2147483647	99.999	
PEAK REJ :		1000000		

Vollkalibration

Titel der Auswertung:	BCA Felix
Name der Auswertung:	70726
Name des Vektors:	BCA
Titel des Vektors:	BCA Felix
Name der Transformation:	
Titel der Transformation:	
Chargen-Nr.:	
Methoden-Nr.:	0

Kalibrationsstandards					
PID	Nr	Art	Konz. µg/ml	Signale	
ST1	1	Standard	0	0	0
ST2	2	Standard	31.3	0.0518	0.0552
ST3	3	Standard	62.5	0.0963	0.0935
ST4	4	Standard	125	0.1794	0.1636
ST5	5	Standard	250	0.3182	0.2952
ST6	6	Standard	500	0.6319	0.5553
ST7	7	Standard	1000	1.0951	1.0158
ST8	8	Standard	2000	1.7282	1.4472

Transformationsbeschreibung	
Anpassungstyp:	Wiener Rodbard Wi0
Messwertreduktion:	Median
Parameter:	P1 = -2.89035
	P2 = 0.000255473
	P3 = 1.1125
	P4 = 2.90279
	R = 0
	T = 1
	V = 1
Summe Residuenquadrate:	RSS = 773.9971035

Statistik der Kalibrationsstandards										
PID	Nr	Konz. µg/ml	Abl. µg/ml	N	Median (Sign.)	MW (Sign.)	SD (Sign.)	VK (Sign.) [%]	B/B0	Res. (Sign.)
ST1	1	0	-	2	0	0	0	-	0	0.01243
ST2	2	31.3	37.523	2	0.0535	0.0535	0.0024	4.494	0.034	-0.00742
ST3	3	62.5	71.151	2	0.0949	0.0949	0.002	2.086	0.06	-0.0108
ST4	4	125	131.653	2	0.1715	0.1715	0.0112	6.514	0.108	-0.00845
ST5	5	250	239.55	2	0.3067	0.3067	0.0163	5.303	0.193	0.0128
ST6	6	500	490.664	2	0.5936	0.5936	0.0542	9.125	0.374	0.0098
ST7	7	1000	1014.385	2	1.0555	1.0555	0.0561	5.313	0.665	-0.01057
ST8	8	2000	1994.458	2	1.5877	1.5877	0.1987	12.515	1	0.00221

Vollkalibration

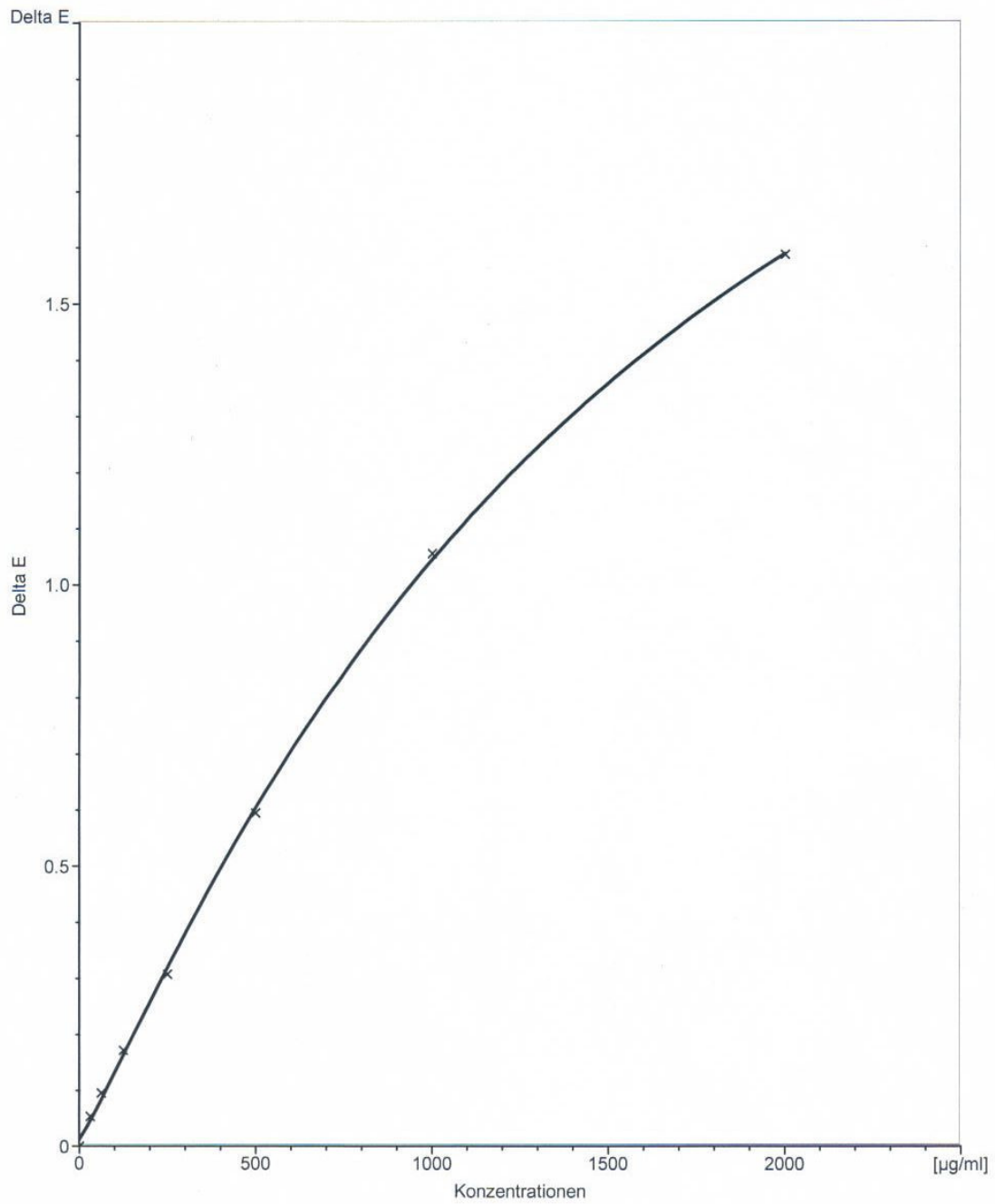
Probenablesung							
PID	Nr	N	Median (Sign.)	MW (Sign.)	VK (Sign.)	CWROW0BK32 µg/ml	Fehler-Status
ST1	1	2	0	0	-	-	Falsche Übergabeparameter ()
ST2	2	2	0.0535	0.0535	4.494	37.523	0
ST3	3	2	0.0949	0.0949	2.086	71.151	0
ST4	4	2	0.1715	0.1715	6.514	131.653	0
ST5	5	2	0.3067	0.3067	5.303	239.55	0
ST6	6	2	0.5936	0.5936	9.125	490.664	0
ST7	7	2	1.0555	1.0555	5.313	1014.385	0
ST8	8	2	1.5877	1.5877	12.515	1994.458	0
A1	9	2	0.3328	0.3328	8.264	260.965	0
A2	10	1	0.5714	0.5714	-	469.726	0
D1	11	2	0.2575	0.2575	1.757	199.823	0
D2	12	2	0.4455	0.4455	11.364	356.196	0
I	13	2	0.3011	0.3011	3.922	234.952	0
E	14	2	0.3199	0.3199	4.907	250.331	0

BCA Felix



BCA Felix
BCA Felix

26.07.2007 10:10:22
RPZMS000167/FELIX/070726
Protokoll Id: -Draft- FREIBURS Vers.:5.2.1



— x BCA Felix : Wiemer Rodbard W10

Anlage Nr.: 2 Seite 3 von 4
Folie Nr. : Ordner Nr.
Protokollseiten: bis
Datum : 26.7.07
Bearbeiter: S. Freiburghaus

FIXED WAVELENGTH

11-01-2007 13:40

	Wavel.	No.	Value_S
ST1: 31,3 µg/ml	562.0	1	-0.0552_1
	562.0	2	0.0518_1
ST2: 62,5 µg/ml	562.0	3	0.0963_1
	562.0	4	0.0935_1
ST3: 125 µg/ml	562.0	5	0.1794_1
	562.0	6	0.1636_1
ST4: 250 µg/ml	562.0	7	0.3182_1
	562.0	8	0.2952_1
ST5: 500 µg/ml	562.0	9	0.6319_1
	562.0	10	0.5553_1
ST6: 1000 µg/ml	562.0	11	1.0951_1
	562.0	12	1.0158_1
ST7: 2000 µg/ml	562.0	13	1.7282_1
	562.0	14	1.4472_1
A1: 2385 µg/ml	562.0	15	0.3523_1
	562.0	16	0.3134_1
A2: 2147 µg/ml	562.0	17	0.3120_1
	562.0	18	0.5714_1
D1: 583 µg/ml	562.0	19	0.2607_1
	562.0	20	0.2543_1
D2: 399 µg/ml	562.0	21	0.4813_1
	562.0	22	0.4097_1
I: 235 µg/ml	562.0	23	0.3094_1
	562.0	24	0.2927_1
E: 250 µg/ml	562.0	25	0.3310_1
	562.0	26	0.3088_1

KONTRON INSTRUMENTS

UVIKON 930

Anlage Nr.: ...2... Seite ...4... von ...4...
 Folie Nr. : Ordner Nr.
 Protokollseiten: bis
 Datum : ...26.7.07...
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

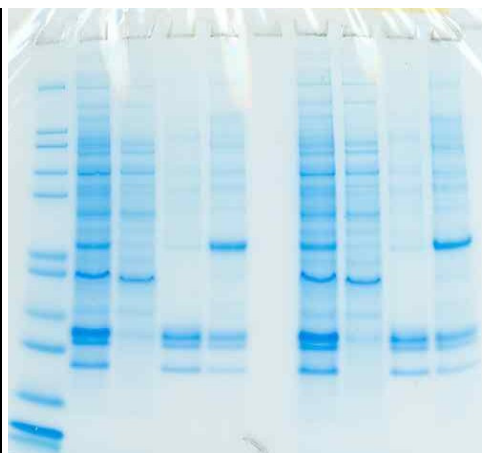
SDS-Gel Analytik:

SDS-Gel	NuPage 4-12% Bis-Tris , INVITROGEN, NP0321
Laufpuffer	NuPage MES SDS 20 x, INVITROGEN, NP0002
Marker	Mark12 Unstained Standard Invitrogen , LC5677
Sample Buffer	NuPage LDS Sample Buffer 4x, INVITROGEN, NP0007 wird mit H ₂ O verdünnt; +/- Zugabe von 50 mM DTT
Running Conditions	35 min, 200 V, 120 mA
Färbung	Novex Stainer A INVITROGEN Nr. 46-7015
	Novex Stainer B INVITROGEN Nr. 46-7016

Probenanordnung SDS-Gel

Bahn	Probe	Vol µl
1	Mark12 unverd.	15
2	Auftrag n.red.	20
3	Durchlauf n.red.	20
4	Imidazol (20 mM) n.red.	20
5	Eluat n.red.	20
6	Probenpuffer n.red.	20
7	Auftrag red.	15
8	Durchlauf red.	20
9	Imidazol (20 mM) red.	20
10	Eluat red.	20

Protein	Appr. Mol. Weight (kDa)
Myosin	200
β-galactosidas	116.3
Phosphorylase B	97.4
BSA	66.3
Glutamic dehydrogenase	55.4
Lactate dehydrogenase	36.5
Carbonic anhydrase	31.0
Trypsin inhibitor	21.5
Lysozyme	14.4
Aprotinine	6.0
Insulin B chain	3.5
Insulin A chain	2.5



← Spee
(ca. 35 kDa)

Anlage Nr.: 3... Seite 1.. von 1..
 Folie Nr. : Ordner Nr.
 Protokollseiten: bis
 Datum : 2.8.07
 Bearbeiter: S. Freiburghaus

Protokoll

23.07. – 26.07.2007

Bearbeiter: Felix Kuhne
Betreuerin: Sonja Freiburghaus
Gruppenleiter: Dr. Herbert Andres
Gruppe: LR-TR3

Herstellung von Targetprotein-Avi-Bi-H6 (Ni-Chelat) aus HEK-Zellen

1.Methode/Verfahren:

Die Zellen wurden unter reduzierenden Bedingungen in Anwesenheit eines Proteaseinhibitor-cocktails und Benzonase zum DNA-Verdau lysiert. Der nachfolgende Chromatographieschritt (Ni-NTA) erfolgte ebenfalls unter reduzierenden Bedingungen. Die Reinigung lässt sich wie folgt kurz zusammenfassen: Der Zellysat-Überstand wird auf eine Ni-Chelat-Säule aufgetragen. Schwach gebundene Proteine (Verunreinigungen) werden in einem Waschschrift mit 20 mM Imidazol entfernt. Das Targetprotein-Avi-Bi-H6 wird schließlich in einem Schritt mit 200 mM Imidazol eluiert. In Abhängigkeit von der Konzentration des Targetproteins und dem Anteil an Proteinverunreinigungen im Load erzielt man im Pool eine Reinheit des Targetproteins von 20- 80 %. Je höher die Expressionsleistung der Wirtszelle, desto höher ist die Reinheit bereits im Zell-Lysat und entsprechend besser das Ergebnis im Pool nach Reinigung über Ni-NTA. (Allgemeines Prozessschema siehe Abb.1, S.10)

2.Einsatzstoffe/Materialien/Geräte:

Einsatzstoffe	Hersteller	Bestellnummer	Molekulargewicht bzw. Dichte
HEPES	Roche	10 242 608	MG 238,3
CHAPS	Roche	10 810 126	MG 614,9
Glycerol	Merck	1.04093	MG 92,10; D 1,26 g/mL
Thioglycerol	Fluka	88641	MG 108,16; D 1,247 g/mL
Complete, EDTA-free	Roche	11 873 580 001	---
Benzonase	Merck	1.01653	---
2MgCl ₂ x 6H ₂ O	Merck	1.05833	MG 203,3
Imidazol	Fluka	56749	MG 68,08
NaCl	Merck	1.06404.1000	MG 58,44
NaOH	Merck	1.06495.1000	MG 40,00
Methanol	J.T. Baker	8045	MG 32,04
Essigsäure	Fluka	32810	MG 60,05
Stainer A Colloidal Blue	Novex	1316309	---
Stainer B Colloidal Blue	Novex	1316404	---
SDS Sample Buffer (4x) NuPAGE	Invitrogen	NP0007	---
MES SDS Running Buffer (20x) NuPAGE	Invitrogen	NP0002	---
„HEK 293/ST BirA“; Spee-Avi-His/Roller; Pellet aus 500 ml à 4,2 x 10 ^{^5} , 28 %	Roche	TT 0702080; (14.Feb.2007, S. Voit, LR-DE2)	---

Material	Hersteller	Bestellnummer
His-Trap HP 1 mL	GE Healthcare	17-5247-01
Spritzenfilter Acrodisc 0,8/0,2 µm /25mm	Pall	4187
Spritzenfilter Acrodisc 0,2 µm /13 mm	Pall	4454
40 mL-Potter	VWR	432-1273
VacuCap 60 Filtereinheit, 0,2 µm	Pall	4632
VacuCap 90 Filtereinheit, 0,2 µm	Pall	4622
VacuCap 60 Filtereinheit, 0,45 µm	Pall	4634
VacuCap 90 Filtereinheit, 0,45 µm	Pall	4624
Gradientengel NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen	NP0321BOX

Geräte	Hersteller	Bestellnummer
pH-Meter, Calimatic	Knick	
Centrifuge 4K15	Sigma	45-81-01ZK-04
HPLC L-6200	Merck Hitachi	6315-037
SDS Elektrophorese Powerease 500	Invitrogen	
Photometer Uvikon 930	Kontron	45-84-PHC 1
Centrifuge 5415 D	Eppendorf	
Thermomixer comfort	Eppendorf	
Milli-Q-Aufbereitungssystem	Millipore	

3. Lösungen:

Bemerkungen:

- Kreuzkontamination von Einsatzstoffen soll beim Wiegen vermieden werden; dass heißt z.B. Löffel/Gefäße neu für jede Einwaage eines weiteren Einsatzstoffes.
- Genaues Wiegen (quantitative Bestimmung)!
- Alle Reagenzien/Einsatzstoffe werden vor Öffnung auf Raumtemperatur gebracht, da Stoffe ansonsten Feuchtigkeit aufnehmen (Kondenswasser aus Luftfeuchte).
- pH-Meter muss vor jedem Gebrauch geeicht werden; Diaphragma ist vor Austrocknung dauerhaft zu schützen (Elektrode in KCl-Lösung aufzubewahren).
- Endvolumen wird erst nach pH-Einstellung (z.B. mit NaOH) eingestellt.
- Alle Lösungen werden mit Hilfe von Vakuum und einem VacuCap® (0,2 µL) filtriert und damit haltbar gemacht.
- Bei pH-Einstellung und beim Filtrieren unter Vakuum ist eine Schutzbrille zu tragen!

3.1 Stocklösungen:

- a) 500 mM Hepes
→ 238 g Hepes werden in 1800 mL H₂O gelöst, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mit H₂O auf 2000 mL aufgefüllt.
- b) 4 M NaCl
→ 58,44 g NaCl werden in 250 mL H₂O gelöst.
- c) 1 M MgCl₂
→ 203,3 g MgCl₂ werden in 40 mL H₂O gelöst.

3.2 Pufferlösungen (Gebrauchslösungen):

a) **Lysepuffer LP1** (50 mL):

50 mM Hepes/NaOH, pH 7,5/500 mM NaCl/5% Glycerol/1% CHAPS

→ Haltbarkeit: 1 Monat bei 4°C.

Für die Herstellung von **50 mL** Lysepuffer LP1 werden benötigt:

Substanz	Benötigte Mengen
Hepes/NaOH, pH 7,5	5 mL der 500 mM Stocklösung (s.o.)
NaCl	1,46 g
Glycerol	2,5 g
CHAPS	0,5 g

Vorgehensweise: Es werden ca. 30 mL filtriertes Wasser vorgelegt, anschließend die in der oben genannten Tabelle aufgeführten Substanzmengen hinzugefügt, diese unter Rühren gelöst, der pH auf 7,5 eingestellt und anschließend mit filtriertem Wasser auf das Endvolumen von 50 mL aufgefüllt.

b) **Lysepuffer LP2** (25 mL): wird kurz vor Gebrauch frisch hergestellt.

25 mL LP1/21,7 µL Thioglycerol ad 10 mM/1 Tablette Complete, EDTA free

c) **Auftragspuffer Ni-Chelat** (1000 mL):

50 mM Hepes/NaOH, pH 7,5/500 mM NaCl/5% Glycerol/0,1% CHAPS/10 mM Thioglycerol

→ Haltbarkeit ohne Thioglycerol: 1 Monat bei 4°C.

Für die Herstellung von **1000 mL** Auftragspuffer Ni-Chelat werden benötigt:

Substanz	Benötigte Mengen
Hepes/NaOH, pH 7,5	100 mL der 500 mM Stocklösung (s.o.)
NaCl	29,22 g
Glycerol	50 g
CHAPS	1 g

Vorgehensweise: Es werden ca. 800 mL filtriertes Wasser vorgelegt, anschließend die in der oben genannten Tabelle aufgeführten Substanzmengen hinzugefügt, diese unter Rühren gelöst, der pH auf 7,5 eingestellt und anschließend mit filtriertem Wasser auf das Endvolumen von 1000 mL aufgefüllt. Kurz vor Gebrauch werden 870 µL Thioglycerol beigemischt (Endkonzentration: 10 mM).

d) **Wasch-/ Elutionspuffer Ni-Chelat** (1000 mL):

50 mM Hepes/NaOH, pH 7,5/500 mM NaCl/5% Glycerol/0,1% CHAPS/10 mM Thioglycerol/500 mM Imidazol

→ Haltbarkeit ohne Thioglycerol: 1 Monat bei 4 °C.

Für die Herstellung von **1000 mL** Wasch- und Elutionspuffer werden benötigt:

Substanz	Benötigte Mengen
Hepes/NaOH, pH 7,5	100 mL der 500 mM Stocklösung (s.o.)
NaCl	29,22 g
Glycerol	50 g
CHAPS	1 g
Imidazol	34,04 g

Vorgehensweise: Es werden ca. 800 mL filtriertes Wasser vorgelegt, anschließend die in der oben genannten Tabelle aufgeführten Substanzmengen hinzugefügt, diese unter Rühren gelöst, der pH auf 7,5 eingestellt und anschließend mit filtriertem Wasser auf das Endvolumen von 1000 mL aufgefüllt. Kurz vor Gebrauch werden 870 µL/1000 mL Thioglycerol beigemischt.

4. Durchführung

4.1 Zellaufschluss:

(Zellkultur: TT 0702080 „HEK 293/ST BirA“; Spee-Avi-His/Roller; Pellet aus 500 mL, $4,2 \times 10^5$ Zellen/mL; 14.Feb.2007 - S. Voit, LR-DE2)

- Es wird bei Raumtemperatur lysiert, um der Benzonase Gelegenheit zum DNA-Verdau zu geben.
- Gesamte Zellkultur von $2,1 \times 10^8$ Zellen wird unter Zugabe von 21 mL LP2 aufgetaut.
- Zugabe von 1 mM $MgCl_2$ (= 21 µL 1 M $MgCl_2$ in 21 mL Aufschluss).
- Zugabe von 10 U/mL Benzonase (= 0,84 µL Benzonase (250 U/µL)/21 mL Aufschluss).
- Entstehende Suspension wird nach Befüllung eines Potters mit einem Tight-Pistill unter Anwendung von 20-25 Hüben homogenisiert.

→ Pistill wird beim homogenisieren möglichst nicht aus der Suspension herausbewegt, um Schaumbildung zu vermeiden.

- Es wird zentrifugiert (30 min./13000 x g/20 °C), Sigma-Zentrifuge.
- Der Überstand wird abgenommen (leicht trüb, Fettschicht oben); Sediment wird verworfen.
- Der Überstand wird mit Hilfe einer Spritze und eines Acrodisc® (0,8/0,2 µm) filtriert.
- Vom Filtrat werden 200 µL für die Analytik abgenommen (bei 4 °C zwischengelagert).
- Das Volumen der filtrierten Lösung wird mit Hilfe einer 25 mL Pipette bestimmt;
Endvolumen Aufschluss = **21 mL Spee-Avi-Bi-H6-Aufschluss**.
- Es wird ein Aliquot entnommen, mit LP2 1:20 verdünnt und die Proteinkonzentration bestimmt:
 - Küvette 1: Mischungsverhältnis 1:20; 40 µL Spee Aufschluss + 760 µL LP2.
 - Küvette 2: 800 µL LP2 (Leerwert) zum Nullabgleich des Photometers.
- Die optische Dichte (Absorption) der 1:20-verdünnten Probe wird mittels Photometer bei 280 nm gegen LP2 (Leerwert/Blindprobe) gemessen.

Ergebnis der Messung: **OD₂₈₀ = 0,4571 E/mL** (Rohdaten siehe Anlage 1, Seite 1).

Gesamtprotein im filtrierten Lysat: 0,4571 E/mL x 20 x 21 mL = **191,98 E**.

4.2 Ni-Chelat Chromatographie:

- His-Trap HP-Säule:

Durchmesser (d)	= 0,7 cm
Höhe (h)	= 2,5 cm
Säulenvolumen (SV)	= 1,0 mL
Beladungskapazität	= 20 mg Protein-H6

- Flußgeschwindigkeit beträgt für alle Schritte 1 mL/min = 60 mL/h = 156 cm/h.
- Chromatographie erfolgt bei Raumtemperatur.
- Ventile A, B, C des HPLC-Geräts werden durchgespült (separat mit H₂O).
- Säule wird montiert.
 - wird 10 min. mit filtriertem Wasser eingewaschen (10 SV Milli-Q-Wasser).
 - wird anschließend 20 min. mit Auftragspuffer Ni-Chelat (20SV) gespült.

- Der Zellysat-Überstand (**21 mL Spee-Avi-Bi-H6-Aufschluss**) aus 4.1 wird auf die Säule aufgetragen.
- Der Durchlauf wird gesammelt und bei 4 °C gelagert.
- Nachwaschen mit Auftragspuffer Ni-Chelat, bis Extinktion stabil ist und zwischen 20 und 25 mE beträgt.

→ **Endvolumen 45 mL** (Durchlauf).

- Vom Durchlauf wird eine 1:20 Verdünnung hergestellt und die Proteinkonzentration bestimmt:
 - Küvette 1: Mischungsverhältnis 1:20; 40 µL Durchlauf + 760 µL LP2 (1:2 verdünnt mit Auftragspuffer)
 - Küvette 2: 800 µL LP2 (1:2 verdünnt mit Auftragspuffer) zur Nullstellung des Photometers.
- Die optische Dichte (Absorption) der 1:20-verdünnten Probe wird mittels Photometer bei 280 nm gegen LP2 (1:2 mit Auftragspuffer) (Leerwert/Blindprobe) gemessen.

Ergebnis der Messung: **OD₂₈₀ = 0,1462** E/mL (Rohdaten siehe Anlage 1, Seite 2).
Gesamtprotein im Durchlauf/Nachwasch: 0,1462 E/mL x 20 x 45 mL = **131,58 E**.

- Bei t = 113 min. wird auf **Wasch-/ Elutionspuffer** (20 mM Imidazol) umgestellt;
Einstellung Pumpe: 4% 500 mM Imidazol.

→ **Endvolumen: 65 mL** (Imidazol 20 mM).

- Von der Fraktion Wasch/Elution (20 mM Imidazol) wird eine 1:10 Verdünnung hergestellt und die Proteinkonzentration bestimmt:
 - Küvette 1: Mischungsverhältnis 1:10; 80 µL Probe Wasch/Elution + 720 µL 20 mM Imidazol.
 - Küvette 2: 800 µL 20 mM Imidazol (Leerwert) zur Nullstellung des Photometers.
- Die optische Dichte (Absorption) der 1:10-verdünnten Probe wird mittels Photometer bei 280 nm gegen 20 mM Imidazol (Leerwert/Blindprobe) gemessen.

Ergebnis der Messung: **OD₂₈₀ = 0,1106** E/mL (Rohdaten siehe Anlage 1, Seite 3).

Gesamtprotein in Fraktion Wasch/Elution: $0,1106 \text{ E/mL} \times 10 \times 65 \text{ mL} = \mathbf{71,89 \text{ E}}$.

- Bei $t = 118 \text{ min.}$ wird auf **Elutionspuffer** (200 mM Imidazol) umgestellt, welcher das Targetprotein-Avi-Bi-H6 eluiert;
Einstellung Pumpe: 40% 500 mM Imidazol.

→ **Endvolumen 13 mL** (Eluat).

- Von der Fraktion Elution (200 mM Imidazol) wird eine 1:10 Verdünnung hergestellt und die Proteinkonzentration bestimmt:

→ Küvette 1: Mischungsverhältnis 1:10; 80 μL Probe Wasch/Elution + 720 μL 200 mM Imidazol.

→ Küvette 2: 800 μL 200 mM Imidazol (Leerwert) zur Nullstellung des Photometers.

- Die optische Dichte (Absorption) der 1:10-verdünnten Probe wird mittels Photometer bei 280 nm gegen 200 mM Imidazol (Leerwert/Blindprobe) gemessen.

Ergebnis der Messung: $\text{OD}_{280} = \mathbf{0,0853 \text{ E/mL}}$ (Rohdaten siehe Anlage 1, Seite 4).

Gesamtprotein in Fraktion Wasch/Elution: $0,0853 \text{ E/mL} \times 10 \times 13 \text{ mL} = \mathbf{11,089 \text{ E}}$.

- Bei $t = 217 \text{ min.}$ wird auf Wasch-/ Elutionspuffer (500 mM Imidazol) umgestellt, um die Säule zu reinigen; Einstellung Pumpe: 100% 500 mM Imidazol.

Bilanz:

SPEE-Avi-Bi-H6	E 280 nm	Volumen [mL]	Summe E	% vom Auftrag
Auftrag	0,4571	21	191,98	100 %
Durchlauf	0,1462	45	131,58	68,54 %
Imidazol 20 mM	0,1106	65	71,89	37,45 %
Imidazol 200 mM	0,0853	13	11,089	5,78 %

4.3 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay:

- Es wurde ein Gemisch aus 50 mL BCA™ Protein Assay Reagent A und 1 mL BCA™ Protein Assay Reagent B (blauer Farbstoff) hergestellt.
- Jeweils 100 µL der Proben Auftrag, Durchlauf, Imidazol 20 mM und Imidazol 200 mM (Eluat) wurden mit 2 mL des Working Reagents versetzt. Der Ansatz wurde doppelt angesetzt.
- Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 37°C inkubiert und daraufhin abgekühlt.
- Schließlich wurden die Proben im Photometer gegen einen entsprechend behandelten Leerwert bei 562 nm gemessen.
- Eine Standardkurve mit BSA wurde erstellt und anhand dieser und einem Excel-Programm die Proteinkonzentrationen der Proben Auftrag, Durchlauf, Imidazol 20 mM und Imidazol 200 mM (Eluat) ermittelt (Messergebnisse siehe Anlage 2).

Der BCA-Assay wurde gemäß Instruction-Manual von Pierce durchgeführt. Details zur Vorgehensweise siehe **PIERCE BCA™ Protein Assay Kit, No. 23225, 23227.**

4.4 Reinheitsüberprüfung mittels SDS-Page:

Bemerkungen:

- Die Proben werden sowohl nicht-reduziert, als auch reduziert (50 mM DTT Endkonzentration) hergestellt.
- Es wird ein Gradienten-Gel (4-12 %) verwendet.

- Auftrag und Durchlauf werden ausgehend von ihrer Extinktion bei 280 nm ad 6 OD, die Imidazol-Eluate ad 1 OD in Ni-Chelat-Auftragspuffer 1:2 verdünnt.
- Anschließend werden je 20 µL vom Auftrag/Durchlauf/Imidazol/Eluat mit 20 µL SDS Sample Buffer (sowohl mit als auch ohne DTT) weiter verdünnt.
- Es wird bei 95° C 10 min. lang erhitzt und das entstandene Kondenswasser durch Zentrifugieren wieder der Lösung zugeführt.

- Es wird ein Laufpuffer hergestellt (25 mL SDS-Laufpuffer + 475 mL H₂O).
- Die Taschen des Gels werden gespült und anschließend wie folgt befüllt:
 - 15 µL Mark 12™ Unstained Standard.
 - je 20 µL (nicht reduziert) Auftrag/Durchlauf/Imidazol (20 mM)/Eluat.
 - 20 µL Probenpuffer ohne Reduktionsmittel.
 - je 20 µL (reduziert) Auftrag/Durchlauf/Imidazol (20 mM)/Eluat.
- Nach der durchgeführten Elektrophorese wird das angefertigte Gel 10 min. in Fixierungslösung (40 mL H₂O/50 mL Methanol/10 mL Essigsäure) eingelegt.
- Das Gel wird zur Anfärbung erst 15 min. in Lösung (55 mL H₂O/20 mL Methanol/20 mL Stainer A) eingelegt und anschließend mit 5 mL Stainer B angefärbt (Coomassie-blau).
- Das Gel wird in Wasser entfärbt und später getrocknet (siehe Anlage 3, Seite 1).

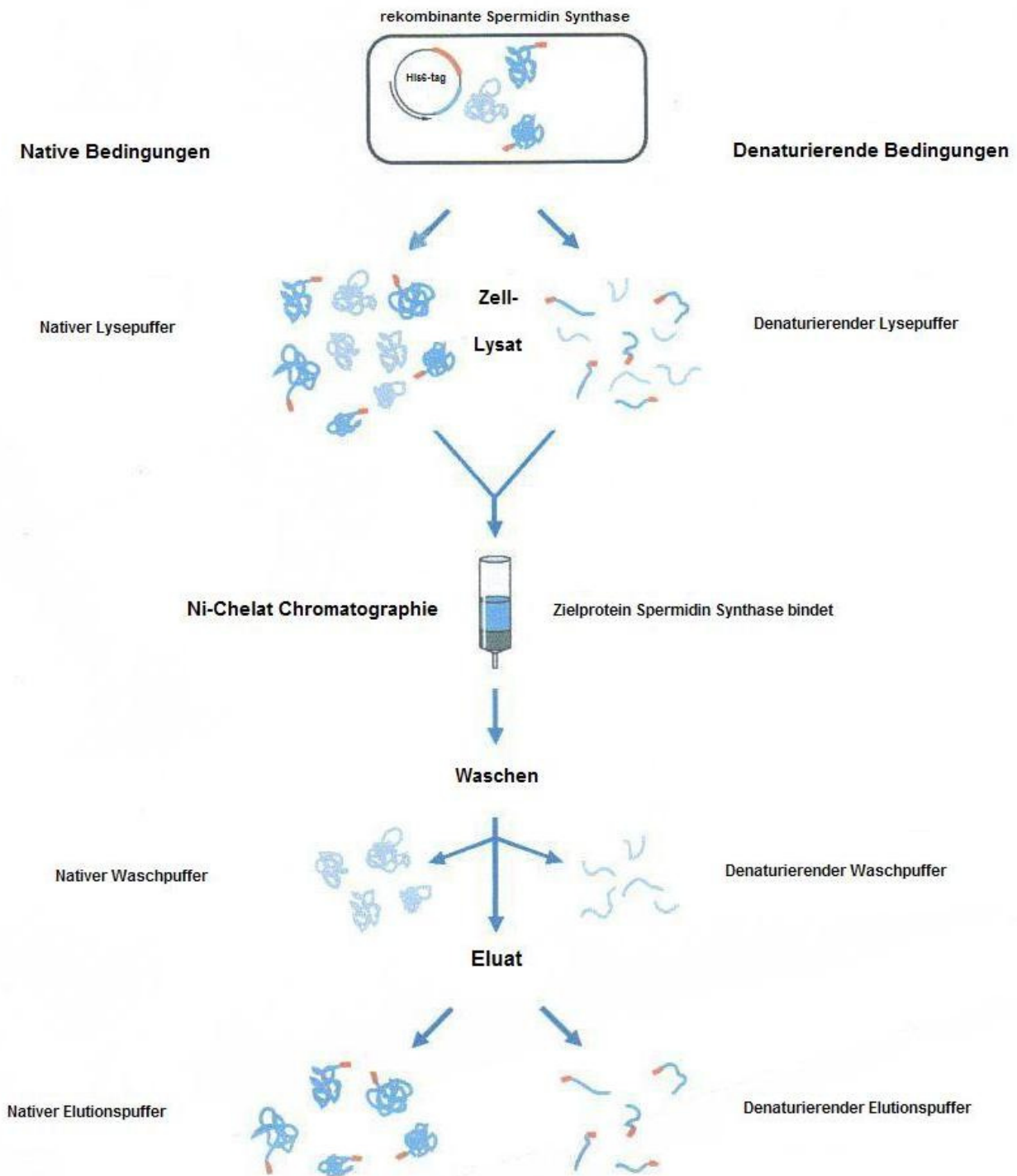


Abb.1 – Prozessschema der Reinigung von rekombinant hergestellter Spermidin Synthase (Avitag (Biotin)-His6-Fusionsprotein) mittels Ni-Chelat Chromatographie (Wurde gemäß der im Protokoll beschriebenen Methode nur unter nativen Bedingungen durchgeführt).