

Expression und Charakterisierung von humanem Plasminogen und verschiedener Domänen in *E. coli* und *P. pastoris*

Inauguraldissertation
der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von
Cédric Invernizzi
von Stein AG

Leiter der Arbeit:
PD Dr. J. Schaller
Departement für Chemie und Biochemie

Expression und Charakterisierung von humanem Plasminogen und verschiedener Domänen in *E. coli* und *P. pastoris*

Inauguraldissertation
der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bern

vorgelegt von
Cédric Invernizzi
von Stein AG

Leiter der Arbeit:
PD Dr. J. Schaller
Departement für Chemie und Biochemie

Von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät angenommen.

Bern, den 5. Dezember 2003

Der Dekan:

Prof. Dr. G. Jäger

Für meine Eltern

und für Rita

Danke

Die vorliegende Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung (SNF) sowie dem Kanton Bern unterstützt und unter der Leitung von PD Dr. J. Schaller am Departement für Chemie und Biochemie (DCB) an der Universität Bern vom April 2000 bis Dezember 2003 durchgeführt.

Ein grosses Danke geht an die ganze Forschungsgruppe:

Herrn PD Dr. J. Schaller für die Betreuung der Arbeit und die Einweihung in die Kunst der Massenspektrometrie.

Herrn U. Kämpfer für die praktischen Tipps sowie die tiefgreifenden Erkenntnisse und Erleuchtungen in der Proteinanalytik.

Herrn Dr. P. Frank für die interessanten Diskussionen und für die beharrliche Suche nach dem effektivsten Säulensystem, das die Welt je erblickte.

Herrn M. Locher für die zweisamen Stunden am Fluoreszenzspektrometer und den bioinformatischen Wissensschatz.

Frau M. Schermbach für die Durchforstung der Kataloge vom Ende der Welt, immer auf der Suche nach dem ultimativen Kit.

Herrn A. Schindler und Frau M. Stark für die anregenden Diskussionen und die perfekten Messresultate.

Weiter möchte ich ganz herzlich folgenden Personen danken:

Prof. Dr. M. Llinás, Prof. Dr. A. Boschetti, Prof. Dr. C. Kempf,
Dr. F. Käsermann, T. Roten, K. Schmid, M. Stadler

und

(-: R. Schildknecht ;-)

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mich IMMER unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Plasminogen: Vorkommen und Funktionen	1
1.1.1 Eigenschaften der Immunabwehr	1
1.1.2 Die Hämostase	1
1.1.3 Die Blutkoagulation	2
1.1.4 Das Plasminogensystem	5
1.1.5 Zellinvasion, Metastasierung und Angiogenese	7
1.1.6 Übertragbare spongiforme Encephalopathien (TSE)	8
1.2 Plasminogen: Struktur	10
1.2.1 Allgemeine Merkmale	10
1.2.2 Das N-terminale Peptid	13
1.2.3 Die Kringel	14
1.2.4 Die Serinprotease	16
1.2.5 Der α_2 -Plasmininhibitor	18
1.3 Expressionssysteme: <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i>	19
1.3.1 <i>E. coli</i> : Expression in BL21(DE3)	20
1.3.2 <i>E. coli</i> : Expression in M15[pREP4] und SG13009[pREP4]	20
1.3.3 <i>P. pastoris</i> : Expression in GS115 und KM71	21
1.4 Zielsetzung	23
2 <i>E. coli</i>: Material und Methoden	24
2.1 Molekularbiologie	24
2.1.1 Material	24
2.1.1.1 Bakterienstämme	24
2.1.1.2 Nährmedien	24
2.1.1.3 Antibiotika	25
2.1.1.4 Plasmide	25
2.1.1.5 Enzyme	26
2.1.1.6 Marker	26
2.1.1.7 Primer	26
2.1.1.8 Kits	26
2.1.1.9 Reagenzien, Lösungen und Puffer	27
2.1.1.10 Geräte	27
2.1.2 Methoden	27
2.1.2.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> und deren Sequenzierung	27
2.1.2.2 DNA mit Restriktionsenzymen verdauen	28
2.1.2.3 DNA-Isolation aus Agarosegelen	28
2.1.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.1.2.5 Dephosphorylieren von DNA mit „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP)	29
2.1.2.6 DNA ligieren mit T4 DNA Ligase	29

2.1.2.7	<i>Transformation kompetenter E. coli Zellen</i>	29
2.1.2.7.1	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	29
2.1.2.7.2	Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> Zellen	30
2.1.2.8	<i>Expression in E. coli Zellen</i>	30
2.1.2.8.1	Expression in 100 ml LB Medium	30
2.1.2.8.2	Expression in 2 l LB Medium	31
2.1.2.8.3	Expression in 6 l ¹⁵ N-M9 Medium	31
2.2	Proteinchemie	31
2.2.1	Material	31
2.2.1.1	<i>Antikörper</i>	31
2.2.1.2	<i>Marker</i>	31
2.2.1.3	<i>Kits</i>	31
2.2.1.4	<i>Reagenzien, Lösungen und Puffer</i>	32
2.2.1.5	<i>Geräte</i>	33
2.2.2	Methoden	34
2.2.2.1	<i>Aufschluss der Zellen</i>	34
2.2.2.1.1	Denaturierender Zellaufschluss von 10 ml Proben aus Kleinansätzen	34
2.2.2.1.2	Denaturierender Zellaufschluss von Grossansätzen	34
2.2.2.1.3	Nativer Zellaufschluss	34
2.2.2.2	<i>Metallchelataffinitätschromatographie</i>	34
2.2.2.2.1	Binden von Ni ²⁺ -Ionen an chelatbildende Matrizen	34
2.2.2.2.2	pH-abhängige Proteinreinigung mittels Ni-Affinität	35
2.2.2.2.3	Rückfaltende Proteinreinigung mittels Ni-Affinität	36
2.2.2.2.4	Native Proteinreinigung mittels Ni-Affinität	36
2.2.2.3	<i>Affinitätschromatographie auf Lysin-Bio-Gel</i>	36
2.2.2.3.1	Herstellung von Lysin-Bio-Gel	36
2.2.2.3.2	Proteinreinigung mittels Lysinaffinität	37
2.2.2.4	<i>In vitro Transkription / Translation</i>	37
2.2.2.5	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	38
2.2.2.6	<i>Blotten der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen</i>	38
2.2.2.7	<i>Immunnachweis auf PVDF-Membranen mit ECL Plus</i>	38
2.2.2.8	<i>Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)</i>	39
2.2.2.9	<i>Aminosäureanalyse von Proteinen</i>	39
2.2.2.10	<i>Sequenzierung von Proteinen nach Edman</i>	40
2.2.2.11	<i>Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)</i>	41
2.2.2.12	<i>Fluoreszenzspektroskopie</i>	41
3	<i>P. pastoris</i>: Material und Methoden	42
3.1	Molekularbiologie	42
3.1.1	Material	42
3.1.1.1	<i>Bakterien- und Hefestämme</i>	42
3.1.1.2	<i>Nährmedien</i>	42
3.1.1.3	<i>Antibiotika</i>	44
3.1.1.4	<i>Plasmide</i>	44
3.1.1.5	<i>Enzyme</i>	44
3.1.1.6	<i>Primer</i>	44
3.1.1.7	<i>Kits</i>	45
3.1.1.8	<i>Reagenzien, Lösungen und Puffer</i>	45
3.1.1.9	<i>Geräte</i>	46
3.1.2	Methoden	46
3.1.2.1	<i>DNA mit Restriktionsenzymen verdauen</i>	46
3.1.2.2	<i>DNA-Isolation aus Agarosegelen</i>	46

3.1.2.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	47
3.1.2.3.1	PCR für die Inserts InNK15 und ExNK15.....	47
3.1.2.3.2	PCR für die Inserts InhPg und ExhPg.....	48
3.1.2.4	<i>DNA phosphorylieren, dephosphorylieren und ligieren</i>	48
3.1.2.5	<i>Transformation von One Shot® TOP10F' Competent Cells</i>	49
3.1.2.6	<i>Transformation von P. pastoris Zellen mit dem Pichia Spheroplast Module</i>	49
3.1.2.6.1	„Spheroplasting“ von P. pastoris Zellen.....	49
3.1.2.6.2	Transformation der Spheroplasten.....	50
3.1.2.7	<i>Selektion der transformierten P. pastoris Zellen</i>	50
3.1.2.8	<i>Isolation genomischer DNA aus P. pastoris Zellen</i>	51
3.1.2.9	<i>Expression in P. pastoris Zellen</i>	51
3.1.2.9.1	Expression von Mut ⁺ -Stämmen im Kleinansatz.....	51
3.1.2.9.2	Expression von Mut ^S -Stämmen im Kleinansatz.....	51
3.1.2.9.3	Expression von Mut ⁺ -Stämmen im Grossansatz.....	51
3.1.2.9.4	Expression von Mut ^S -Stämmen im Grossansatz.....	52
3.2	Proteinchemie	52
3.2.1	Material	52
3.2.1.1	<i>Marker</i>	52
3.2.1.2	<i>Reagenzien, Lösungen und Puffer</i>	52
3.2.2	Methoden	52
3.2.2.1	<i>Probenvorbereitung für SDS-PAGE</i>	52
3.2.2.1.1	Probenvorbereitung der Pellets aus 1 ml Kultur.....	52
3.2.2.1.2	Probenvorbereitung der Überstände aus 1 ml Kultur.....	53
3.2.2.2	<i>Vorbereitung für Lysin-Bio-Gel-Säule</i>	53
3.2.2.2.1	Vorbereitung der Pellets aus Grosskulturen.....	53
3.2.2.2.2	Vorbereitung der Überstände aus Grosskulturen.....	53
3.2.2.3	<i>Immunnachweis auf PVDF-Membranen mit ECL Plus</i>	53
4	E. coli: Resultate	54
4.1	NK15 und K15 in pQE-8 und pET-9a	54
4.1.1	Molekularbiologie	55
4.1.1.1	<i>PCR</i>	55
4.1.1.2	<i>Ligation und Transformation</i>	55
4.1.2	Proteinchemie	56
4.1.2.1	<i>Expression im Kleinansatz</i>	56
4.1.2.2	<i>Expression im Grossansatz</i>	57
4.1.2.3	<i>Versuche zur Optimierung der Isolationsmethoden</i>	60
4.1.2.4	<i>Analyse von HXNK15 aus dem besten Grossansatz</i>	61
4.1.2.5	<i>Expression mit in vitro Transkriptions- / Translationssystemen</i>	64
4.2	NK1 in pQE-8	65
4.2.1	Expression von ¹⁵ N-markiertem NK1.....	65
4.1.2	Bestimmung der Bindungskonstanten.....	67
5	P. pastoris: Resultate	70
5.1	NK15 in pPIC3.5K und pPIC9K	70
5.1.1	Molekularbiologie	71
5.1.1.1	<i>PCR</i>	71
5.1.1.2	<i>Ligation und Transformation in E. coli</i>	72
5.1.1.3	<i>Transformation und Selektion in P. pastoris</i>	73
5.1.2	Proteinchemie	75
5.1.2.1	<i>Expression im Kleinansatz</i>	75

5.2	hPg in pPIC3.5K und pPIC9K.....	77
5.2.1	Molekularbiologie	78
5.2.1.1	PCR	78
5.2.1.2	Ligation und Transformation in <i>E. coli</i>	80
5.2.1.3	Transformation und Selektion in <i>P. pastoris</i>	81
5.2.2	Proteinchemie	82
5.2.2.1	Expression im Kleinansatz	82
5.2.2.2	Expression im Grossansatz	85
5.3	Expression von NK1, NK13 und K45	86
6	Diskussion	90
6.1	<i>E. coli</i>	90
6.2	<i>P. pastoris</i>	93
6.3	Vergleich zwischen <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i>	95
6.4	Ausblick	97
7	Zusammenfassung	98
8	Referenzen	100
9	Curriculum Vitae	107

Abkürzungen

6-AHA	6-Aminohexansäure
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS-...	Aminosäure
ATZ	2-Anilino-5-thiazolinon
BMGY	Buffered Glycerol complex Medium
BMMY	Buffered Methanol complex Medium
BSA	Bovine Serum Albumin
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-treitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EK	Enterokinase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
ExHXhPg	Protein: „His-tag“ + Faktor Xa Schnittstelle + hPg (sekretiert)
ExHXNK15	Protein: „His-tag“ + Faktor Xa Schnittstelle + NTP + K1-5 (sekretiert)
ExK45	Protein: K4-5 (sekretiert)
ExNK1	Protein: NTP + K1 (sekretiert)
ExNK13	Protein: NTP + K1-3 (sekretiert)
G418	Geneticin®
Gu-...	Guanidin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
6x-His	Hexahistidin
His ⁺ / His ⁻	Wildtyp bezüglich Histidinoldehydrogenase / Histidinoldehydrogenase-defizient
hPg	humanes Plasminogen
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradishperoxidase
HSEtOH	2-Mercaptoethanol
HXK15	Protein: „His-tag“ + Faktor Xa Schnittstelle + K1-5
HXNK15	Protein: „His-tag“ + Faktor Xa Schnittstelle + NTP + K1-5
InHXhPg	Protein: „His-tag“ + Faktor Xa Schnittstelle + hPg (intrazellulär)
InHXNK15	Protein: „His-tag“ + Faktor Xa Schnittstelle + NTP + K1-5 (intrazellulär)
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
K-HEPES	HEPES, pH mit Kaliumhydroxid eingestellt
K15	Protein: K1-5
KAc	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
λ-DNA	DNA des Phagen Lambda
LB	Luria-Bertani
LBS	Lysinbindungsstelle
MD	Minimal Dextrose
MeOH	Methanol
MgAc ₂	Magnesiumacetat
MM	Minimal Methanol
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mQH ₂ O	milliQ Wasser
Mut ⁺ / Mut ^S	Methanol utilisation wild-type / Methanol utilisation slow
¹⁵ N-M9	M9 Minimalmedium mit ¹⁵ N-Stickstoffquelle
¹⁵ NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid mit ¹⁵ N
Ni-...	Nickel
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NK1	Protein: „His-tag“ + Enterokinase-Schnittstelle + NTP + K1 [Douglas et al. (2002)]
NK15	Protein: NTP + K1-5
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

NTP	N-terminales Peptid (des humanen Plasminogens)
OD	Optische Dichte
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBST	Phosphate Buffered Saline Tween 20
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pg	Plasminogen
PITC	Phenylisothiocyanat
PNK	Phosphonucleotidkinase
PTC	Phenylthiocarbamyl
PTH	Phenylthiohydantoin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RD	Regeneration Dextrose
RDB	RD mit Agar
RDH	Regeneration Dextrose Histidine
RDHB	RDH mit Agar
RP-HPLC	Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SLB	Super Luria-Bertani
SDS	Natriumdodecylsulfat
sH ₂ O	steriles milliQ Wasser
SOC	SOB Medium mit Glucose
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
Thiamin-HCl	Thiaminhydrochlorid (Vitamin B ₁)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
Tris-Ac	Tris(hydroxymethyl)aminomethanacetat
Xa	Faktor Xa (a = aktiviert)
YPD	Yeast (extract) Peptone Dextrose
YPD-G418	Yeast (extract) Peptone Dextrose mit G418 (Geneticin®)
YT	Yeast Tryptone

1 Einleitung

1.1 Plasminogen: Vorkommen und Funktionen

1.1.1 Eigenschaften der Immunabwehr

Das Immunsystem besteht aus Zellen und Molekülen, die kollektiv und koordiniert auf körperfremde Substanzen reagieren und damit die Immunabwehr bilden. Immunität ist somit eine Reaktion auf Mikroben und fremde Moleküle, ohne weitere nachteilige physiologische oder pathologische Folgen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen angeborener („innate“) und spezifischer („specific“) Immunität. Die angeborene Immunität wird auch als natürliche, die spezifische als adaptive Immunität bezeichnet. Die drei Komponenten der angeborenen Immunität sind physikalische und chemische Schranken, Blutproteine, sowie phagocytische Zellen und andere Leukocyten wie die natürlichen Killerzellen. Zur angeborenen Immunität, welche nur begrenzt Mikroben zu unterscheiden vermag und eher stereotypischer Natur ist, gehören die Hämostase, das Komplementsystem und die phagocytierten Zellen. Sie ist wichtig bei Verletzungen sowie in der ersten Phase einer Infektion und kann die spezifische Immunabwehr auslösen. Die spezifische Immunität setzt sich aus Lymphocyten und deren Produkten, den sogenannten Antikörpern, zusammen. Sie zeichnet sich durch eine ausserordentliche Spezifität für genau bestimmte Moleküle aus, kann auf mehrere Arten auf verschiedene Mikroben reagieren und hat die Fähigkeit sich zu „erinnern“, die sogenannte immunologische Erinnerung, was eine schnellere und intensivere Immunantwort auf sich wiederholende Infektionen mit den selben Mikroben zur Folge hat. Die Eigenschaften der angeborenen und spezifischen Immunität sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst [Abbas *et al.* (1997)].

Tabelle 1.1: Eigenschaften der angeborenen und spezifischen Immunität

	<u>Angeborene Immunität</u>	<u>Spezifische Immunität</u>
Spezifität gegen Mikroben:	Relativ schwach	Hoch
Mannigfaltigkeit:	Limitiert	Gross
Spezialisierung:	Relativ stereotypisch	Hoch spezialisiert
Erinnerung:	Nein	Ja
Physikalische & chemische Schranken:	Haut Antimikrobielle Stoffe	Cutanes Immunsystem Sekretierte Antikörper
Blutproteine:	Komplement	Antikörper
Zellen:	Phagocyten Natürliche Killerzellen	B Lymphocyten (humoral) T Lymphocyten (zell-vermittelt)

1.1.2 Die Hämostase

Eine Verletzung ist gleichbedeutend mit der Zerstörung einer physikalischen Schranke, womit die angeborene Immunabwehr in Gang gesetzt wird. Die Blutstillung, die sogenannte Hämostase, ist dabei für das Gleichgewicht zwischen dem Gefässsystem und allen Blutzellen, sowie den Plasmaproteinen und den niedermolekularen Stoffen verantwortlich. Demnach muss sie schnell und dennoch streng kontrolliert ablaufen, um weder Thrombosen noch Blutungen auszulösen. Zur Hämostase gehören die Blutplättchenaktivierung, die Blutgerinnung (Blutkoagulation), sowie die Fibrinolyse. Durch das Zerreißen der Endothelschicht der Gefässwand wird subendotheliales Kollagen freigelegt, woran sich die Blutplättchen, auch Thrombocyten genannt, mittels integralen Membranglykoproteinen oder über Verbindungsproteine wie Fibrinectin oder den von Willebrand Faktor anheften können. Die Blutplättchen und die Gefässwand sezernieren im ersten Moment gefässverengende Substanzen, sogenannte Vasokonstriktoren wie Serotonin, ADP und Adrenalin, die damit den Blutfluss verlangsamen und die Thrombusbildung unterstützen. Nach etwa einer Minute werden aber bereits gefässweiternde Substanzen, sogenannte Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid und Bradykinin, ausgeschüttet, die die anfänglichen Reaktionen eindämmen. Durch die Bindung von ausgeschüttetem ADP

an die Thrombocyten werden Ca^{2+} -Ionen aus den dichten Granula in das Cytosol der Blutplättchen ausgeschüttet, die über Calmodulin und Myosin eine Umwandlung der Thrombocyten von der Scheibenform zur globulären Form zur Folge haben. Die Blutplättchen aggregieren schliesslich durch die Bildung von Thrombospondin- und Fibrinogenbrücken, die mittels Thrombin aus der Blutgerinnungskaskade in ein stabiles Fibrin-Thrombocyten-Netzwerk umgewandelt und mittels aktiviertem Faktor XIIIa kovalent quervernetzt werden. An der gerinnungsfördernden Oberfläche binden, mit Hilfe von negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin, verschiedene Faktoren, die ein Fortschreiten der Gerinnung sichern. Inhibitoren, wie Prostacyclin I_2 / D_2 und ADP-abbauende Nucleotidase, die einer übermässigen Blutplättchenaktivierung entgegenreten, werden von intakten Endothelzellen ausgeschüttet und führen zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Dies bewirkt eine Verlagerung der Ca^{2+} -Ionen in intrazelluläre Speicher, womit die Calcium-abhängigen Vorgänge blockiert werden und sich somit ein Gleichgewicht wieder einstellen kann [Michal (1999)].

1.1.3 Die Blutkoagulation

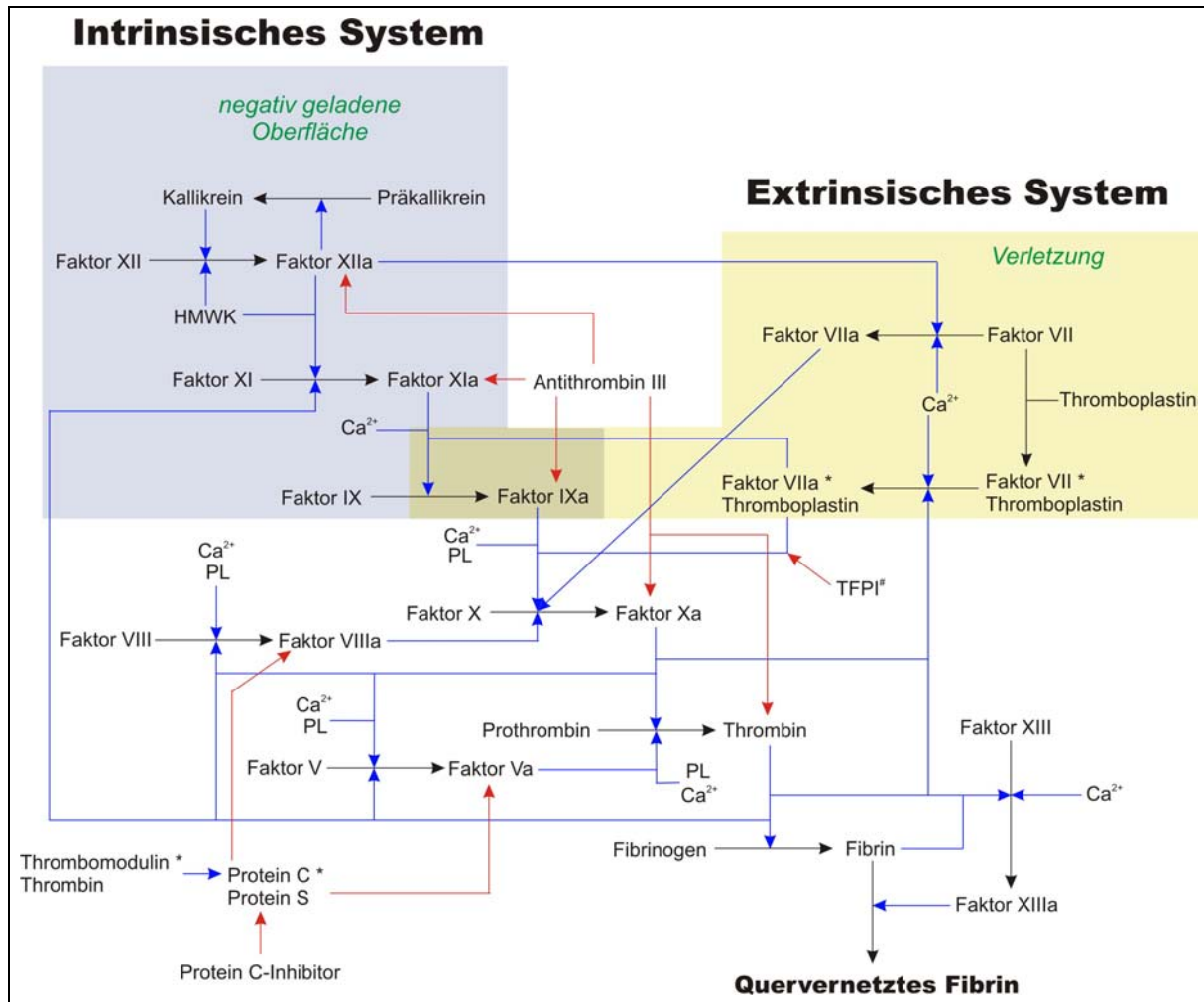
Grundsätzlich gibt es zwei Ereignisse, die die Blutgerinnung, auch als Blutkoagulation bekannt, auslösen können: durch Zugabe von Thromboplastin („tissue factor“) zu Blut wird der sogenannte extrinsische Reaktionsweg eingeschlagen, während durch Kontaktaktivierung der sogenannte intrinsische Reaktionsweg ausgelöst wird. *In vitro* lassen sich die beiden Aktivierungswege unterscheiden, *in vivo* hingegen sind die beiden Systeme eng miteinander verknüpft und laufen praktisch gleichzeitig ab. Dabei ist der extrinsische Reaktionsweg von grosser Bedeutung im Auslösen der Blutgerinnung, während der intrinsische Reaktionsweg wichtig für die weitere Bildung von Fibrin ist. Weil Defekte des ersten intrinsischen Faktors XII im Menschen nicht zu Blutungen führen, wird die Fibrinbildung allerdings kaum über diesen Faktor eingeleitet, sondern vielmehr über eine rückgekoppelte Aktivierung des Faktors XI durch bereits gebildetes Thrombin aus dem extrinsischen Reaktionsweg. Die ursprüngliche Vorstellung zweier unabhängiger Aktivierungskaskaden von Serinproteasen muss heute wohl revidiert werden. Insofern als die beiden Systeme stark vernetzt sind und gegenseitige Rückkopplungsmechanismen aktivierend oder inhibierend auf die Blutkoagulation wirken, funktionieren sie *in vivo* als ein einziges System [Davie *et al.* (1991)].

Eine vereinfachte Darstellung der Blutgerinnung ist in Figur 1.1 zu finden, nähere Angaben zu den einzelnen Faktoren sind in Tabelle 1.2 dargestellt, von denen 6 Vitamin K-abhängig sind: Faktor II, Faktor VII, Faktor IX, Faktor X, Protein C und Protein S. Durch Vitamin K werden bestimmte Glutamate am C_γ carboxyliert, womit γ -Carboxyglutamat (Gla) entsteht, welches Ca^{2+} -Ionen komplexieren kann, die für die einzelnen Reaktionen sehr wichtig sind. Eine K-Avitaminose oder die Verwendung von Vitamin K-Antagonisten verhindern die Reaktionen und können zu gefährlichen Blutungen führen [Michal (1999); Rodak (1995)].

Tabelle 1.2: Faktoren der Blutgerinnung

Faktor	Name ¹	Wirkung auf	Plasmakonzentration	Grösse ²
I	Fibrinogen	XI, XIII, PK	2000 - 4000 mg/l	340 kDa
II	Prothrombin	I, V, VIII, XIII, XIV	100 mg/l	72 kDa
III	Thromboplastin	VII	0 mg/l	45 kDa
IV	Ca^{2+}	diverse	80 ng/l	40 Da
V	Proaccelerin	X	5 mg/l	330 kDa
VII	Prokonvertin	IX, X	0.5 mg/l	50 kDa
VIII	Antihämophiler Faktor	IX	0.2 mg/l	285 kDa
IX	Christmas Faktor	X, VII	5 mg/l	57 kDa
X	Stuart Faktor	II, V, VII, VIII	10 mg/l	59 kDa
XI	Thromboplastin Antezedent	IX	5 mg/l	160 kDa
XII	Hageman Faktor	PK, XI, VII	30 mg/l	80 kDa
XIII	Transglutaminase	I	30 mg/l	320 kDa
XIV	Protein C	V, VIII	5 mg/l	62 kDa
PS	Protein S	XIV	20 mg/l	75 kDa
PK	Plasma Kallikrein	XII, HK	50 mg/l	86 kDa
HK	Hochmolekulares Kininogen	PK, XI	80 mg/l	110 kDa
PL	Phospholipid	diverse	0 mg/l	x100 Da

1: Eines der vielen Synonyme wurde verwendet. 2: Abschätzung aus SDS-PAGE Analyse ausser IV und PL.



Figur 1.1: Vereinfachte schematische Darstellung der Blutkoagulation. Gräulicher Hintergrund: Intrinsisches System mit dem Kontakt zu einer negativ geladenen Oberfläche als Auslöser der Blutgerinnung (Kontaktaktivierung). Gelblicher Hintergrund: Extrinsisches System mit Thromboplastin als Auslöser der Blutgerinnung (Thromboplastinaktivierung). Die untere Hälfte entspricht dem üblichen Reaktionsweg der Blutkoagulation, der von beiden Systemen benutzt wird. Schwarze Pfeile: X reagiert und wird zu Y. Blaue Pfeile: Aktivierung / Katalyse der entsprechenden Reaktion. Rote Pfeile: Inhibition oder Degradation des jeweiligen Proteins. *: X im Komplex mit Y. HMWK: Hochmolekulares Kininogen. PL: Phospholipide. TFPI: "tissue factor pathway inhibitor" auch bekannt als Lipoprotein-assoziiierter Koagulationsinhibitor (LACI). #: TFPI inhibiert nur den Faktor VIIa-Thromboplastin-Faktor X-Komplex nicht jedoch jenen Komplex mit Faktor IX.

Im extrinsischen System wird Thromboplastin als Auslöser der Blutkoagulation benötigt, welches als integrales Membranprotein an der Gefäßwand-abgewandten Oberfläche der Endothelzellen mit Phospholipid assoziiert vorkommt und eine hohe Affinität für Faktor VII des Blutplasmas besitzt. Demnach bilden Thromboplastin und das in den Hepatocyten synthetisierte Zymogen Faktor VII einen Komplex in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen, woraus in einem autokatalytischen Prozess die aktive Serinprotease Faktor VIIa gebildet wird. Die Autokatalyse wird mit Hilfe von Spuren an vorhandenem Faktor VIIa initiiert, womit die rasche Produktion an grossen Mengen Faktor VIIa gewährleistet ist [Yamamoto *et al.* (1992); Nakagaki *et al.* (1991)]. Im weiteren Verlauf wirken Faktor Xa, Thrombin (Faktor IIa) und Faktor IXa fördernd auf die Konvertierung zu aktivem Faktor VIIa-Thromboplastin-Komplex, welcher seinerseits auf der Membranoberfläche Faktor X zur aktiven Serinprotease Faktor Xa prozessiert. In Plasma zirkulierender Faktor V wird durch Faktor Xa und später auch durch Thrombin zum aktiven Faktor Va geschnitten und assoziiert unter mithilfe von Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden auf der Membranoberfläche mit Faktor Xa und Prothrombin zum sogenannten Prothrombinase-Komplex [Tracy *et al.* (1981)]. Dabei bleibt der N-terminale Teil des Prothrombins am Phospholipid hängen und die C-terminale Serinprotease Thrombin wird freigesetzt, welche Fibrinogen zu Fibrin verdaut.

Fibrinogen ist aus 3 verschiedenen Kettenarten aufgebaut, die als α -, β - und γ -Ketten bezeichnet werden (Figur 1.3). Die drei Ketten sind miteinander verdreht und bilden mit einer zweiten identischen

Kettenstruktur des Fibrinogens, welches mit 29 Disulfidbrücken zusammengehalten wird. Thrombin spaltet je 2 N-terminale Peptide der α - und β -Ketten ab, die sogenannten Fibrinopeptide A und B. Die Fibrinmoleküle sind nun polymerisationsfähig, wobei die neuen α - und β -Ketten-Termini an die sogenannte D-Domäne der verschiedenen nächstgelegenen Fibrinmonomere binden und somit ein unlöslicher Fibrinpfropf entsteht [Laudano und Doolittle (1980); Blomback und Blomback (1972)]. Die Generierung von Fibrin stimuliert die Aktivierung von Faktor XIII durch Thrombin zur Transglutaminase, die zwischen α - und γ -Ketten zweier benachbarter Fibrinmonomeren Isopeptidbindungen (ϵ -(γ -Glutamyl)lysyl-Bindungen) produziert und damit den ganzen Fibrinpfropf kovalent quervernetzt [Folk und Finlayson (1977)]. Zusätzlich werden Fibronectin und α_2 -Plasmininhibitor miteingebaut, letzteres um den Abbau des Fibrins durch Plasmin zu verhindern, wie später noch beschrieben.

Wenn wenig Thromboplastin vorhanden ist, wird vom Faktor VIIa-Thromboplastin-Komplex vermehrt Faktor IX statt Faktor X aktiviert, da die K_m - und v_{max} -Werte beider Aktivierungsreaktionen mit der Konzentration an Thromboplastin variieren [Komiya *et al.* (1990)]. Faktor VIII zirkuliert im Plasma als Komplex mit dem von Willebrand Faktor und wird nach Aktivierung durch Faktor Xa oder Thrombin zu Faktor VIIIa, der Ca^{2+} -Ionen- und Phospholipid-abhängig an Membranen bindet [Eaton *et al.* (1986)]. Die auf der Zelloberfläche generierte Serinprotease Faktor IXa bindet an Faktor VIIIa und vermag dort Faktor X, im sogenannten Tenase-Komplex, in die aktive Form zu spalten. Dieser mögliche Weg über Faktor IX trägt zur Wichtigkeit des extrinsischen Systems wesentlich bei, da aus früheren Studien die Faktor IX-Aktivierung nur dem intrinsischen System zuerkannt wurde.

Aufgrund des im Plasma vorkommenden Lipoprotein-assoziierten Koagulationsinhibitors (LACI, auch TFPI „tissue factor pathway inhibitor“ genannt) scheint das extrinsische System aber nur kurzlebig zu sein, weil er den Faktor VIIa-Thromboplastin-Faktor Xa-Komplex bindet und hemmt [Broze, Jr. *et al.* (1990)]. Dennoch ist es möglich über das extrinsische System den Weg über die Faktor IX-Aktivierung einzuschlagen, um die Blutkoagulation voranzutreiben. Aber das intrinsische System scheint hier zunehmend wichtiger zu werden, weil Faktor XI durch entstehendes Thrombin aktiviert wird [Naito und Fujikawa (1991)]. Die Prozessierung läuft Ca^{2+} -Ionen- und Phospholipid-abhängig ab, indem hochmolekulares Kininogen den Faktor XI an die Membran bindet, und führt zur Bildung der Serinprotease Faktor XIa als Homodimer. Die Prozessierung von Faktor IX durch Faktor XIa unter Mitwirkung von Ca^{2+} -Ionen, sowie die Reaktion von Thrombin mit Fibrinogen, sind die einzigen Reaktionen der Blutkoagulationskaskade, die frei im Plasma ablaufen [Di Scipio *et al.* (1978)]. Faktor IXa kann anschließend wie oben beschrieben im Tenase-Komplex seine Wirkung entfalten.

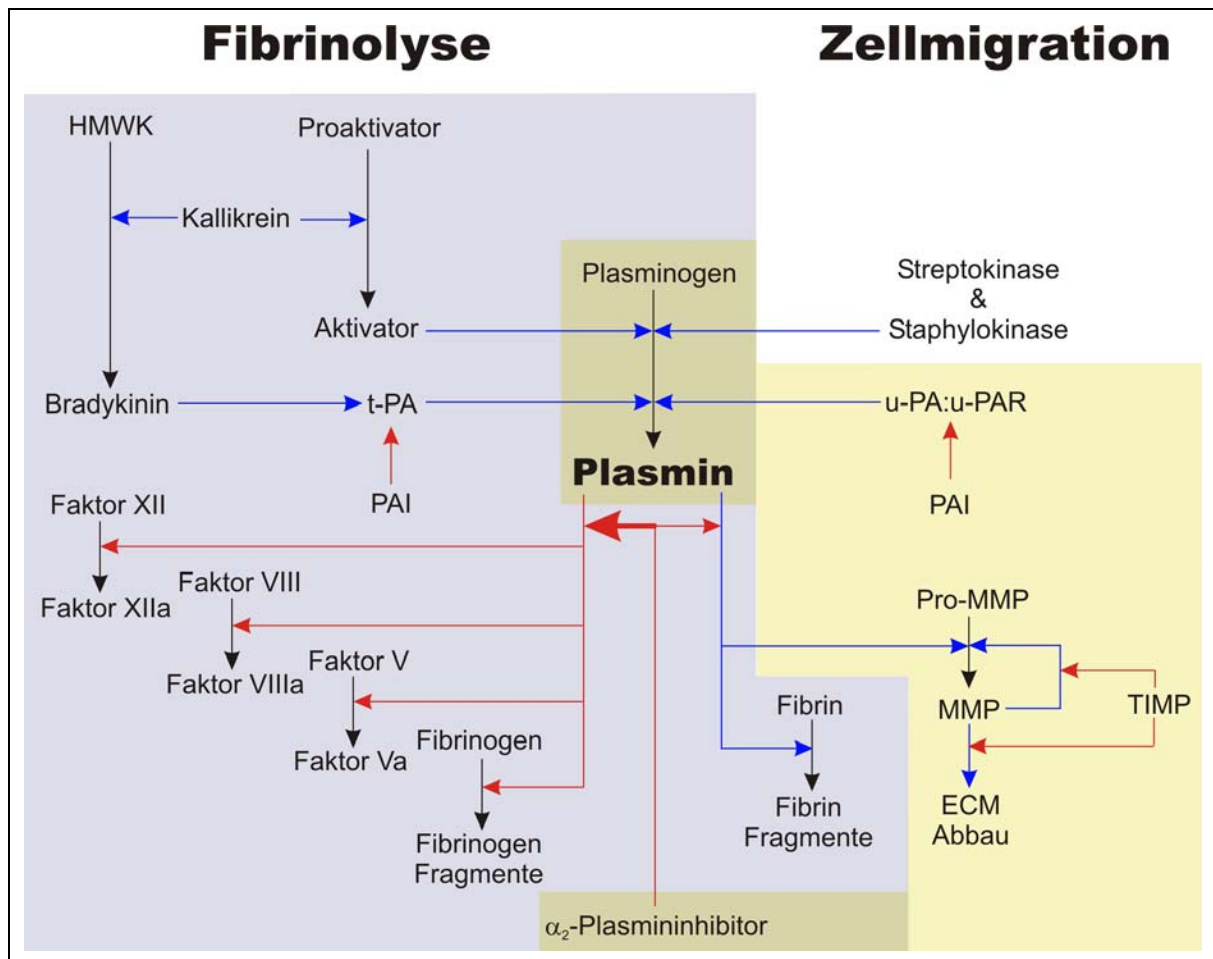
Die Aktivierung von Faktor XI durch Faktor XIIa scheint nur *in vitro* von grösserer Bedeutung zu sein, denn im Menschen führen Defekte an Faktor XII zu keinen nennenswerten Problemen, hingegen wirken sich Faktor XI Defekte schwerwiegend auf die Blutgerinnung aus. Trotzdem kann der intrinsische Reaktionsweg über Faktor XII, welcher im Zusammenwirken mit hochmolekularem Kininogen und Präkallikrein aktiviert werden kann, im Falle einer Kontaktaktivierung durch beispielsweise eine künstliche Herzklappe wichtig sein [Davie *et al.* (1991)]. Zudem aktiviert Faktor XIIa direkt den Faktor VII zu Faktor VIIa, ohne dass sich dieser im Komplex mit Thromboplastin befindet und demnach auch nicht von TFPI gehemmt wird. Der entstandene Faktor VIIa kann wie oben beschrieben Faktor X aktivieren und somit das intrinsische System weiter unterstützen [Rodak (1995)].

Nebst dem TFPI sind weitere Inhibitoren der Blutgerinnung im Plasma vorhanden, wie beispielsweise das Serpin Antithrombin III, welches Thrombin, Faktor IXa, Faktor Xa, Faktor XIa und Faktor XIIa hemmt [Kurachi und Davie (1977); Kurachi *et al.* (1976); Rosenberg und Damus (1973)]. Die Wirkung dieses Serinproteaseinhibitors ist nicht besonders schnell, jedoch in Gebieten intakter Endothelzellen, die heparinoide Moleküle auf der Oberfläche präsentieren, ist die Reaktion sehr heftig und verhindert damit eine Ausbreitung der Blutkoagulation. Weitere Inhibitoren sind α_2 -Macroglobulin, sowie die Serpine Heparin-Cofaktor II, C1-Inhibitor, α_1 -Antitrypsin und aktivierter Protein C-Inhibitor. Letzterer inaktiviert Protein C, welches mit Protein S als Cofaktor, die beiden Faktoren Va und VIIIa proteolytisch inaktiviert. Protein C wird nämlich von an Thrombomodulin-komplexiertem Thrombin aktiviert, welches damit vom Prokoagulant zum Antikoagulant umfunktioniert wird. Protein C scheint zudem auch ein Bindeglied zwischen der Blutgerinnung und dem Entzündungssystem (u.a. auch dem Komplementsystem) zu sein [Esmon (1987)].

Das Inhibitionssystem sowie die Limitierung der meisten Reaktionen der Blutkoagulationskaskaden auf die Membranoberflächen des verletzten Gewebes und der aktivierten Blutplättchen verhindert eine Ausbreitung der proteolytischen Aktivitäten über das ganze Blutzirkulationssystem und begrenzt damit die Blutgerinnung genau auf den Ort der ursprünglichen Verletzung. Die verschiedenen Wechselwirkungen (Figur 1.1) zeigen wie komplex und vernetzt die ganze Blutkoagulation ist und dass die einzelnen Abläufe noch besser erforscht werden müssen [Michal (1999); Rodak (1995); Voet und Voet (1995); Loscalzo und Schafer (1994); Tuddenham und Cooper (1994); Davie *et al.* (1991); Davie *et al.* (1979)].

1.1.4 Das Plasminogensystem

Die zum Plasminogensystem gehörende Fibrinolyse, welche in dynamischem Gleichgewicht mit der Blutkoagulation ist, besteht primär aus einer Reaktion zwischen dem quervernetzten Fibrin und der Serinprotease Plasmin (Figur 1.2). Das Zymogen Plasminogen kann dabei von verschiedenen Aktivatoren zu Plasmin prozessiert werden. Grundsätzlich unterscheidet man die Aktivierung durch den gewebsspezifischen Plasminogenaktivator (t-PA) vom Urokinase Plasminogenaktivator (u-PA), doch zusätzlich kann Plasminogen durch Streptokinase oder Staphylokinase über eine pathogene Invasion zu aktivem Plasmin umgewandelt werden. Zudem wurde ein noch nicht weiter charakterisierter Aktivator beschrieben.



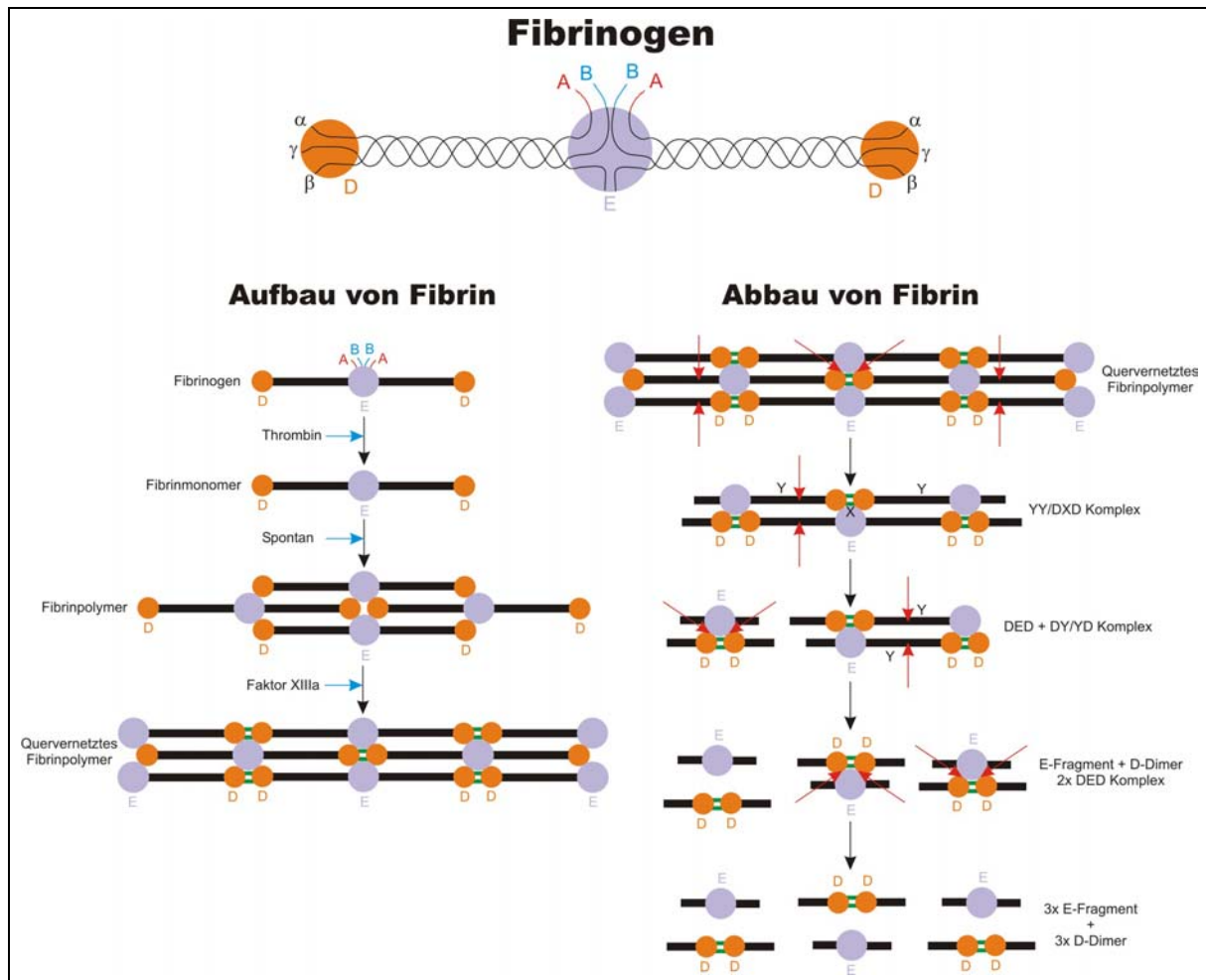
Figur 1.2 Vereinfachte schematische Darstellung des Plasminogensystems. Gräulicher Hintergrund: Fibrinolyse. Gelblicher Hintergrund: Zellmigrationssystem. Schwarze Pfeile: X reagiert und wird zu Y. Blaue Pfeile: Aktivierung / Katalyse der entsprechenden Reaktion. Rote Pfeile: Inhibition oder Degradation des jeweiligen Proteins. Roter dicker Pfeil von α_2 -Plasmininhibitor: Schnelle Inhibition (0.1 Sekunden). Roter dünner Pfeil von α_2 -Plasmininhibitor: Langsame Inhibition (5 Sekunden). HMWK: Hochmolekulares Kininogen. t-PA: Gewebsspezifischer Plasminogenaktivator. u-PA: Urokinase Plasminogenaktivator. u-PAR: u-PA-Rezeptor. PAI: Plasminogenaktivatorinhibitor (mehrere Typen). Pro-MMP: Latente Matrixmetalloproteinasen. MMP: Matrixmetalloproteinasen. TIMP: Gewebeinhibitor von MMP. ECM: Extrazelluläre Matrix.

t-PA und u-PA werden als einkettige Proteine synthetisiert (sc-t-PA und scu-PA) und zu zweikettigen Proteinen prozessiert (tct-PA und tcu-PA). Beide Aktivatoren haben unterschiedliche Rollen in der Plasminogenaktivierung, indem durch t-PA primär Plasmin für den Abbau von Fibrin bereitgestellt wird, während der u-PA für zellmigratorische und gewebsumstrukturierende Prozesse verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang wird u-PA an membrangebundene, zelluläre u-PA Rezeptoren (u-PAR) gebunden, wodurch dort lokal Plasminogen zu Plasmin prozessiert wird, welches seinerseits Matrixmetalloproteinasen (MMPs) in Gang setzt, die die extrazelluläre Matrix abbauen und damit eine Zellwanderung oder eine Neuordnung des Gewebes ermöglichen. Damit scheint die Plasminogenakti-

vierung eine nicht zu unterschätzende Rolle in den Prozessen der Angiogenese und der Metastasebildung von Tumoren (siehe auch Kapitel 1.1.5) zu spielen [Collen (2001)].

Streptokinase bildet einen Komplex mit Plasminogen, welcher andere Plasminogenmoleküle zu Plasmin aktiviert und nicht durch die natürlichen Inhibitoren gehemmt werden kann. Der Komplex unterscheidet nicht zwischen freiem und an Fibrin-gebundenem Plasminogen, womit ein sogenannter „system-lytischer Zustand“ erreicht wird. Staphylokinase bildet ebenfalls einen Komplex mit Plasminogen, der aktivierend auf andere Plasminogenmoleküle wirkt, reagiert aber spezifisch mit Fibrin-gebundenem und kaum mit freiem Plasminogen [Collen (2001)].

Viele dieser Plasminogenaktivatoren werden therapeutisch im Falle von Herzinfarkt oder ähnlichen Krankheiten benutzt. Zur Anwendung kommen Alteplase (rekombinanter t-PA), Reteplase (rekombinanter t-PA mit Deletion), Tenecteplase (rekombinanter t-PA mit mehreren Substitutionen), sowie Streptokinase und Staphylokinase (zum Teil noch in der klinischen Testphase).



Figur 1.3: **Struktur von Fibrinogen - Aufbau und Abbau von Fibrin.** Fibrinogen: Je 2 α-, β-, und γ-Ketten mit D-Domänen (orange) und E-Domäne (lila), sowie den Fibrinopeptiden A (rot) und B (blau). Aufbau von Fibrin: Die blauen Pfeile bezeichnen eine proteolytische Spaltung oder Vernetzung. Abbau von Fibrin: Die roten Pfeile bezeichnen die Stellen proteolytischer Spaltung durch Plasmin.

In der Fibrinolyse, d.h. dem Abbau von quervernetztem Fibrin durch die Serinprotease Plasmin, werden auch Fibrinogen, Faktor Va, Faktor VIIIa und Faktor XIIa, sowie Proteine des Komplementsystems proteolytisch angegriffen und abgebaut. Gestartet wird die Fibrinolyse durch t-PA, der laufend von den Endothelzellen sekretiert wird und über Lysin-bindende Kringelstrukturen an verschiedene Lysinreste von Fibrin bindet [Ritchie *et al.* (2000)]. Damit wird Plasminogen nur in der Nähe von Fibrin durch den t-PA zur aktiven Serinprotease Plasmin umgewandelt und kann seine proteolytische Aktivität auf den Fibrinpfropf entfalten. Überdies wird durch Plasmin der einkettige scu-PA zur zweikettigen, jedoch nicht aktiveren Form tct-PA geschnitten [Michal (1999)].

Ein zweiter Auslöser der Fibrinolyse ist Kallikrein, bekannt aus der Blutkoagulation. Dabei wandelt es einen Proaktivator zu einem aktiven Plasminogenaktivator um, aktiviert den einkettigen scu-PA zum

zweikettigen t-PA und spaltet zudem hochmolekulares Kininogen (HMWK) zu Bradykinin, welches die Freisetzung von weiterem t-PA fördert [Michal (1999)].

Die Zerstörung des quervernetzten Fibrins durch Plasmin (Figur 1.3) setzt als erstes drei sogenannte E-Domänen sowie drei vernetzte D-Domänen frei. Dieses sogenannte YY/DXD-Fragment wird weiter in ein DED- und ein vernetztes DY/YD-Fragment prozessiert. Letzteres wird ebenfalls in zwei DED-Fragmente zerschnitten, die schliesslich von Plasmin zu E-Fragmenten und D-Dimeren abgebaut werden [Rodak (1995)].

Zu Beginn der proteolytischen Reaktion von Plasmin wird die grösste Aktivität auf der Oberfläche des quervernetzten Fibrins beobachtet, die anschliessend immer heftiger wird und nach innen gerichtet ist. Dies wird verständlich durch die Beobachtung, dass Plasmin vorzugsweise nach Lysin schneidet und somit neue C-terminale Lysinreste im Fibrin freisetzt, die, aufgrund der hohen Lysinaffinität von mehreren Kringeln, zusätzliche Bindungsstellen für Plasmin darstellen [Rijken und Sakharov (2001)]. Durch das Binden des Plasmins an die C-terminalen Lysinreste des Fibrins wird die Inhibition durch den α_2 -Plasmininhibitor um das fünfzigfache verlangsamt, nämlich auf etwa 5 Sekunden im Vergleich zu 0.1 Sekunden im Falle von freiem Plasmin im Plasma [Favier *et al.* (2001)]. Demnach wird durch diese Bindung möglicherweise eine Konformation des Plasmins eingenommen, die die katalytische Domäne vor der Inaktivierung durch den α_2 -Plasmininhibitor schützt, womit dem Plasmin eine kurze Zeit bleibt, um Fibrin zu spalten [Collen (2001)].

Das inhibitorische System der Fibrinolyse besteht hauptsächlich aus 4 Proteinen: α_2 -Plasmininhibitor (auch als α_2 -Antiplasmin bekannt), α_2 -Makroglobulin, sowie Plasminogenaktivatorinhibitoren 1 und 2 (PAI-1 und PAI-2) [Rijken und Sakharov (2001)]. Der α_2 -Plasmininhibitor sowie in geringerem Ausmass α_2 -Makroglobulin hemmen Plasmin, während PAI-1 die beiden Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA inhibiert. PAI-1 befindet sich in einer inaktiv-latenten Form im Plasma und wird durch Phospholipide sowie durch Wechselwirkung mit Vitronectin reaktiviert [Montuori *et al.* (2002)]. Eine erhöhte Konzentration an PAI-1 konnte in mehreren Krankheitsbildern nachgewiesen werden, wie beispielsweise in venösen Thromboembolien, Fettleibigkeit und koronar-arteriellen Krankheiten. Zudem zeigte sich, dass die Herzinfarktwahrscheinlichkeit, die um 8 Uhr morgens am höchsten ist, mit der höchsten sich im Tagesverlauf ändernden Konzentration an PAI-1 korreliert [Collen (2001)]. Die Aufgabe von PAI-2 scheint nicht primär die Inhibition der Plasminogenaktivatoren zu sein, denn die Bindungseffizienz an u-PA ist etwa fünfzehnmal geringer als jene von PAI-1. Zudem wird nur ein kleiner Anteil in glykosylierter Form sekretiert und Dickinson *et al.* (1995) konnten einen Schutz von PAI-2 gegen Tumornecrosefaktor- α -induzierte (TNF- α) Apoptose beobachten.

Der Begriff Plasminogensystem wird den oben erläuterten Mechanismen gerechter als der Ausdruck Fibrinolyse, weil damit auch die Zusammenhänge, an welchen Plasminogen sonst noch beteiligt ist, zum Tragen kommen. Die Aufgaben von Plasmin beschränken sich nicht nur auf den Verdau von Fibrin und von Faktoren der Blutkoagulationskaskade sowie der Förderung der Zellmigration, sondern reichen auch hin bis zur Aktivierung verschiedener Proteine des Komplementsystems wie C1, C3 und C5 sowie zur Inaktivierung des C1-Inhibitors. Aus all diesen Beobachtungen wird klar, dass noch viel Forschungstätigkeit nötig ist, um das Plasminogensystem zu verstehen und die Verbindungen zu anderen Systemen deutlicher aufzuzeigen [Collen (2001); Rijken und Sakharov (2001); Michal (1999); Rodak (1995); Voet und Voet (1995); Tuddenham und Cooper (1994); Castellino und Powell (1981)].

1.1.5 Zellinvasion, Metastasierung und Angiogenese

Indem Plasmin Matrixmetalloproteinasen aktiviert, die ihrerseits die extrazelluläre Matrix abbauen, ist das Plasminogensystem auch wichtig für die Zellmigration. Die Matrix besteht aus verschiedensten Proteinen und Polysacchariden, die von den umliegenden Zellen wie Fibroblasten, Mastzellen und Makrophagen sekretiert und in einem grösseren Netzwerk angeordnet werden. Die Hauptbestandteile sind Kollagen, Elastin, Laminin und Fibronectin, sowie Glykosaminoglycane, Proteoglycane und Glykoproteine [Alberts *et al.* (1994)]. Diese Proteine und Polysaccharide werden degradiert, um die Zellmigration zu ermöglichen.

Tumorzellen machen sich bei einer Gewebsinvasion diesen Mechanismus zu Nutzen, der ihnen schliesslich zur Metastasierung verhilft [Moscatelli und Rifkin (1988)]. Damit die Tumorzellen weiter wachsen können, müssen sie mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Durch den Vorgang der Angiogenese werden neue Blutgefässe ausgebildet, indem die Endothelzellen, unter Mitwirkung des u-PA:u-PAR-aktivierten Plasminogens, vom bestehenden Gefässsystem aus in die extrazelluläre Matrix vordringen.

Ein endogener Inhibitor der Angiogenese ist Angiostatin, welches das Wachstum der Endothelzellen hemmt [Folkman (1995); O'Reilly *et al.* (1994)]. Angiostatin entspricht dem Plasminogenfragment Kringel 1 - 4. Es kann auch *in vitro* aus humanem Plasminogen durch limitierte Proteolyse mit Elastase gewonnen werden und hemmt *in vivo* die Angiogenese. Im Gegensatz dazu kann keine angiostatische Wirkung von humanem Plasminogen nachgewiesen werden. Einzelne und kombinierte Kringeldomänen wurden auf ihre angiostatische Wirkung getestet, wobei die beiden Kringel K2 und K3 zusammen die höchste Wirkung zeigten. Da diese beiden Kringel eine viel geringere Affinität zu Lysin haben als dies von Kringel 1 und Kringel 4 der Fall ist, muss angenommen werden, dass die angiostatische Wirkung nichts mit den Lysinbindungsstellen (LBS) zu tun hat [Cao *et al.* (1996)]. Nach Erkenntnissen von Ji *et al.* (1998b) ist das Kringel 1 - 3 Fragment für die Hemmung der Zellproliferation und Kringel 4 für die Inhibition der Zellmigration verantwortlich. Zudem haben Kassam *et al.* (2001) zeigen können, dass Plasmin in einer autoproteolytischen Reaktion inaktiviert wird, wobei ein 61 kDa grosses Fragment entsteht, bestehend aus K1 - 4 von Lysin⁷⁸ bis Lysin⁴⁶⁸. Dieses Plasminfragment zeigt anti-angiogenetische Wirkung wie Angiostatin. Dies würde heissen, dass der normale „Plasmin-durchsatz“ in nicht-pathologischer Umgebung angiostatisch-wirkende Fragmente erzeugt.

Interessanterweise zeigt auch Kringel 5 von humanem Plasminogen angiostatische Aktivität. Von Cao *et al.* (1997) wurde K5 als spezifischer Inhibitor der endothelien Zellproliferation identifiziert, der wirksamer als Angiostatin ist. Zudem konnten Ji *et al.* (1998a) eine Hemmung der endothelien Zellmigration durch K5 nachweisen, die vergleichbar mit Angiostatin und anscheinend von der LBS unabhängig ist.

1.1.6 Übertragbare spongiforme Encephalopathien (TSE)

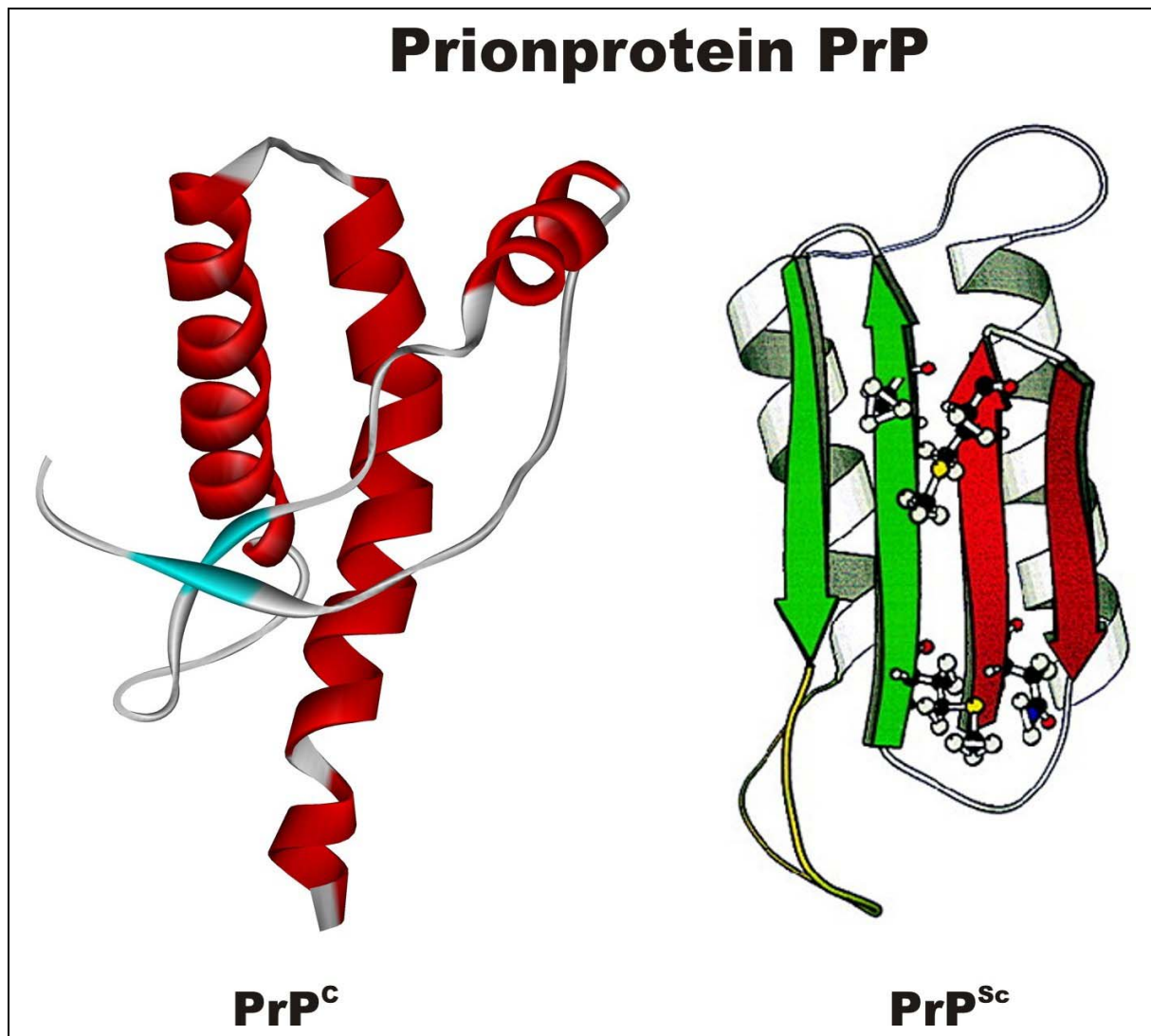
Prionen scheinen verantwortlich für das Krankheitsbild von übertragbaren spongiformen Encephalopathien („transmissible spongiform encephalopathies“ TSE) zu sein. Dabei wird das Hirn von diesem Nukleinsäure-freien Erreger innert kurzer Zeit total degeneriert und führt nach 3 bis 12 Monaten zum Tod, ohne jegliche Immunreaktion. Die Krankheit ist bei mehreren Tierarten, wie beispielsweise beim Rind unter dem Namen BSE oder „Rinderwahnsinn“, sowie auch beim Menschen bekannt. Die humanen TSE-Varianten unterteilt man in vererbte („fatale familiäre Insomnie“ FFI, „Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom“ GSS und „familiäre Creutzfeldt-Jakob Krankheit“ fCJD), sporadisch auftretende („sporadische Creutzfeldt-Jakob Krankheit“ sCJD) und infektiöse Formen (Kuru und „neue Variante der Creutzfeldt-Jakob Krankheit“ vCJD) [Prusiner (1998)]. Die infektiöse Form vCJD ist erst seit einigen Jahren bekannt und unterscheidet sich zur herkömmlichen CJD, indem die Krankheit viel früher und nicht erst mit über 60 Jahren auftritt. Ob diese Krankheit vom Rind auf den Menschen übertragen wurde, ist weiterhin umstritten.

Das Prionprotein PrP kommt in der sogenannten PrP^C-Form in hohen Konzentrationen an der Zelloberfläche der Synapsen als GPI-verankertes Glykoprotein vor [Stahl *et al.* (1990)]. Der Verdacht hat sich in den letzten Jahren erhärtet, dass die α -Helix-reiche PrP^C-Form in einem posttranslationalen Prozess zu einer konformereren, Proteinase K-resistenten, β -Faltblatt-reichen PrP^{Sc}-Form konvertiert wird (Figur 1.4). PrP^{Sc} ist im Gegensatz zu PrP^C häufig in oligomerisierter Form als stäbchenförmige Aggregate im Hirn von Patienten zu finden [Prusiner (1998)]. Offensichtlich scheint mindestens ein weiteres Protein, als „Protein X“ bezeichnet, an dieser konformationellen Umwandlung beteiligt zu sein [Cohen und Prusiner (1998)]. Mittlerweile wurden auch schon verschiedene Strukturdaten des PrP^C veröffentlicht, von der PrP^{Sc}-Form fehlen hingegen bis heute solche Daten und man stützt sich weiterhin auf berechnete Modelle (Figur 1.4) [Prusiner (1998)].

Fischer *et al.* (2000) veröffentlichten Daten, nach denen offensichtlich ein Protein gefunden worden war, welches zwischen den beiden Konformeren unterscheiden konnte. Dabei handelte es sich um Plasminogen, welches über eine der ersten 3 Kringeldomänen, höchstwahrscheinlich Kringel 1, an die PrP^{Sc}-Form band, wobei diese Wechselwirkung unter Zugabe von Lysin unterbunden wurde. Allerdings konnte diese spezifische Wechselwirkung nur unter Inkubationsbedingungen nachgewiesen werden, in welchen zusätzlich noch nicht-infektiöses Hirnhomogenat beigemischt wurde. Demnach wurde Plasminogen, unter eventueller Mitwirkung von anderen „Faktoren“, als erstes endogenes Protein betrachtet, welches zwischen beiden Konformeren unterscheiden konnte.

Von Ellis *et al.* (2002) wurden diese Befunde genauer untersucht, wobei sie aber ihre Versuche mit sogenanntem rekombinantem holo-PrP und apo-PrP durchführten. Das holo-PrP entspricht in etwa der PrP^C-Form, welche Cu²⁺-Ionen höchstwahrscheinlich an den 4 „Oktarepeats“ der Sequenz (PHGGGWGQ)₄ bindet, während das apo-PrP der PrP^{Sc}-Form gleicht und kein Cu²⁺ koordiniert [Brown *et al.* (2001); Wong *et al.* (2001); Viles *et al.* (1999)]. Getestet wurde die Plasminogenaktivierung durch u-PA und t-PA unter Zugabe von holo-PrP und apo-PrP. Keines der beiden PrP zeigte eine

Wirkung auf die Aktivierung durch u-PA, jedoch konnte eine Stimulation der Aktivierung durch t-PA um fast das 300-fache erzielt werden, wenn mit apo-PrP, jedoch nicht mit holo-PrP, inkubiert wurde. Weitere Bindungsstudien zeigten, dass die erhöhte Aktivierungseigenschaft, nebst der Bindung von Plasminogen über die Lysinbindungsstellen (LBS), abhängig von einer hoch-spezifischen Wechselwirkung zwischen t-PA und apo-PrP war. Kinetische Studien liessen vermuten, dass apo-PrP zwei von einander getrennte Bindungsstellen sowohl für t-PA als auch für Plasminogen besitzt. Demnach ist die Bindung von Plasminogen an PrP nicht unbedingt spezifisch für PrP^{Sc}, sondern von der Absenz von Cu²⁺-Ionen abhängig. *In vivo* konnte nämlich nachgewiesen werden, dass PrP^{Sc} eine Präferenz für Mn²⁺ und Zn²⁺ hat [Wong *et al.* (2001); Brown *et al.* (2000)]. Der mögliche Verlust von Cu²⁺ bei der Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} könnte die t-PA-katalysierte Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin zur Folge haben, was wiederum Auswirkungen auf das Krankheitsbild haben könnte. Dies scheint insofern eine realistische These zu sein, da sowohl t-PA als auch Plasminogen von Neuronen exprimiert werden und demnach im Hirn vorkommen [Basham und Seeds (2001); Tsirka *et al.* (1997); Verrall und Seeds (1988)].



Figur 1.4: **3D-Struktur von humanem Prionprotein.** PrP^C: NMR-Struktur des humanen Prionproteinfragments 90 - 230 in der „normalen“ Form bestehend aus 40% α -Helix und 5% β -Faltblatt. PrP^{Sc}: Berechnete Struktur des humanen Prionproteins in der pathologischen Form bestehend aus 30% α -Helix und 45% β -Faltblatt. Spiralen: α -Helix-Struktur. Pfeile: β -Faltblatt-Struktur.

1.2 Plasminogen: Struktur

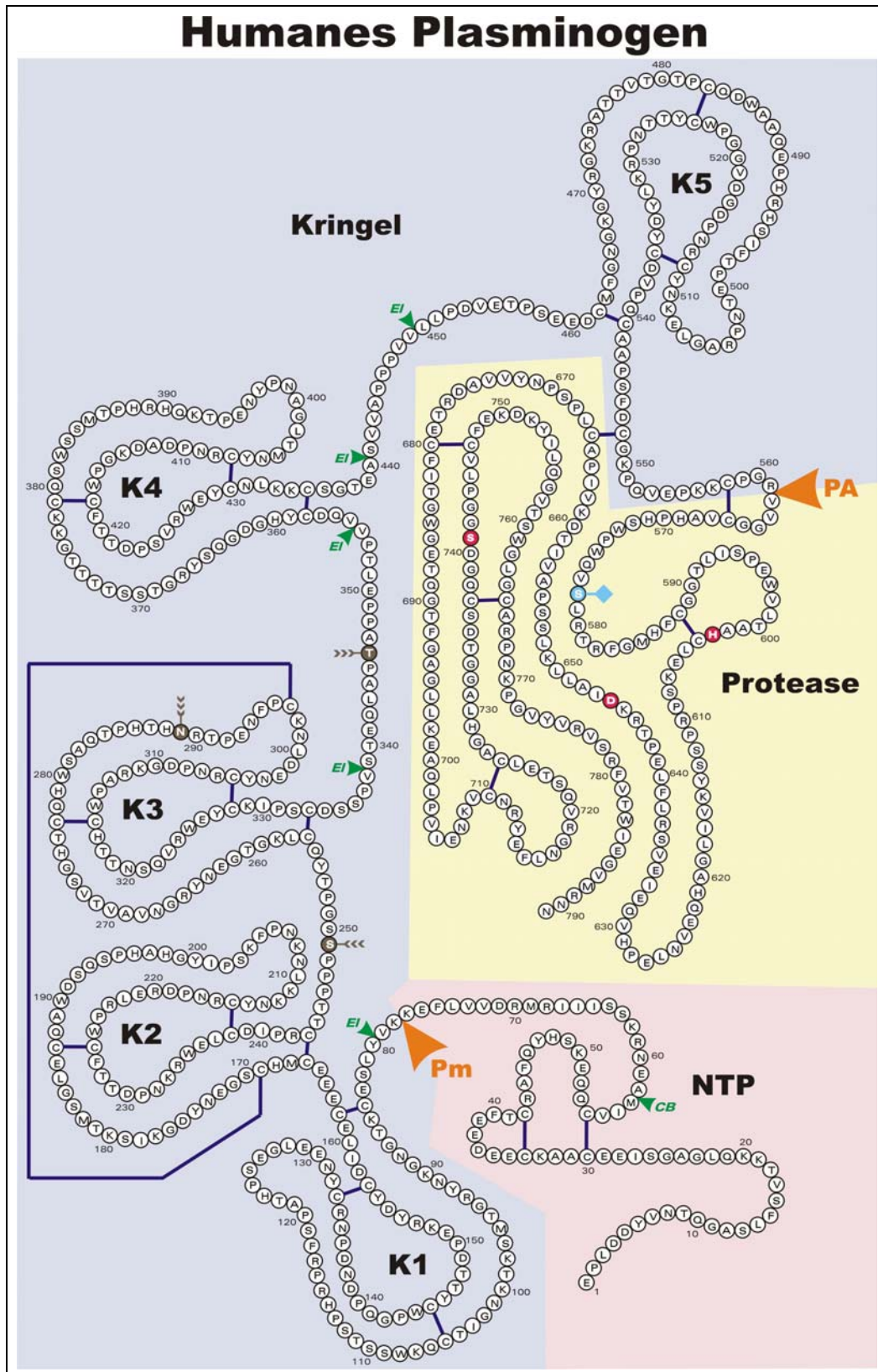
1.2.1 Allgemeine Merkmale

Das ubiquitäre Plasminogen wird im Menschen von vielen Zellarten exprimiert, doch die höchste Syntheserate wird von Hepatocyten der Leber erzielt, die den Serinproteasevorläufer in Mengen von 70 bis zu 200 mg/l Plasma ins Blut sekretieren. Aufgrund der elektrophoretischen Mobilität von Plasminogen gehört es zur Familie der β -Globuline. Wie schon im Kapitel 1.1 zum Ausdruck kam, kann Plasminogen von diversen Aktivatoren zur Serinprotease Plasmin prozessiert werden, welche ihrerseits verschiedenste Substrate durch Hydrolyse nach Lysyl- und Arginyl-Bindungen aktiviert oder degradiert [Castellino und Powell (1981)]. Das Gen des humanen Plasminogens befindet sich auf dem Strang 1 des Chromosoms 6, enthält 19 Exons und erstreckt sich über 51'055 Basen, während die mRNA im Gegensatz dazu nur noch aus 2732 Basen besteht. Eine ähnliche Anordnung der Kringel-codierenden Exons findet man auch in anderen Genen von Proteinen mit Kringelstrukturen, sodass anzunehmen ist, dass „gene shuffling“ zur Verbreitung der Kringelstrukturen beigetragen hat [Patthy (1985)]. Eine N-terminale Exportsignalsequenz von 19 Aminosäuren führt zum Export des Proplasminogens ins Endoplasmatische Reticulum (ER), wo diese prozessiert und das native Plasminogen nach posttranslationalen Modifikationen im Golgi-Apparat sekretiert wird.

Plasminogen ist ein einkettiges, globuläres Glykoprotein mit 791 Aminosäuren. Die Struktur kann in drei Einheiten eingeteilt werden: das N-terminale Peptid (NTP), die 5 Kringel und die Serinproteasedomäne (Figur 1.5). Plasminogen wird in einer limitierten Proteolyse zwischen Arg⁵⁶¹ und Val⁵⁶² durch Aktivatoren zu Plasmin, bestehend aus einer sogenannten leichten (B) und einer schweren (A) Kette, gespalten. Beide Ketten sind über zwei der insgesamt 24 Disulfidbrücken kovalent zusammengehalten. Die schwere Kette umfasst die Aminosäuren Glu¹ bis Arg⁵⁶¹, entsprechend dem N-terminalen Peptid mit den 5 Kringeln, und hat je nach Glykosylierung eine Molmasse von 64.3 bis 66.5 kDa. Die leichte Kette beinhaltet die Aminosäuren Val⁵⁶² bis Asn⁷⁹¹ mit einer Molmasse von 25 kDa und enthält das aktive Zentrum, bestehend aus den drei Aminosäuren Ser⁷⁴¹, Asp⁶⁴⁶ und His⁶⁰³, die die sogenannte katalytische Triade der Serinprotease bilden. Plasmin kann seinerseits in einer autokatalytischen Reaktion das NTP zwischen Lys⁷⁷ und Lys⁷⁸ abspalten, dies sowohl bei Plasmin als auch bei Plasminogen. Daher bezeichnet man das ganze Protein beginnend mit Glu¹ als Glu-Plasminogen und in der aktivierten Form als Glu-Plasmin, während das verkürzte Protein mit Lys⁷⁸ am N-Terminus Lys-Plasminogen oder aktiviert entsprechend Lys-Plasmin genannt wird [Violand und Castellino (1976); Wiman und Wallen (1975)].

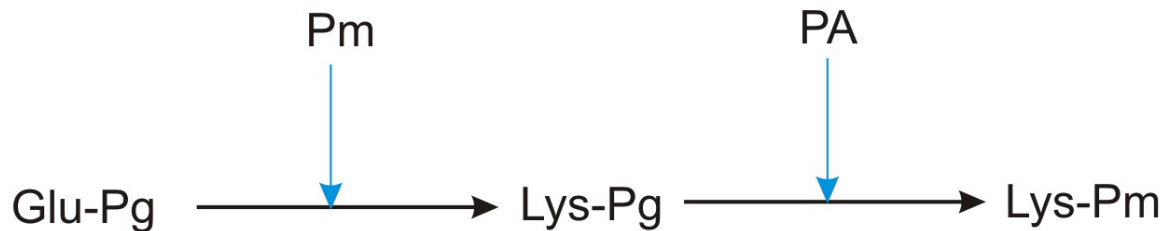
Die beiden Plasminogenformen unterscheiden sich bezüglich der Reaktivität ihrer Aktivierung zu den entsprechenden Plasminformen. Demnach ist die katalytische Effizienz von t-PA auf Lys-Plasminogen 11-mal höher als auf Glu-Plasminogen [Hoylaerts *et al.* (1982)], während mit u-PA ein gleicher Effekt mit 9-mal gesteigerter Effizienz beobachtet werden konnte [Ellis *et al.* (1991)]. Die Bindung von Glu-Plasminogen über Wechselwirkungen der Kringel mit Lysinresten an Zelloberflächen oder Fibrin bewirkt eine konformationelle Änderung, die die N-terminale Peptidspaltstelle zugänglicher für bereits vorhandenes Plasmin macht. Die Prozessierung von Glu-Plasminogen zu Lys-Plasminogen wird dadurch erleichtert (Figur 1.6). Das gebildete Lys-Plasminogen ist ein viel besseres Substrat für die Plasminogenaktivatoren als die Glu-Form. In Lösung wird aber Glu-Plasminogen durch Aktivatoren effizient zu Glu-Plasmin prozessiert, welches erst in einem zweiten Schritt durch Plasmin zur Lys-Form geschnitten wird [Miles *et al.* (2003)].

Wie aus Figur 1.5 hervorgeht, ist Plasminogen glykosyliert, wobei 2 Varianten unterschieden werden (Figur 1.7). Variante 1 ist sowohl an Asn²⁸⁹ (N-glykosidisch) als auch an Thr³⁴⁶ (O-glykosidisch) glykosyliert, während Variante 2 nur an Thr³⁴⁶ ein Oligosaccharid trägt [Marti *et al.* (1988); Castellino und Powell (1981)]. Allgemein sind die Glykosylierungen bezüglich dem Sialinsäuregehalt heterogen. Variante 1 scheint zudem dabei leichter zu Plasmin aktivierbar zu sein [Takada und Takada (1983)]. In Variante 2 konnte noch eine zusätzliche Glykosylierung an Ser²⁴⁹ (O-glykosidisch) mit dem gleichen Trisaccharid wie an Thr³⁴⁶ nachgewiesen werden [Pirie-Shepherd *et al.* (1997)]. Somit scheint Variante 1 an Thr³⁴⁶ / Asn²⁸⁹ und Variante 2 an Thr³⁴⁶ / Ser²⁴⁹ glykosyliert zu sein. Ein weiteres Faktum ist, dass Plasminogen im erwachsenen Menschen leicht anders glykosyliert ist als im Neugeborenen und in letzterer Form durch den α_2 -Plasmininhibitor schlechter hemmbar ist [Ries *et al.* (2002)]. Eine weitere posttranslationale Modifikation konnte von Wang *et al.* (1997) nachgewiesen werden, nämlich eine Phosphorylierung an Ser⁵⁷⁸. Demnach sind die Glykosylierungen ausschliesslich in den Kringeldomänen zu finden, während die Phosphorylierung in der Serinproteasedomäne vorkommt.

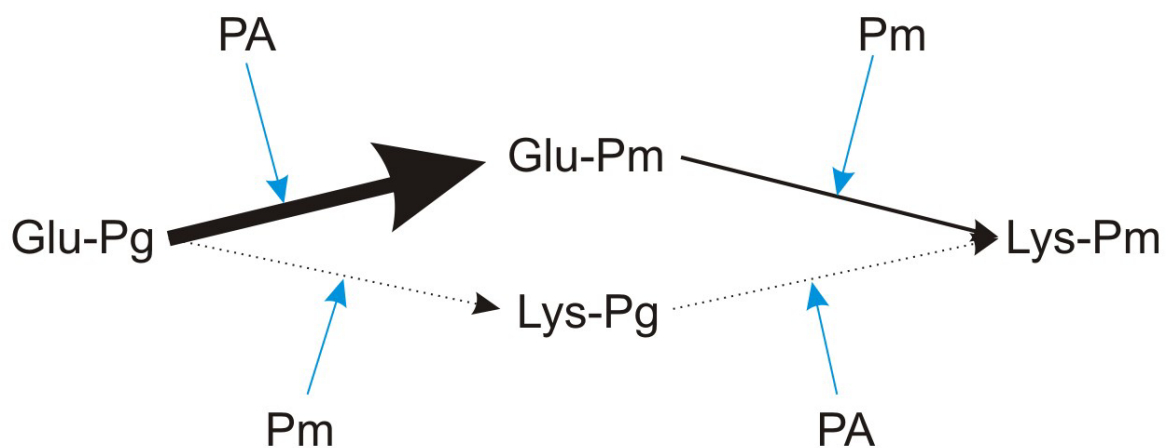


Figur 1.5: **Schematische Darstellung von humanem Plasminogen.** Rötlicher Hintergrund: N-terminale Peptid-domäne. Grünlicher Hintergrund: 5 Kringeldomänen. Gelblicher Hintergrund: Serinproteasedomäne. Dunkelblau: Disulfidbrücken. Rot: Katalytische Triade bestehend aus Serin⁷⁴¹, Asparaginsäure⁶⁴⁶ und Histidin⁶⁰³. Braun: Glykosylierungsstellen Serin²⁴⁹, Asparagin²⁸⁹ und Threonin³⁴⁶. Hellblau: Phosphorylierungsstelle Serin⁵⁷⁸. PA: Spaltung zwischen Arginin⁵⁶¹ und Valin⁵⁶² durch einen Plasminogenaktivator aktiviert Plasminogen zu Plasmin. Pm: Spaltung zwischen Lysin⁷⁷ und Lysin⁷⁸ durch Plasmin erzeugt aus Glu¹-Plasminogen / -Plasmin das kürzere Lys⁷⁸-Plasminogen / -Plasmin. El: Elastasespaltstellen, die bei limitierter Spaltung Angiostatine (K1 - 4) liefern. CB: Erste Cyanbromidspaltstelle, die unter anderem CB-NTP freisetzt.

Aktivierung von Plasminogen



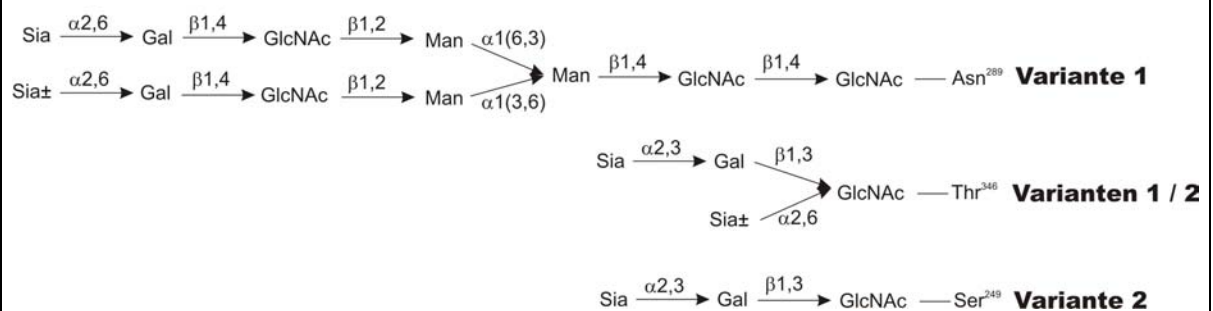
Aktivierung an der Zelloberfläche / am Fibrin



Aktivierung in Lösung

Figur 1.6: **Aktivierung von Plasminogen**. Schwarze Pfeile: X wird zu Y gespalten (die Dicke der Pfeile korreliert mit der Reaktionsrate). Glu-Pg: Glu-Plasminogen. Lys-Pg: Lys-Plasminogen. Glu-Pm: Glu-Plasmin. Lys-Pm: Lys-Plasmin. Pm: Glu- oder Lys-Plasmin. PA: Plasminogenaktivator.

Glykosylierungen am humanen Plasminogen

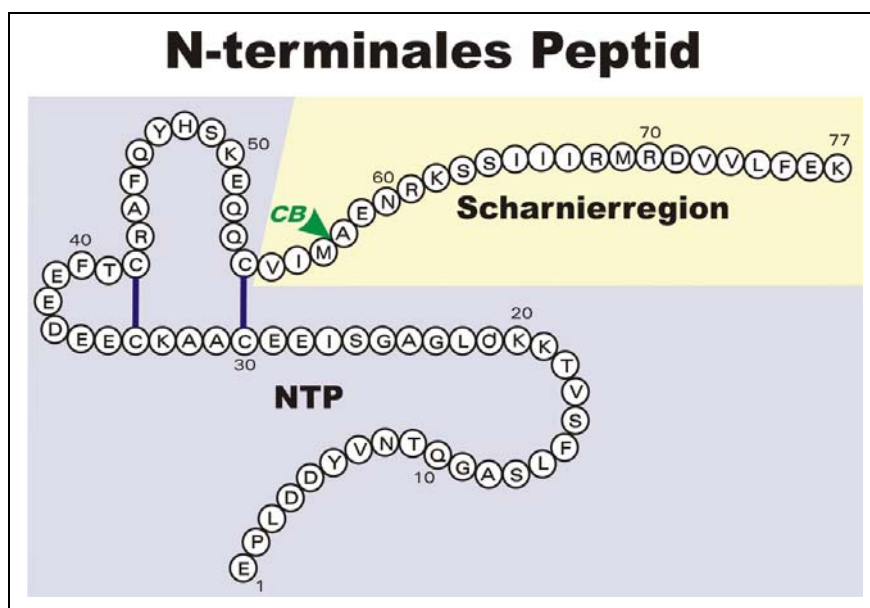


Figur 1.7: **Glykosylierungsmuster von humanem Plasminogen**. GlcNAc: N-Acetylglucosamin. Gal: Galactose. Man: Mannose. Sia: Sialinsäure. ±: variabler Gehalt.

Bis heute gelang es nur kleinere Domänen, wie einige Kringel, sowie die Serinproteasedomäne zu kristallisieren und davon hochaufgelöste Strukturdaten zu gewinnen. Vom ganzen Plasminogen fehlen jedoch weiterhin solche Daten, die Aufschluss über die Konformation der einzelnen Domänen im Kontext des ganzen Proteins geben würden. Tranqui *et al.* (1979) konnten mittels Elektronenmikroskopie der Konformation von Glu-Plasminogen eine rechtshändige Spirale zuordnen. Untersuchungen von Ponting *et al.* (1992) ergaben, dass Glu-Plasminogen mindestens drei Konformationen, als α , β , und γ bezeichnet, annehmen kann, die durch intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert werden. Dabei zeigte sich, dass es sich um Lysinreste handeln muss, die in die Lysinbindungsstellen (LBS) der Kringel binden. Die kompakte α -Konformation (auch „T-state“ für „tense“ genannt) von Glu-Plasminogen scheint einer rechtshändigen Spirale zu gleichen, wenn das NTP aber abgespalten wird, ist das Lys-Plasminogen in einer offenen β -Form (auch „R-state“ für „relaxed“ genannt) vorzufinden. Aufgrund diverser Messungen und Bindungsstudien scheint Kringel 4 an der Konformationsänderung von der β - zur anderen offenen γ -Form beteiligt zu sein und Kringel 1 scheint nicht substantiell zur kompakten Konformation beizusteuern. Mit Mutationsstudien konnte nun von Cockell *et al.* (1998) gezeigt werden, dass die LBS von Kringel 5 eindeutig in der Beibehaltung der α -Konformation involviert ist und dass das NTP mit den Aminosäuren Lys⁵⁰ und / oder Lys⁶² in die LBS bindet. Aufgrund der Beobachtungen von An *et al.* (1998a) scheint sich die Wahl auf Lys⁵⁰ einzunengen.

1.2.2 Das N-terminale Peptid

Das N-terminale Peptid umfasst die Aminosäuren Glu¹ bis Lys⁷⁷ und beinhaltet durch die beiden vorhandenen Disulfidbrücken ein Schlaufe-in-der-Schlaufe-Motiv („loop-in-a-loop“). Das Cystinmuster entspricht einer 1 - 4 und 2 - 3 Verknüpfung, d.h. das erste Cystein in der Aminosäuresequenz bildet mit dem an vierter Position stehenden, sowie das zweite mit dem dritten eine Disulfidbrücke (Figur 1.8). Wie bereits beschrieben konnte von Cockell *et al.* (1998) und An *et al.* (1998a) nun ziemlich sicher der Wechselwirkungspartner ausfindig gemacht werden, der in die LBS des Kringels 5 bindet und damit zur α -Konformation des Glu-Plasminogens führt. Es scheint sich dabei um das Lys⁵⁰ zu handeln, welches sich in einer Schlaufe des NTP befindet. Gerade diese Region ist eine der meistkonservierten des NTP im Sequenzvergleich mit verschiedenen Spezies. Nebst mehreren synthetisierten Peptiden, welche einzelnen Abschnitten des NTP entsprechen, wurde auch CB-NTP, ein NTP-Fragment aus der Cyanbromidspaltung, auf Wechselwirkungen mit den verschiedenen Kringeln untersucht [An *et al.* (1998a); An *et al.* (1998b)]. Die sogenannte Scharnierregion des NTP scheint keine definierte Struktur anzunehmen, denn sie ist eine der sensibelsten Regionen von Plasminogen, was sich *in vitro* durch erhöhte proteolytische Degradation mittels Proteasen wie Plasmin, Elastase, Enterokinase und Faktor Xa äussert. Durch Mutationsstudien von Horrevoets *et al.* (1995) konnte gezeigt werden, dass vor allem die basischen Aminosäuren in der Scharnierregion für die Stabilisierung der kompakten Glu-Plasminogen-Struktur verantwortlich sind.



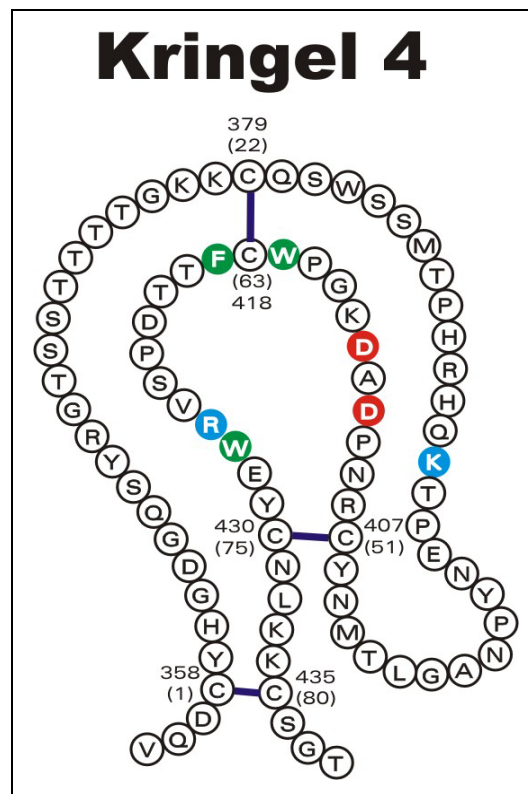
Figur 1.8: Schematische Darstellung des N-terminalen Peptids (NTP) von Plasminogen. NTP: NTP von Glu¹ bis Cys⁵⁴. Scharnierregion: NTP von Val⁵⁵ bis Lys⁷⁷. CB: Cyanbromidspaltstelle. Blau: Disulfidbrücken.

Im Genom des Menschen gibt es zwei Gene, die als „plasminogen related gene“ (PRG) A und B bezeichnet werden [Ichinose (1992)]. Allerdings ist durch die Anwesenheit von Stopcodons im Leseraster eine Expression einer funktionellen Protease ausgeschlossen. Die möglichen Translationsprodukte bestehen aber aus einem Signalpeptid und den ersten 77 Aminosäuren von Plasminogen, welche bis auf lediglich vier Aminosäuresubstitutionen mit dem NTP übereinstimmen. Sowohl PRG A- als auch PRG B-Transkripte konnten in Hepatocyten nachgewiesen werden, bisher jedoch in keiner anderen Zellart. Dieser Befund scheint darauf hinzudeuten, dass auch NTP, wenn es vom Plasminogen oder Plasmin freigesetzt worden ist, eine möglicherweise wichtige regulatorische Funktion haben könnte [Lewis *et al.* (1999)]. Rekombinantes PRG B-Protein konnte zudem das Wachstum von primären Tumoren hemmen, während rekombinantes NTP (Glu¹ bis Val⁷⁹) nur geringfügige Inhibition verursachte [Lewis *et al.* (2001)].

1.2.3 Die Kringel

Die Kringle sind Domänen, die in vielen Fällen das Enzym reversibel an ein Substrat binden. Dieses Strukturelement ist in vielen anderen Proteinen gefunden worden, wie beispielsweise in mehreren Faktoren der Blutgerinnung. Prothrombin enthält deren zwei, wobei der zweite Kringle mit Faktor Va interagiert. Die Kringlestruktur wurde 1988 mittels Röntgendiffraktion gelöst und führte zu einem Nummerierungssystem für Kringle, auch wenn diese zum Teil aus einer unterschiedlichen Anzahl an Aminosäuren aufgebaut sind [Tulinsky *et al.* (1988)]. Weitere Kringle-enthaltende Proteine sind Faktor XII und u-PA die je eine solche Struktur enthalten, während Apolipoprotein a sagenhafte 38 Kringle enthält. t-PA besitzt deren zwei, wobei der zweite eine Lysinbindungsstelle aufweist. Damit kann t-PA an Fibrin binden und auf dessen Oberfläche Plasminogen zu Plasmin aktivieren.

Plasminogen besitzt 5 Kringle, die je aus 78 bis 80 Aminosäuren aufgebaut sind (Figur 1.9). Sie besitzen je drei Disulfidbrücken, die nach dem Muster 1 - 6, 2 - 4, 3 - 5 angeordnet sind und demnach eine sogenannte Kringlestruktur ausbilden, die nach Denaturierung autonom *in vitro* zurückfaltet. Eine Eigenheit von Plasminogen ist die Interkringeldisulfidbrücke zwischen Kringle 2 und 3, die sonst nur noch in ähnlicher Weise im Hepatocytenwachstumsfaktor und dem Hepatocyten-ähnlichen Wachstumsfaktor vorkommt.



Figur 1.9: **Schematische Darstellung von Kringel 4 des Plasminogens.** Die Zahlen in Klammern entsprechen der von Tulinsky *et al.* (1988) eingeführten Kringelnummerierung. Blau: Positiv geladene Aminosäuren der Lysinbindungsstelle (LBS). Rot: Negativ geladene Aminosäuren der LBS. Grün: Hydrophobe Aminosäuren der LBS. Dunkelblau: Disulfidbrücken.

In den letzten Jahren wurden mehrere Kringle rekombinant in grösseren Mengen exprimiert. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf die einzelnen Kringle 1, 2 und 3 gerichtet, weil diese nur mit grösster Mühe durch proteolytischen Verdau von Plasminogen gewonnen werden konnten. Im Gegensatz dazu gehen aus Elastase-verdaulichem Plasminogen Kringle 4 und 5 hervor, wobei letzterer aus dem entstandenen Miniplasminogen (Kringel 5 + Serinproteasedomäne) durch zusätzlichen Verdau mit Pepsin, unter Abspaltung von Microplasminogen (Serinproteasedomäne), gewonnen wird. Alle rekombinant hergestellten Kringle wurden in *E. coli* exprimiert (Tabelle 1.3): Kringel 1 [Menhart *et al.* (1991)], Kringel 2 [Marti *et al.* (1994)], Kringel 3 [Marti *et al.* (1994)], Kringel 4 [McCance *et al.* (1994)] und Kringel 5 [McCance *et al.* (1994)]. Auch weitere Konstrukte wurden exprimiert, wie beispielsweise Kringel 2 + 3 [Söhndel *et al.* (1996)], NTP [Lewis *et al.* (1999)], NTP + Kringel 1 [Douglas *et al.* (2002)] und in der LBS mutierter Kringel 3 [Bürgin und Schaller (1999)]. Mit den meisten dieser Proteine wurden Bindungsstudien bezüglich der Lysinbindungsstellen (LBS) gemacht und Bindungskonstanten mit verschiedenen Liganden bestimmt. Zudem wurde versucht die 3D-Struktur mit NMR und Röntgen-diffraktion aufzuklären. Zur Zeit ist die Röntgenstruktur von Kringel 1 [Mathews *et al.* (1996)], Kringel 4 [Wu *et al.* (1991)] und Kringel 5 [Chang *et al.* (1998)], sowie die NMR-Struktur von Kringel 2 [Marti *et al.* (1999)] und Kringel 2 + 3 [Söhndel *et al.* (1996)] bekannt.

Aus den Assoziationskonstanten in Tabelle 1.3 wird klar, dass nicht alle LBS die Liganden gleich stark binden. Demnach lässt sich eine Reihenfolge aufstellen:

$$K1 > K4 > K5 > K2 \gg K3$$

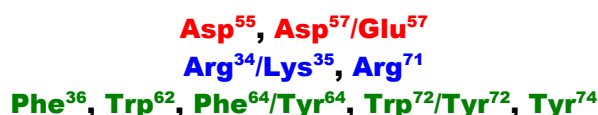
Kringel 3 beherbergt an Stelle 57 (Kringelnummerierung) ein Lysin statt eine Asparaginsäure, d.h. eine positive statt eine negative Ladung, wodurch die LBS nicht mehr im Stande ist einen Liganden wie Lysin zu binden, obwohl sie richtig vorgeformt ist, d.h. die Tasche der LBS in der richtigen Konformation vorliegt. Durch Mutation des Lys zu Asp konnten von diesem mutierten Kringel 3 (rK3mut) Assoziationskonstanten im Bereich zwischen rK2 und K5 für die jeweiligen Liganden gemessen werden, was zeigt, dass die LBS wieder nennenswerte Wechselwirkungen eingehen kann.

Tabelle 1.3: Assoziationskonstanten K_a in mM^{-1} der Kringle von Plasminogen

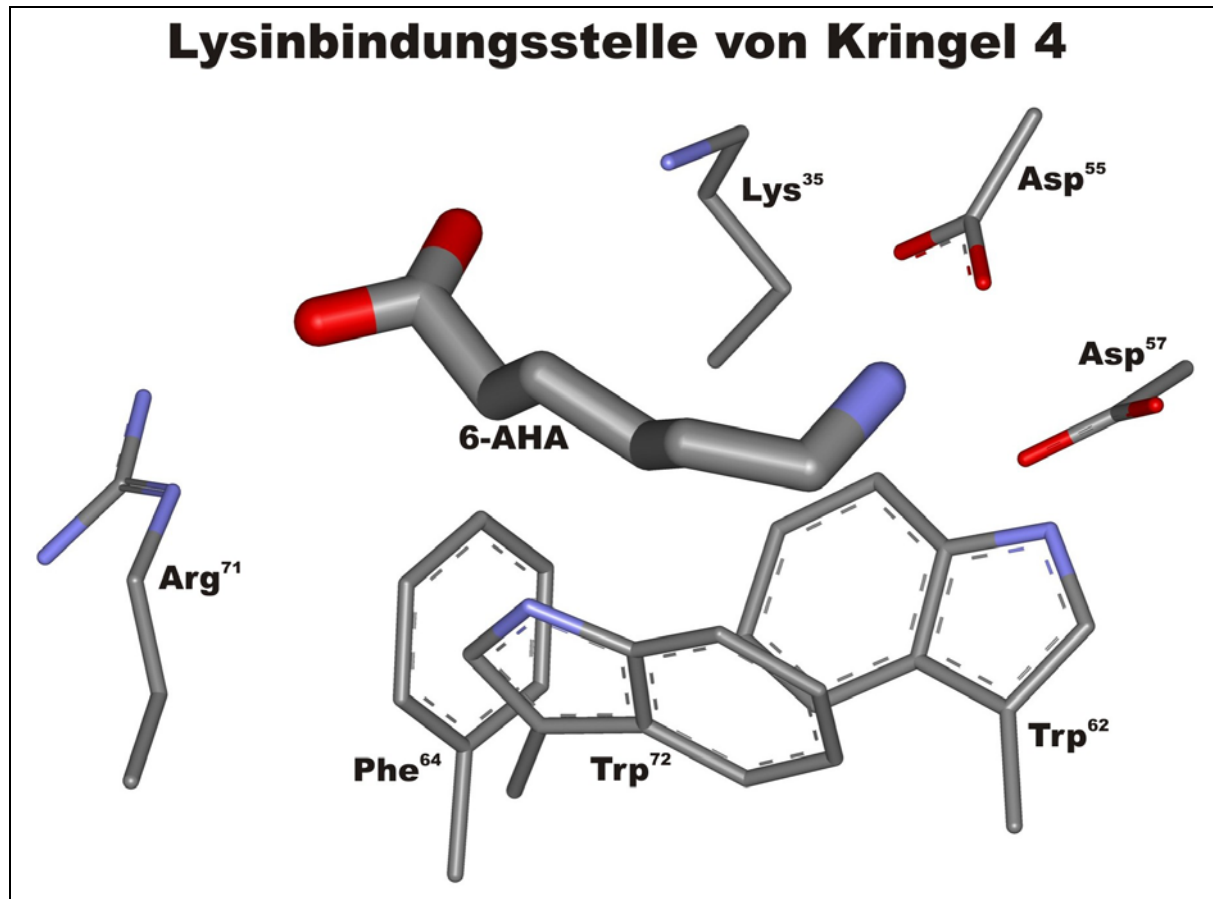
Ligand	rK1	rK2	rK3mut	K4	K5
6-AHA	74.2 ± 8	2.3 ± 0.2	4.2	21 ± 1	10.6 ± 0.2
AMCHA	> 300	7.3 ± 0.6	12.7 ± 0.5	159 ± 2	44.2 ± 4.1
CB-NTP	4.6 ± 0.7	3.3 ± 0.5	-	6.2 ± 0.4	2.3 ± 0.4
A2PIC	70 ± 7	3.2 ± 0.5	~ 4	46	4.3 ± 1.9
A2PIC(K452A)	11.6 ± 0.5	-	-	9.1 ± 0.2	-

6-AHA: 6-Aminohexansäure. AMCHA: *trans*-4-(Aminomethyl)-cyclohexancarbonsäure. CB-NTP: N-terminales Peptid aus Cyanbromidspaltung (Glu¹ bis HSer⁵⁷). A2PIC: C-Terminus des α_2 -Plasmininhibitors (Asn³⁹⁸ bis Lys⁴⁵²). A2PIC(K452A): Mutierter C-Terminus des α_2 -Plasmininhibitors (Asn³⁹⁸ bis Ala⁴⁵² statt Lys⁴⁵²). r: rekombinant. rK3mut: Kringel 3 mit Ser²⁹⁷ statt Cys und Asp³¹¹ statt Lys. -: Nicht gemessen.

Allgemein sieht die Lysinbindungsstelle wie in Figur 1.10 aus. Demnach treten 2 positiv geladene Aminosäuren (Lys oder Arg) und 2 negativ geladene Aminosäuren (Asp oder Glu) in elektrostatische Wechselwirkung mit dem Liganden, typischerweise ein Lysinrest eines anderen Proteins oder des NTP. Der Ligand wird zusätzlich durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der aromatischen Tasche (Phe, Trp oder Tyr) stabilisiert. Im Bezug auf die Kringelnummerierung sind folgende Aminosäuren an der Ausstattung der LBS beteiligt:



Im Zusammenhang mit der Isolation der Kringle ist die Beobachtung, dass die Löslichkeit von Kringle in Anwesenheit von Chloridionen massiv abnimmt, von grosser Wichtigkeit [de Vos *et al.* (1992)]. Bei der Isolation muss deshalb besonders nach der Rückfaltung von kringelhaltigem Protein auf die Pufferzusammensetzung geachtet und nicht mit Salzsäure zum Einstellen des pH gearbeitet werden.



Figur 1.10: 3D-Struktur der Lysinbindungsstelle (LBS) von Kringel 4 des humanen Plasminogens. Röntgenstruktur bei 2.25 Å mit dem Liganden 6-AHA und den 7 Aminosäuren, die für die Bindung / Stabilisierung in der Lysinbindungsstelle verantwortlich sind. Blau: N. Rot: O. Grau: C. H sind weggelassen. 6-AHA: 6-Aminohexansäure.

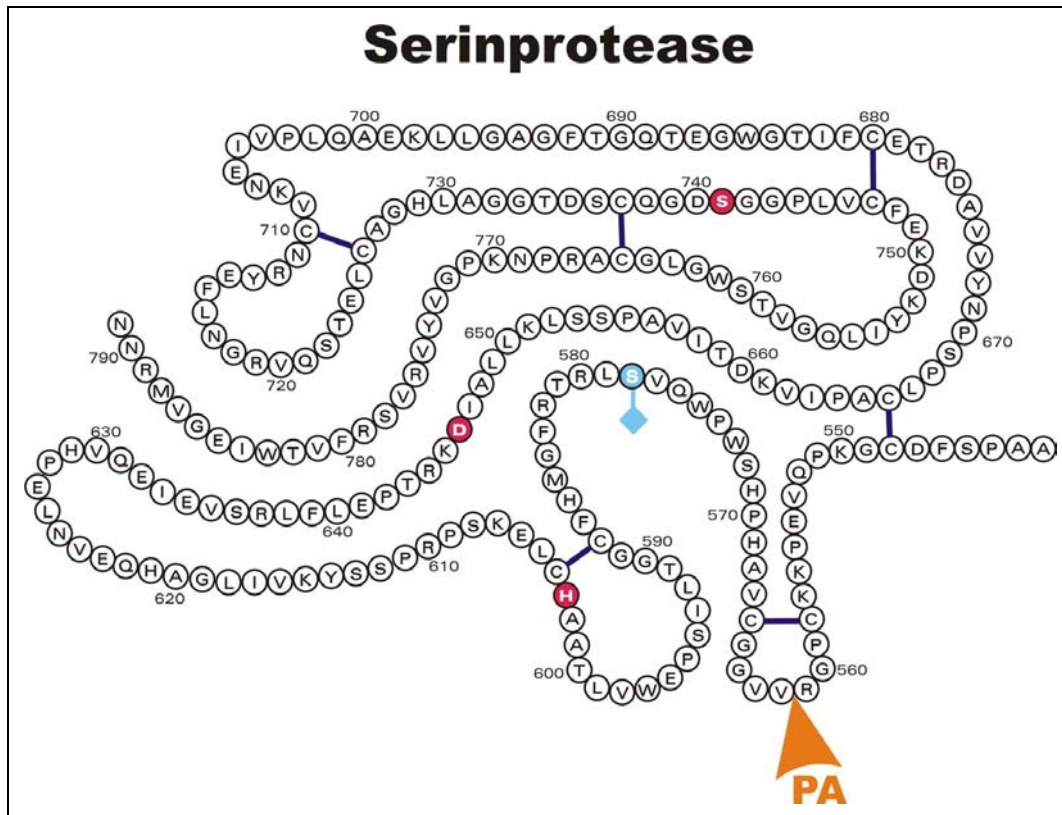
1.2.4 Die Serinprotease

Plasminogen gehört zur Chymotrypsinfamilie der Serinproteasen. Die katalytische Aktivität ist selektiv für die Sequenz Lys - Xaa und in geringerem Ausmass Arg - Xaa. Demnach ist die Substratspezifität nicht sehr hoch, was sich auch in der Anzahl der vielen Substrate niederschlägt, die von Plasmin aktiviert oder degradiert werden können. Die Serinproteasedomäne besitzt eine sogenannte katalytische Triade, die im Falle von Plasminogen aus Ser⁷⁴¹, Asp⁶⁴⁶ und His⁶⁰³ besteht (Figur 1.11). Bei der Aktivierung zu Plasmin wird die Peptidbindung zwischen Arg⁵⁶¹ und Val⁵⁶² hydrolysiert, welche sich in einer Schlaufe befinden, die in dieser Form nur in Plasminogen existiert [Peisach *et al.* (1999)]. Die schwere und die leichte Kette bleiben durch zwei Disulfidbrücken miteinander kovalent verbunden, wobei die leichte Kette noch vier zusätzliche Cystinbrücken beinhaltet. Die eigentliche Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin geschieht dadurch, dass der neu gebildete N-Terminus (Val⁵⁶²) der leichten Kette intramolekular in eine Tasche eindringt, in welcher er mit der Carboxylgruppe des Asp⁷⁴⁰ eine Salzbrücke bildet und eine optimale Anordnung der katalytischen Triade bewirkt [Wang *et al.* (1995)].

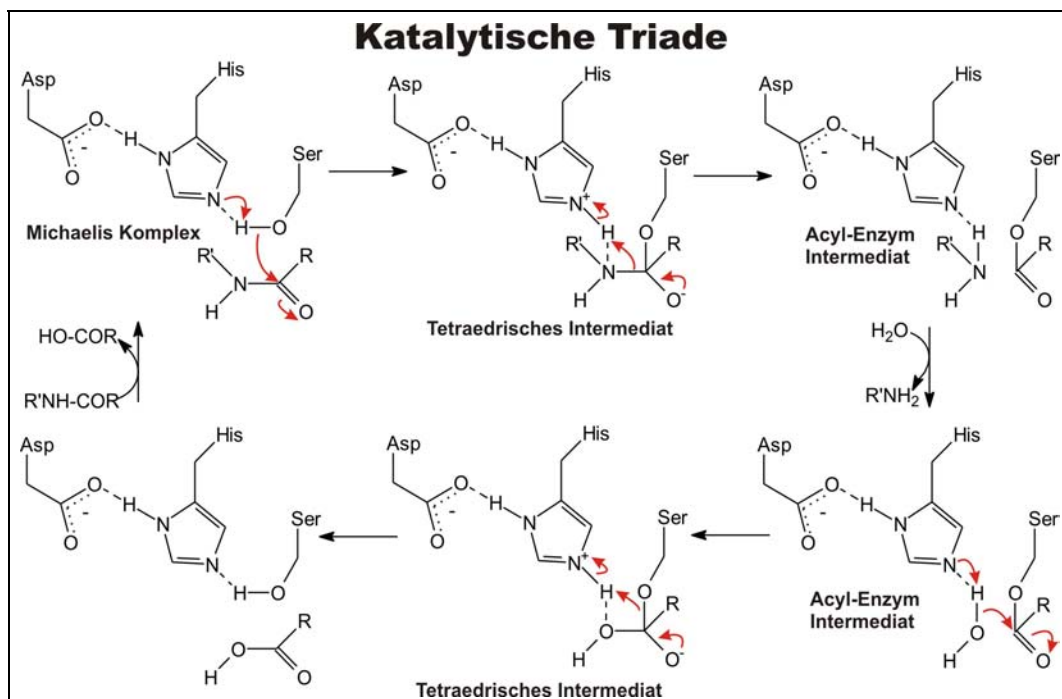
Der katalytische Mechanismus der Triade besteht aus vier Schritten (Figur 1.12). Im ersten Schritt greift das Serin die Carbonylgruppe des Substrats nucleophil an und bildet einen Übergangszustandskomplex der „tetraedrisches Intermediat“ genannt wird. Im zweiten Schritt zerfällt das „tetraedrische Intermediat“ in ein sogenanntes „Acyl-Enzym Intermediat“. Das Aminogruppe-enhaltende Peptid wird freigelassen und an dessen Stelle bindet ein Wassermolekül. Im dritten Schritt deacyliert das „Acyl-Enzym Intermediat“ wieder zurück zum „tetraedrischen Intermediat“. Im letzten Schritt kehrt die katalytische Triade wieder in den ursprünglichen Zustand zurück unter Abgabe des Carboxyl-enhaltenden Peptids [Voet und Voet (1995)].

Im Gegensatz zu den Plasminogenaktivatoren, die eine proteolytische Aktivität besitzen und die Arg-Val-Bindung schneiden, kann Streptokinase ohne Bindungsspaltung an Plasminogen binden (siehe

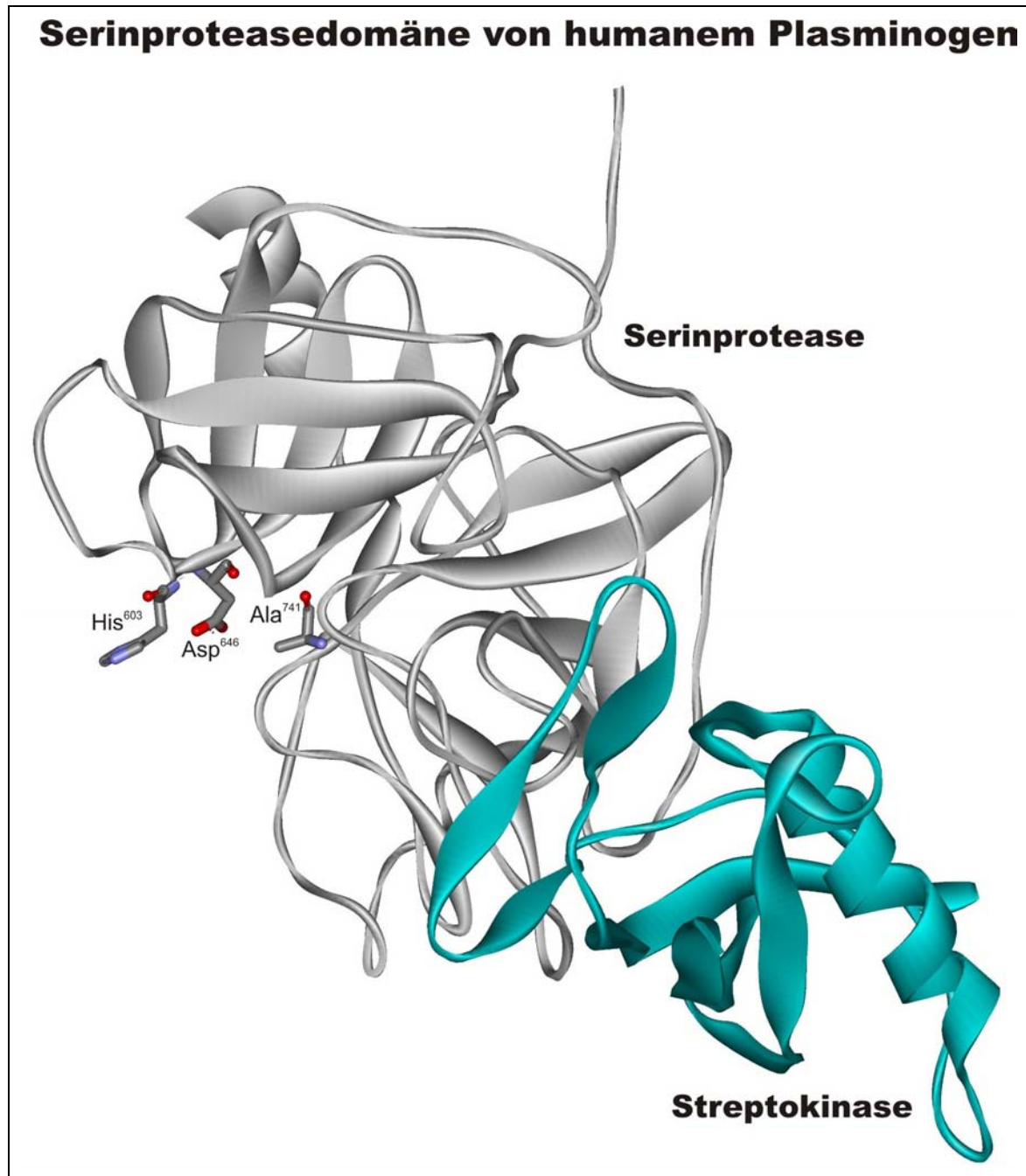
auch Kapitel 1.1.4) und durch eine Kontaktaktivierung die Konformation des Plasminogens derart verändern, dass die katalytische Triade aktiv wird. Von Wang *et al.* (1998) konnte zudem die Röntgenstruktur von Streptokinase im Komplex mit der Serinproteasedomäne des Plasminogens bestimmt werden (Figur 1.13). Dabei scheint die C-terminale Domäne der Streptokinase für die Kontaktaktivierung von Plasminogen verantwortlich zu sein.



Figur 1.11: **Schematische Darstellung der Serinproteasedomäne von Plasminogen.** Rot: Katalytische Triade mit Ser⁷⁴¹, Asp⁶⁴⁶ und His⁶⁰³. Hellblau: Phosphorylierungsstelle Ser⁵⁷⁸. PA: Schnittstelle der Plasminogenaktivatoren zwischen Arg⁵⁶¹ und Val⁵⁶². Dunkelblau: Disulfidbrücken.



Figur 1.12: **Schematische Darstellung des Mechanismus der katalytischen Triade.**



Figur 1.13: **3D-Struktur der Serinproteasedomäne von humanem Plasminogen.** Röntgenstruktur bei 2.30 Å von Microplasminogen von Ala⁵⁴³ bis Asn⁷⁹¹ (grau) im Komplex mit der α -Domäne der Streptokinase (grün-blau). Gezeigt sind die drei Aminosäuren der an Stelle 741 mutierten katalytischen Triade: Ala⁷⁴¹ statt Ser⁷⁴¹, Asp⁶⁴⁶ und His⁶⁰³. Blau: N. Rot: O. Grau: C. H sind weggelassen.

1.2.5 Der α_2 -Plasmininhibitor

Der α_2 -Plasmininhibitor gehört zu den Serpinen, d.h. zu den Serinproteaseinhibitoren. Das Gen besteht aus 10 Exons, die sich über 16 Kilobasen erstrecken. Der α_2 -Plasmininhibitor ist ein einkettiges Glykoprotein mit etwa 13% Kohlenhydratgehalt und ist aus 464 Aminosäuren aufgebaut [Moroi und Aoki (1976)]. Man unterscheidet 2 Formen des α_2 -Plasmininhibitors, nämlich die Met-Form und die Asn-Form, wobei letztere N-terminal um 12 Aminosäuren kürzer ist und im Blutplasma entsteht. Etwa 60 - 70% des im Plasma vorkommenden α_2 -Plasmininhibitors entspricht der Asn-Form [Koyama *et al.* (1994); Bangert *et al.* (1993)]. Das Protein enthält zudem 4 Cysteine, jedoch ist nur eine Disulfidbrücke ausgebildet [Christensen *et al.* (1997)]. Die Konzentration an α_2 -Plasmininhibitor im Plasma beträgt etwa 70 mg/l, was in etwa auch jener von Plasminogen entspricht.

Das Reaktionszentrum, welches mit Plasmin reagiert, besteht aus den Aminosäuren Arg³⁷⁶ und Met³⁷⁷ [Holmes *et al.* (1987)]. Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab, wobei im ersten ein nicht-kovalenter Komplex zwischen dem α_2 -Plasmininhibitor und Plasmin gebildet wird und im zweiten das Reaktionszentrum des Serpins durch die katalytische Triade der Serinprotease gespalten wird. Dabei entsteht ein kovalent gebundener 1:1-Komplex von α_2 -Plasmininhibitor und Plasmin, der proteolytisch inaktiv ist [Frank *et al.* (2003)]. Wie bereits in Kapitel 1.1.4 erwähnt beträgt die Halbwertszeit von Plasmin im Plasma 0.1 Sekunden, während es an der Zelloberfläche etwa 5 Sekunden dauert bis Plasmin inhibiert wird [Favier *et al.* (2001)].

Nebst der Inhibition der proteolytischen Aktivität von Plasmin hat der α_2 -Plasmininhibitor noch zwei weitere Funktionen, nämlich die Inhibition der Bindung von Plasmin(ogen) an Fibrin, sowie die kovalente Bindung („cross-linking“) an Fibrin. Wenn Fibrin den α_2 -Plasmininhibitor gebunden hat, ist es um ein vielfaches resistenter gegen Degradierung durch Plasmin. Für die Bindung treten Lys³⁰³ der α -Kette des Fibrins und Gln¹⁴ des α_2 -Plasmininhibitors in Wechselwirkung [Ritchie *et al.* (2000)]. Dabei ist die Rate des „cross-linkings“ um ein vielfaches höher für die Asn-Form, bei welcher Gln¹⁴ an der N-terminalen Position 2 liegt, als für die Met-Form [Sumi *et al.* (1989); Tamaki und Aoki (1982)].

Der α_2 -Plasmininhibitor besitzt nebst des Reaktionszentrums, wo Plasmin den Inhibitor zwischen Arg³⁷⁶ und Met³⁷⁷ schneidet, sowie der Fibrinbindungsstelle bei Gln¹⁴ noch eine Plasminogenbindungsstelle. Kluft und Los (1981) fanden eine nicht-Plasminogen-bindende Form, die später als α_2 -Plasmininhibitor ohne C-terminale Region identifiziert werden konnte [Sasaki *et al.* (1986)]. Dieser C-Terminus konnte bisher in keinem anderen Serpin gefunden werden. Untersuchungen mit Hilfe von rekombinanten C-Termini, die sich von Asn³⁹⁸ bis Lys⁴⁵² erstreckten, wurden von Frank *et al.* (2003) durchgeführt. Dabei wurde ein Wildtyp und ein an Stelle 452 zu Ala mutiertes C-terminales Fragment exprimiert. Die Assoziationskonstanten für die beiden Kringel rK1 und K4 zeigten eine um das fünf-fache reduzierte Bindungsstärke gegenüber dem mutierten C-Terminus im Vergleich zum Wildtyp. Von Wang *et al.* (2003) konnte ebenfalls eine um das fünffache reduzierte Bindungsstärke von ganzem rekombinantem α_2 -Plasmininhibitor, der allerdings an der Stelle 436 von Lys zu Glu mutiert war, gemessen werden. Jedoch konnte der Effekt, welcher mit dem C-terminalen Fragment mit mutiertem Lys⁴⁵² von Frank *et al.* (2003) beobachtet werden konnte, nicht mit dem ganzen rekombinanten, an der gleichen Stelle mutierten α_2 -Plasmininhibitor von Wang *et al.* (2003) bestätigt werden. Um die Frage zu beantworten, welches Lysin hauptsächlich für die Bindung an die LBS des Plasmins verantwortlich ist, müssen demnach noch weitere Bindungsstudien mit mutierten Proteinen und Peptiden durchgeführt werden.

Somit besteht der α_2 -Plasmininhibitor N-terminal aus einer Fibrinbindungsstelle, C-terminal aus einer Plasminogenbindungsstelle, sowie aus einer in der mittleren Region angesiedelten Serpinaktivität.

1.3 Expressionssysteme: *E. coli* und *P. pastoris*

Seit zwei Jahrzehnten ist eine kaum zu fassende Menge an strukturellen Daten von den verschiedensten Proteinen zusammengetragen worden, mit dem jeweiligen Ziel eine hochaufgelöste Röntgenstruktur aus Proteinkristallen oder eine NMR-Struktur in Lösung zu ermitteln. Dies ist nur Dank ausgeklügelter rekombinanter Expressionssysteme möglich geworden, die es dem Experimentator in einigen Fällen innert weniger Wochen erlauben, mehrere Milligramme an Protein in hochreiner Form darzustellen.

Das bekannteste, bestuntersuchte und am meisten verbreitete System basiert auf dem Darmbakterium *Escherichia coli*, kurz *E. coli*. Durch die einfache Transformation des Bakteriums mit Plasmiden, die mittels PCR Träger des gewünschten Gens geworden sind, kann mit einfachen Mitteln, unter Verwendung starker Promotorregionen, in diesen Vektoren eine gezielte Expression des eingebauten Gens induziert werden. Nach wenigen Stunden können dann schon grössere Mengen im Milligrammbereich aus weniger als einem Liter Kultur isoliert werden. Dies veranschaulicht ganz deutlich, dass es sich bei *E. coli* um ein einfach zu handhabendes, schnelles und vor allem billiges Expressionssystem handelt.

Sobald aber „anspruchsvollere“ Proteine exprimiert werden sollen, wie etwa sehr grosse Proteine oder solche mit viel Sekundärstrukturelementen, die durch komplexe Disulfidbrückenmuster zusammengehalten werden, stösst man schon bald an die Grenzen des *E. coli* Systems. Da es sich um ein prokaryontisches System handelt, führt die ganze Faltungsprozedur von rekombinant exprimierten eukaryontischen Proteinen, die in höheren Eukaryonten sehr komplex unter mithilfe von diversen Chaperonen abläuft, des öfters zu physiologisch inaktiven Formen. Für die Inaktivität von in *E. coli* exprimierten eukaryontischen Proteinen können nebst einer falschen Faltung auch fehlende posttranslationale

Modifikationen, wie Glykosylierungen und Phosphorylierungen, ausschlaggebend sein. Allerdings kann für strukturelle Untersuchungen mittels NMR und Röntgendiffraktion das Fehlen von Modifikationen von wesentlichem Vorteil sein, tragen doch in *E. coli* exprimierte Proteine keine störenden Glykosylierungen, die insbesondere für Kristallisationsexperimente ein grosses Hindernis darstellen können.

Um diese dem *E. coli* System innewohnenden Probleme zu umgehen, gibt es heute auch verschiedenste eukaryontische Expressionssysteme angefangen mit Hefe, einem niederen Eukaryont, über Insektenzellen bis hin zu Säugerzellen. Sobald man aber den prokaryontischen Systemen den Rücken kehrt, wird die ganze Arbeit schon von Beginn weg viel komplexer. Beispielsweise müssen die Gene in der Regel in das Genom des Wirts rekombiniert werden, um eine stabile Zelllinie zu erhalten. Häufig kann die Rekombination nicht in gerichteter Form durchgeführt werden, d.h. jeder Klon wird das Gen an einer anderen Stelle im Genom einbauen. Je nachdem wo diese Rekombination stattfindet, können wichtige Gene des Wirts ausgeschaltet werden. Demnach ist es ausserordentlich wichtig so viel Klone wie möglich auf Lebensfähigkeit und Wachstumsgeschwindigkeit sowie Expressionsverhalten zu untersuchen, um eine möglichst hohe Ausbeute an rekombinantem Protein zu erzielen. Aufgrund des Transfektionsverfahrens und der aufwendigeren Selektion der Klone sind eukaryontische Systeme viel zeit- und materialintensiver, und daher auch teurer als das *E. coli* System.

Allerdings konnten aufgrund der Transkriptions- und Translationsmechanismen sowie den posttranslationalen Vorgängen schon mehrere menschliche Proteine, beispielsweise in Insektenzellen, in grösseren Mengen hergestellt werden. Diese rekombinanten Produkte unterscheiden sich strukturell und physiologisch häufig in keiner Weise von direkt aus dem Menschen isoliertem Protein.

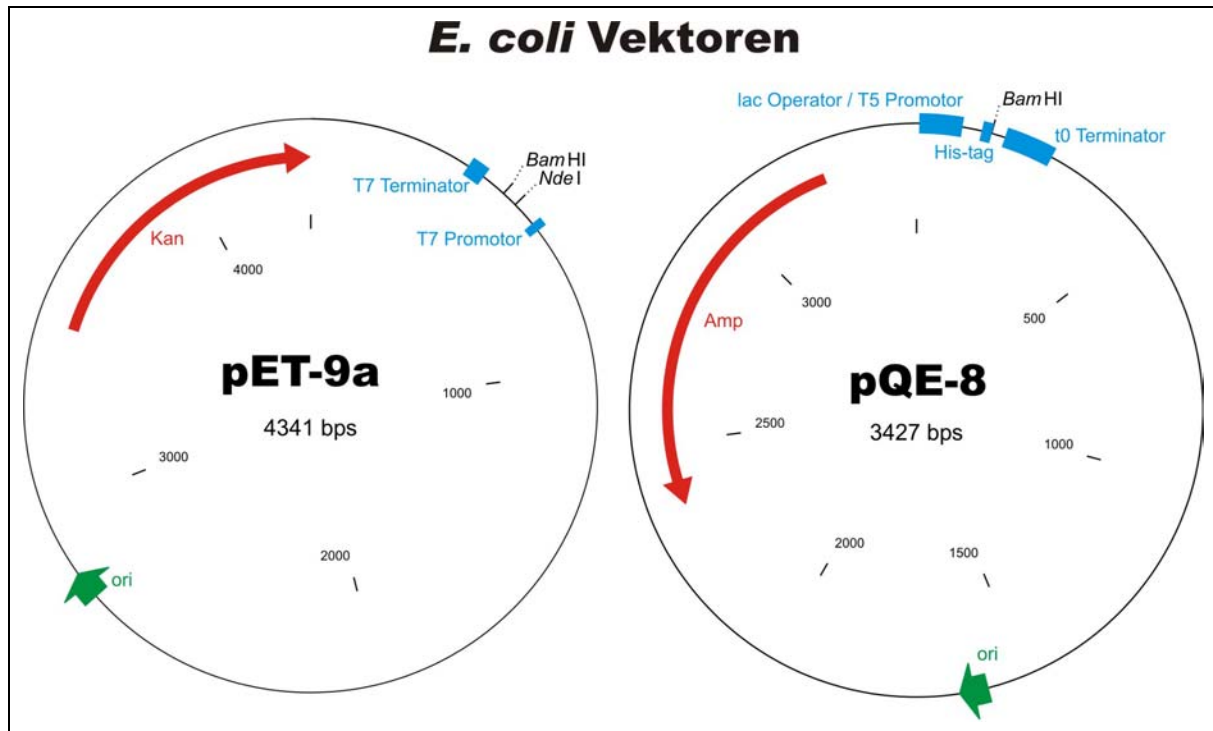
Aufgrund der Zielsetzung (siehe auch Kapitel 1.4) war klar, dass zunächst zwei *E. coli* Expressionssysteme getestet werden sollten und falls diese keine befriedigenden Ergebnisse liefern würden, könnte man Experimente mit der methylotrophen Expressionshefe *Pichia pastoris*, kurz *P. pastoris*, in Betracht ziehen. Viele der oben gemachten Ausführungen über die eukaryontischen Expressionssysteme treffen auch auf *P. pastoris* zu, insbesondere dass es ein zeit- und materialintensiveres System im Vergleich zum *E. coli* System ist. Zudem können unerwünschte Glykosylierungen stattfinden, jedoch nicht in einem Ausmass wie bei *S. cerevisiae*, die häufig hyperglykosyliert. Ein weiteres Problem könnte die primitivere Ausstattung des Faltungs- und posttranslationalen Modifikationsapparats im Vergleich zu höheren eukaryontischen Systemen sein. Allerdings hat die methylotrophe Expressionshefe einen ausserordentlich wichtigen Vorteil gegenüber höheren eukaryontischen Systemen, nämlich die Möglichkeit, auf einfache Weise mit ^{13}C und ^{15}N markierte Proteine zu exprimieren. In den meisten höheren eukaryontischen Systemen sind Expressionen in Minimalmedien mit klar definierter Zusammensetzung gar nicht erst möglich, oder nur unter Zusatz etlicher markierter Metaboliten, die den finanziellen Rahmen des Projekts gesprengt hätten.

1.3.1 *E. coli*: Expression in BL21(DE3)

Der Stamm BL21(DE3) ist lysogen. In seinem Genom hat er den Bacteriophagen λ DE3 integriert, welcher das T7 Bacteriophagen-Gen *I* enthält. Dieses Gen codiert die T7 Polymerase und steht unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors, der durch Zugabe von IPTG dereprimiert wird. Der in die Zellen transformierte pET-9a Vektor (Figur 1.14), in welchem zwischen den *NdeI*- und *BamHI*-Schnittstellen ein beliebiges „Insert“ eingebaut werden kann, besitzt einen T7 Promotor, der von der T7 Polymerase erkannt wird, so dass das Gen nach Stimulation mit IPTG transkribiert wird [Studier und Moffatt (1986); Davanloo *et al.* (1984)].

1.3.2 *E. coli*: Expression in M15[pREP4] und SG13009[pREP4]

Die beiden Stämme M15[pREP4] und SG13009[pREP4] enthalten das Plasmid pREP4, welches das *lacI^q* Repressor-Gen enthält. Der in die Zellen transformierte pQE-8 Vektor (Figur 1.14) mit einem beliebigen, bei der *BamHI*-Schnittstelle eingebauten „Insert“, besitzt hinter zwei 5'-vorgeswitchten *lac* Operatoren einen T5 Promotor, der von der *E. coli* RNA Polymerase erkannt wird. Jedoch reprimiert der pREP4-codierte *lacI^q* Repressor normalerweise den T5 Promotor durch Bindung an die Operatoren. Erst die Zugabe von IPTG dereprimiert den Promotor, weil dieses den Repressor bindet und inaktiviert, womit das Gen transkribiert wird [Villarejo und Zabin (1974); Stuber *et al.* (1990)]. Die Regulation der Expression ist ein sogenanntes *trans*-System, da der Repressor und das Repressor-kontrollierte Gen auf zwei verschiedenen Vektoren codiert sind.



Figur 1.14: Schematische Darstellung der *E. coli* Vektoren. Kan: Gen für Kanamycinresistenz. Amp: Gen für Ampicillinresistenz. ori: Replikationsursprung des Plasmids.

1.3.3 *P. pastoris*: Expression in GS115 und KM71

Die beiden Vektoren pPIC3.5K und pPIC9K (Figur 1.15) sind sowohl für die Expression in *P. pastoris*, als auch für die Klonierung und Vermehrung in *E. coli* ausgestattet. Hierfür besitzen sie einen pBR322 Replikationsursprung, womit die ganze Klonierungsprozedur des gewünschten Gens in die Plasmide auf der Ebene von *E. coli* durchgeführt werden kann. Die Plasmid-tragenden Transformanten können mit den Ampicillin- und Kanamycinresistenzen selektioniert werden.

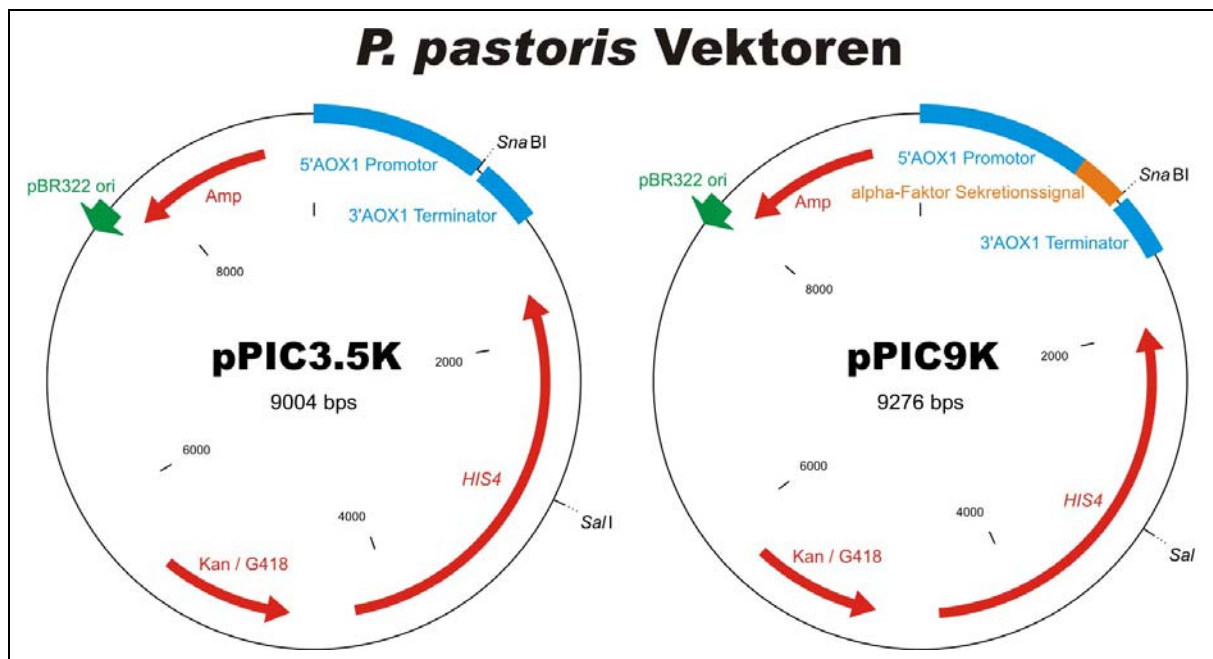
Der Vektor pPIC3.5K, welcher für intrazelluläre Expressionen ausgelegt ist, enthält keine Kozak-Konsensussequenz, die deshalb zusammen mit dem zu klonierenden Gen im richtigen Leseraster eingefügt werden muss. Diese Sequenz entspricht etwa der Basenfolge ACCATGG, worin das ATG zugleich das Startsignal für das Ribosom bedeutet. Im Vektor pPIC9K ist hingegen eine solche Kozak-Sequenz schon vorhanden, da sich 5'-terminal eine α -Faktor Signalsequenz aus *S. cerevisiae* befindet. Falls das zu klonierende Gen im gleichen Leseraster 3'-terminal an die Signalsequenz kloniert wird, kann das exprimierte Protein in das ER exportiert werden, wo die Signalsequenz abgeschnitten und das rekombinante Protein ins Medium sekretiert wird. Die Expression des klonierten Gens untersteht der Kontrolle des 5'AOX1 Promotors, jener des natürlich in *P. pastoris* vorkommenden Alkoholoxidasegens AOX1, was zu einer starken Überexpression des Proteins führt. Dabei unterliegt der Promotor einer zweistufigen Regulation, indem er zum ersten durch die An- oder Abwesenheit von Glucose reprimiert beziehungsweise dereprimiert wird und zum zweiten durch die Zufuhr von Methanol induziert wird. Um eine Überexpression zu induzieren, reicht die Zugabe von Methanol nicht aus, sondern es darf auch keine Glucose anwesend sein. Aus diesem Grund werden die Zellen jeweils in Glycerin-haltigem Medium, welches den 5'AOX1 Promotor nicht reprimiert, als Glucoseersatz angezogen und für die Expression anschliessend mit Methanol induziert.

Nach der Konstruktion in *E. coli* werden die Plasmide typischerweise im *HIS4*-Gen, welches für die Histidinoldehydrogenase codiert, linearisiert und in die beiden *P. pastoris* Stämme GS115 und KM71, die beide bezüglich dieses Enzyms defizient sind, transformiert. Dazu werden die Hefezellen zunächst mit Zymolyase behandelt, um nach erfolgter Zellwandschwächung die lineare DNA aufnehmen zu können. Die Zellen werden anschliessend in Top-Agar gegossen, damit sich die Zellwände wieder regenerieren können. Die aufgenommene DNA wird bevorzugt an die *his4*-Stelle rekombinieren, da man im komplementären *HIS4*-Gen des Vektors die Linearisierung vollzogen hatte. Im Idealfall bleibt es nicht nur bei einem einzigen solchen Ereignis, sondern es sind mehrere Rekombinationen hintereinander im Kassettenprinzip denkbar und auch schon nachgewiesen worden.

Nachdem sie sich im Top-Agar regeneriert haben, geschieht die Selektion der Transformanten auf Histidin-defizienten Platten. Alle Klone die dort wachsen sollten demnach eine wiederum intakte Histi-dinoldehydrogenase exprimieren, da sie durch die rekombinierte DNA das intakte *HIS4*-Gen wieder im Genom rekonstituiert haben sollten. Zur Sicherheit wird mit den positiven Klonen eine zweite Selektion durchgeführt und zwar mit dem Antibiotikum Geneticin. Auf den Vektoren ist das G418-Resistenzgen codiert, welches in *E. coli* für eine Kanamycinresistenz, in *P. pastoris* hingegen für eine Geneticinresistenz sorgt. Der Vorteil von Geneticin besteht darin, dass Klone, die mehrere Kopien in ihr Genom rekombiniert haben, gegen höhere Dosen an Antibiotikum resistent sind. Deshalb können direkte Rückschlüsse auf die ungefähre Anzahl von eingebauten Kopien gemacht werden. Um ganz sicher zu gehen, dass sie auch das klonierte Gen beherbergen, wird von einigen Klonen die DNA isoliert und eine PCR zum Nachweis des Gens durchgeführt.

Wenn alle diese Selektionstests bewältigt sind, sollte noch der Mut-Phänotyp („methanol utilisation“) kontrolliert werden. Dabei sollten GS115-Klone Mut⁺ und KM71-Klone Mut^s sein, d.h. sie können Methanol entweder gut metabolisieren (Mut⁺) oder wachsen unter diesen Bedingungen nur langsam (Mut^s). Demnach hat der KM71-Stamm eine reduzierte Alkoholoxidaseaktivität zu verzeichnen, da er Träger eines mutierten *aox1*-Gens ist und somit nur noch mit dem schwächer exprimierten AOX2-Gen Methanol metabolisieren kann (deshalb Mut^s für „Methanol utilisation slow“).

Für die Expression der beiden Stämme wird auf den Promotor des AOX1-Gens von *P. pastoris* zurückgegriffen, der dem natürlichen Promotor der Alkoholoxidase entspricht. Wenn die Zellen in Methanol-haltigem Medium als einziger Kohlenstoffquelle induziert werden, beginnt die starke Transkription zu mRNA, die etwa 5% der total vorhandenen mRNA-Menge in der Zelle ausmacht. Die Translation der mRNA erzielt schliesslich bis zu 30% der totalen Proteinmenge in der Zelle. In der Regel kann nach 48 bis 144 Stunden das Protein aus den Zellen oder aus dem Medium isoliert werden. Die Expressionsdauer sowie die Isolationsart sind jeweils vom verwendeten Zellstamm und vom rekombinierten Vektor abhängig. Bei der sekretierten Expression ist die Wahrscheinlichkeit gross N-glykosyliertes Protein zu erhalten, falls Glykosylierungssequenzen vorhanden sind, jedoch wurden kaum je O-glykosylierte Expressionsprodukte beobachtet [Invitrogen (2002); Grinna und Tschopp (1989); Tschopp *et al.* (1987); Ellis *et al.* (1985)].



Figur 1.15: Schematische Darstellung der *P. pastoris* Vektoren. Amp: Gen für Ampicillinresistenz in *E. coli*. Kan / G418: Gen für Kanamycinresistenz in *E. coli* / Geneticinresistenz in *P. pastoris*. *HIS4*: Gen für Histi-dinoldehydrogenase. ori: pBR322 Replikationsursprung des Plasmids in *E. coli*.

1.4 Zielsetzung

Die dreidimensionale Struktur des humanen Plasminogens ist weiterhin unbekannt. Wie aus Kapitel 1.2.3 hervorgeht sind viele Domänen einzeln rekombinant exprimiert worden. Von vier Kringeln wie auch von der Serinproteasedomäne konnten mittels Röntgendiffraktion und NMR die Strukturen bestimmt werden. Aufgrund der vielfachen Wechselwirkungen, die Plasminogen im Körper eingeht, sowie in Anbetracht der Komplexität des ganzen Plasminogensystems, könnte die Auflösung der dreidimensionalen Struktur weitere Erkenntnisse liefern und manche Theorie bestätigen oder widerlegen. Eine ausserordentlich wichtige Rolle fällt dabei den Kringeln zu, denn durch ihre Lysinbindungsstellen nehmen sie an diversen Wechselwirkungen teil. Zudem kommen Kringel in vielen anderen Proteinen vor, die unterschiedlichste Aufgaben wahrnehmen, wie beispielsweise im Angiostatin, dessen Funktion im Vergleich zu Plasminogen ganz verschieden ist. Aus diesem Grund ist es unabdingbar zu erfahren, wie die Kringel untereinander angeordnet sind und wie deren Wechselwirkungen im Protein aussehen.

Deshalb soll die schwere Kette von Plasminogen mit und ohne N-terminales Peptid kloniert und in *E. coli* rekombinant exprimiert werden. Die Isolation und Reinigung sollte dann mittels Metallchelataffinitätschromatographie eines „His-tags“ an Ni^{2+} -Ionen, sowie mittels Affinität der korrekt gefalteten Lysinbindungsstellen an Lysin, höchstwahrscheinlich hauptsächlich durch die Kringel K1 und K4 vermittelt, durchgeführt werden. Aufgrund bisher gemachter Erfahrungen wurde vorerst das einfache prokaryontische System ausgewählt. Mit einzelnen Kringeln sowie dem Kringelsupermodul K2 + K3 hat das System gut funktioniert. Die Frage ist nur, ob sich solch positive Resultate auch mit der Expression von mehr als doppelt so grossen Proteinen mit vielen Sekundärstrukturen erzielen lassen. Falls die Expression möglich ist, lässt sich so auf einfache Art und Weise markiertes Material herstellen, d.h. mit ^{13}C und ^{15}N markiertes Protein, weil *E. coli* in einem klar definierten Minimalmedium ohne weiteres wachsen kann. Durch die Markierung wird nebst Kristallisationsexperimenten für Strukturbestimmung mittels Röntgendiffraktion auch eine zumindest partielle Strukturbestimmung mittels NMR ermöglicht. Allerdings braucht es für beide Methoden genügend Material, d.h. mehrere Milligramme. Zudem sollte das Material nicht glykosyliert sein, da dies die Kristallisation und die NMR-Messung stark erschweren kann, was ein weiteres Argument für die Expression in *E. coli* ist.

Nebst der Strukturbestimmung kann rekombinant hergestelltes Plasminogen auch zu Bindungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie herangezogen werden, wie beispielsweise mit α_2 -Plasmininhibitor und dessen C-terminalen Peptiden mit Wildtypsequenz sowie mutierten Lysinresten. Damit könnten das oder die mit den Kringeln von Plasminogen wechselwirkende/n Lysinrest/e des α_2 -Plasmininhibitors sowie die zuständige Lysinbindungsstelle des Plasminogens genauer ermittelt werden.

Falls das *E. coli* System kein oder zu wenig Material liefern sollte, wäre ein nächster Schritt die Expression der schweren Kette in *P. pastoris*, eine methylotrophe Hefe. Die ganze Klonierung in die geeigneten Vektoren kann in *E. coli* durchgeführt werden, was das Ganze wesentlich erleichtert und vereinfacht. Nach erfolgter Konstruktion der Vektoren können sie in *P. pastoris* transformiert werden und dann gerichtet in das Hefegenom rekombinieren.

Die Expression kann ebenfalls in Minimalmedien durchgeführt werden, was eine Markierung mit ^{13}C durch Zugabe von markiertem Methanol als einzige Kohlenstoffquelle, sowie ^{15}N -markiertem Ammoniumsulfat als einzige Stickstoffquelle ermöglicht. Zudem besteht durch Wahl des geeigneten Vektors die Möglichkeit, das rekombinante Protein intrazellulär oder, dank einer N-terminalen Exportsignalsequenz, sekretiert zu exprimieren. Wird die Sekretion ins Auge gefasst, sind zumindest die beiden hauptsächlich Glykosylierungsstellen von Plasminogen zu mutieren.

Falls diese Expressionsversuche fehlschlagen, soll die Expression vom ganzen humanen Plasminogen in *P. pastoris* versucht werden, ebenfalls intrazellulär und sekretorisch, damit diese Resultate mit Experimenten mit höheren eukaryontischen Expressionssystemen verglichen werden können.

In weiteren Experimenten sollen auch diverse kleinere Fragmente von Plasminogen, wie beispielsweise rekombinantes NTP mit K1 und rekombinante K4 + K5 in *P. pastoris* exprimiert werden, damit sich diese mit aus *E. coli* isoliertem Protein vergleichen lässt. Zudem soll das Fragment NTP mit K1 mit ^{15}N markiert in *E. coli* in grösseren Mengen exprimiert werden, um strukturelle Studien mittels NMR zu ermöglichen.

2 *E. coli*: Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 Material

2.1.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Lieferant
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac</i> , [F': <i>proAB, lacI^qΔM15, Tn10 (Tet^r)</i>] Höhere Transformationsraten mit Ligationen als BL21(DE3), M15[pREP4] und SG13009[pREP4] Beschrieben von Bullock <i>et al.</i> (1987)	Stratagene
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT, hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻), dcm, gal, λ(DE3)</i> Expressionsstamm IPTG dereprimiert den <i>lacUV5</i> Promotor und induziert die chromosomal codierte T7 Polymerase Beschrieben von Studier und Moffatt (1986)	Stratagene
M15[pREP4]	F ⁻ , <i>thi-1, lac, mtl-1</i> , [pREP4: Kan ^r] Expressionsstamm Wirt des <i>lacI^q</i> Repressor-codierenden Plasmids pREP4 Beschrieben von Villarejo und Zabin (1974)	Qiagen
SG13009[pREP4]	F ⁻ , <i>thi-1, lac, mtl-1</i> , [pREP4: Kan ^r] Expressionsstamm Wirt des <i>lacI^q</i> Repressor-codierenden Plasmids pREP4 Geeignet für in M15[pREP4] schwach exprimierte Proteine Beschrieben von Gottesman <i>et al.</i> (1981)	Qiagen
HB101	F ⁻ , <i>thi-1, hsdS20 (r_B⁻ m_B⁻), supE44, recA13, ara-14, leuB6</i> , <i>proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Str^r), xyl-5, mtl-1</i> Wirt des Plasmids pPLGKG Beschrieben von Lacks und Greenberg (1977)	Promega
JM109	<i>e14⁻(McrA⁻), recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺),</i> <i>supE44, relA1, Δ(lac-proAB)</i> , [F': <i>traD36, proAB, lacI^qΔM15</i>] Wirt des Plasmids pET-9a Beschrieben von Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)	Stratagene
LR2/168	Genotyp nicht bestimmt (aus institutseigener Sammlung) Wirt des Plasmids pQE-8	DCB, UniBE

Zur Lagerung der *E. coli* Stämme über lange Zeit wurden zu einer Übernacht-Kultur Glycerin *ad* 15% Endkonzentration hinzugegeben, durch mehrmaliges Kippen des Röhrchens gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.1.2 Nährmedien

Nährmedium	Substanz	Menge	Lieferant
<u>LB</u>	LB-Bouillon, Lennox Die Herstellung von festem Nährmedium geschah durch Zugabe von 15 g/l Bacto TM Agar (Becton Dickinson).	20 g/l	Becton Dickinson

<u>SB</u>	Bacto™ Pepton	30 g/l	Becton Dickinson
	Bacto™ Hefe-Extrakt	20 g/l	Becton Dickinson
	MOPS	10 g/l (pH 7.0)	Fluka
<u>SOC</u>	Bacto™ Pepton	20 g/l	Becton Dickinson
	Bacto™ Hefe-Extrakt	5 g/l	Becton Dickinson
	Nach dem Lösen in 967.5 ml Ionentauscherwasser wurden folgende sterilfiltrierten Lösungen hinzugegeben:		
	NaCl	10 ml/l (1 M)	Merck
	KCl	2.5 ml/l (1 M)	Merck
	Nach dem Abkühlen der autoklavierten Lösung wurden folgende sterilfiltrierten Lösungen hinzupipettiert:		
	MgCl ₂	5 ml/l (1 M)	Merck
	MgSO ₄	5 ml/l (1 M)	Fluka
	Glucose	10 ml/l (2 M)	Fluka
<u>¹⁵N-M9</u>	¹⁵ NH ₄ Cl	1 g/l	Cambridge Isotope Labs
	Na ₂ HPO ₄	6 g/l	Merck
	KH ₂ PO ₄	3 g/l	Fluka
	NaCl	0.5 g/l	Merck
	Nach dem Lösen in 996 ml Ionentauscherwasser wurden 30 ml entnommen, 10 g Glucose darin gelöst und sterilfiltriert. Nach dem Abkühlen der autoklavierten Lösung wurden folgende sterilfiltrierten Lösungen hinzugegeben:		
	Glucose	10 g/l (10 g in 30 ml Lösung)	Fluka
	MgSO ₄	1 ml/l (1 M)	Fluka
	FeCl ₃	1 ml/l (2 mM)	Merck
	CaCl ₂	1 ml/l (0.1 M)	Merck
	Thiamin-HCl	1 ml/l (3 mM)	Merck

2.1.1.3 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung / Endkonzentration	Lieferant
Ampicillin	50 mg/ml → 2 µl/ml = 100 µg/ml	Applichem
Kanamycin	25 mg/ml → 1 µl/ml = 25 µg/ml	Sigma
Tetracyclin	5 mg/ml → 2.5 µl/ml = 12.5 µg/ml	Sigma

2.1.1.4 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Lieferant
pPLGKG	6515 bp, Tet ^r Trägt cDNA von hPg Beschrieben von Forsgren <i>et al.</i> (1987)	Hedén Lab, Lund, Schweden
pET-9a	4341 bp, Kan ^r Für Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) T7 Promotor von der IPTG-induzierbaren T7 Polymerase erkannt Beschrieben von Studier <i>et al.</i> (1990)	Promega
pQE-8	3427 bp, Amp ^r Für Expression in <i>E. coli</i> M15[pREP4] und SG13009[pREP4] N-terminal 6x-His codiert T5 Promotor von der <i>E. coli</i> RNA Polymerase erkannt Beschrieben von Stuber <i>et al.</i> (1990)	Qiagen

pREP4	3740 bp, Kan ^r In <i>E. coli</i> M15[pREP4] und SG13009[pREP4] vorhanden Der codierte <i>lacI</i> ^q Repressor reprimiert den T5 Promotor, der durch Zugabe von IPTG wieder zugänglich wird Beschrieben von Farabaugh (1978)	Qiagen
-------	--	--------

2.1.1.5 Enzyme

Enzym	Beschreibung	Konzentration	Sequenz	Lieferant
<i>AlwNI</i>	Restriktionsenzym	20 U/μl	5'-CAGNNN/CTG-3'	New England Biolabs
<i>BamHI</i>	Restriktionsenzym	10 U/μl	5'-G/GATCC-3'	Roche
<i>MfeI</i>	Restriktionsenzym	10 U/μl	5'-C/AATTG-3'	New England Biolabs
<i>NdeI</i>	Restriktionsenzym	20 U/μl	5'-CA/TATG-3'	New England Biolabs
<i>Pfu</i>	DNA Polymerase	2.9 U/μl	-	Promega
SAP	Phosphatase	1 U/μl	-	Roche
T4 DNA Ligase	DNA Ligase	3 U/μl	-	Promega

2.1.1.6 Marker

Marker	Banden	Lieferant
100 bp DNA Grössenstandard	1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp	Promega
1 kbp DNA Grössenstandard	12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75 bp	Invitrogen
λ-DNA	48502 bp (Restriktionsenzymtest)	Roche

2.1.1.7 Primer

Name	Sequenz
HXNK15 for	5'-CACGGATCCATAGAAGGAAGAGAGCCTCTGGATGACTATGTGAAT-3'
HXK15 for	5'-CACGGATCCATAGAAGGAAGATATCTCTCAGAGTGCAAGACT-3'
NK15 for	5'-GGAGATATACATATGGAGCCTCTGGATGACTATGTGAAT-3'
K15 for	5'-GGAGATTAGCATATGTATCTCTCAGAGTGCAAGACTGGGAAT-3'
HC back	5'-GCCGGATCCTTACTAGGCCGCACACTGAGGGACATCA-3'

Alle Primer wurden von der Microsynth GmbH (Balgach, SG) in HPLC-gereinigter Form bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden in sH_2O zu einer 100 μM Lösung aufgenommen und während 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach kurzem Mischen wurde die Stammlösung erneut während 3 Minuten bei 65°C inkubiert. Davon konnte eine Arbeitslösung von 20 μM hergestellt und bei -20°C für mehrere Monate gelagert werden.

2.1.1.8 Kits

Kit	Anwendung	Lieferant
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Plasmid isolation < 15 μg	Qiagen
Hi-Speed [™] Plasmid Midi Kit	Plasmid isolation < 200 μg	Qiagen
MinElute [™] Gel Extraction Kit	DNA-Isolation aus Agarosegelen	Qiagen

2.1.1.9 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Die Qualität der eingesetzten Substanzen war *purum* oder *puriss p.a.*:

Reagens / Lösung / Puffer	Beschreibung	Lieferant
Agarose		GibcoBRL
BSA	10x (1 mg/ml)	New England Biolabs
CaCl ₂	0.1 M	Merck
DNA-Ladepuffer	6x (0.8‰ Bromphenolblau, 0.8‰ Xylen- cyanol FF, 40% Saccharose)	Merck, Fluka, Fluka
dNTPs (PCR Nucleotid Mix)	40 mM (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, pH 7.5)	Promega
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml	Bio-Rad
Glycerin	87%	Merck
IPTG	>99%	Applichem
K-HEPES	1 mM, pH 7.0 (KOH)	Fluka
<i>Pfu</i> DNA Polymerase Puffer	10x (200 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 mM MgSO ₄ , 1.0% Triton® X-100, 1 mg/ml BSA, pH 8.8)	Promega
Puffer 4	10x (500 mM KAc, 200 mM Tris-Ac, 100 mM MgAc ₂ , 10 mM DTT, pH 7.9)	New England Biolabs
Puffer B	10x (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 10 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8.0)	Roche
SAP Puffer	10x (500 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl ₂ , pH 8.5)	Roche
T4 DNA Ligase Puffer	10x (300 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7.8)	Promega
TAE Puffer	50x (2 M Tris, 1 M Eisessig, 50 mM EDTA, pH 8.0)	Sigma, Merck, Fluka

2.1.1.10 Geräte

Gerät	Bemerkungen	Lieferant
Sorvallzentrifugen	RC5B Plus (Rotoren: GSA, SS34) RC3B Plus	Heraeus Heraeus
PCR Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Microphotometer	GeneQuant	Amersham
Elektroporator	Gene pulser® II	Bio-Rad
Sterilfilter	Millex®-GS, 0.22 µm	Millipore

2.1.2 Methoden

2.1.2.1 Plasmidisolierung aus *E. coli* und deren Sequenzierung

Plasmide bis zu einer Grösse von 50 kbp wurden je nach erwünschter Menge mittels Miniprep oder Midiprep von Qiagen isoliert:

Das QIAprep® Spin Miniprep Kit ist geeignet für Mengen bis zu 15 µg. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl sH₂O in einer Konzentration von 50-200 ng/µl eluiert.

Das HiSpeed™ Plasmid Midi Kit liefert bis zu 200 µg Plasmid-DNA. Das Elutionsvolumen in sH₂O betrug jeweils 500 µl mit einer Konzentration von 100-300 ng/µl.

Die DNA-Konzentrationen wurden auf Agarosegelen abgeschätzt und mit einem Microphotometer bestimmt.

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Microsynth GmbH in Balgach (SG) durchgeführt. Dazu wurde die Plasmid-DNA mit dem HiSpeed™ Plasmid Midi Kit von Qiagen isoliert. Ein 100 µl-Aliquot mit einer Konzentration von 0.2 µg/µl wurde an Microsynth gesandt.

2.1.2.2 DNA mit Restriktionsenzymen verdauen

Reagens	Menge [µl]					Anfangskonzentration
<i>AlwNI</i>	0.5	-	-	-	-	10 U
<i>BamHI</i>	-	1.0	-	-	1.0	10 U
<i>MfeI</i>	-	-	1.0	-	-	10 U
<i>NdeI</i>	-	-	-	0.5	0.5	10 U
Puffer B	-	2.0	-	-	2.0	10x
Puffer 4	2.0	-	2.0	2.0	-	10x
BSA	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	10x
DNA	x	x	x	x	x	100 fmol
sH ₂ O	ad 20.0	ad 20.0	ad 20.0	ad 20.0	ad 20.0	
Inkubation:	30 Minuten bei 37°C					
<i>NdeI</i>	-	-	-	0.5	0.5	10 U
Inkubation:	30 Minuten bei 37°C					
Stoppen:	4 µl DNA-Ladepuffer 6x					

Bei mehr eingesetzter DNA wurde auch die Menge an Restriktionsenzym entsprechend angepasst.

2.1.2.3 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Für die DNA-Isolation wurden jeweils 0.7 prozentige Agarosegele gegossen, während für die DNA-Analyse sowohl 0.7 als auch 1.0 prozentige Agarosegele hergestellt wurden:

Reagens	Menge für 1.0%	Menge für 0.7%
TAE Puffer 1x	50 ml	50 ml
Agarose	0.50 g	0.35 g

Die Suspension wurde mit dem Bunsenbrenner aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Lösung wurde auf etwa 60°C abgekühlt und vor dem Giessen mit 5 µl Ethidiumbromidlösung versetzt.

Puffer: TAE Puffer 1x
 Spannung: 150 V
 Dauer: 20 bis 30 Minuten

Das unter UV-Licht ausgeschnittene DNA-enhaltende Gelstück wurde gemäss dem MinElute™ Gel Extraction Kit von Qiagen behandelt. Die DNA wurde in 10 µl sH₂O eluiert, mit einer Rückgewinnungsrate von 50-90%, je nach Geldichte und Grösse des Fragments.

2.1.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

	Reagens	Menge [µl]	Anfangskonzentration
Mastermix	<i>Pfu</i> DNA Polymerase Puffer	5.0	10x
	dNTPs	1.0	je 10 mM
	sH ₂ O	ad 50.0	(Gesamtvolumen)

Ansatz	Primer (* for)	1.25	20 µM
	Primer (HC back)	1.25	20 µM
	DNA pPLGKG (linear)	1.0	10 fmol
Polymerase	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	1.0	2.9 U

Der Mastermix, der Ansatz und die Polymerase wurden vereinigt und durch pipettieren gut gemischt.

	# Zyklen	Beschreibung	Temperatur	Zeit
Programm	1x	Denaturierung	96°C	5 Minuten
	35x	Denaturierung	96°C	1 Minute
		Hybridisierung	60°C	1 Minute
		Elongation	72°C	4 Minuten
	1x	Endextension	72°C	10 Minuten

Die *Pfu* DNA Polymerase von *Pyrococcus furiosus* ist eine DNA-abhängige DNA Polymerase und besitzt eine „proofreading“ Funktion (3'⇒5' Exonucleaseaktivität), die zu einem hohen Verlässlichkeitsgrad des synthetisierten DNA-Strangs führt.

2.1.2.5 Dephosphorylieren von DNA mit „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP)

Reagens	Menge [µl]	Anfangskonzentration
SAP	1.0	1 U
SAP Puffer	1.0	10x
DNA (Plasmid)	8.0	<1 pmol / <0.2 pmol

Inkubation: 10 Minuten bei 37°C

Inaktivierung: 15 Minuten bei 65°C

Im Gegensatz zu CIP („calf intestinal phosphatase“) ist SAP („shrimp alkaline phosphatase“) vollständig und irreversibel durch Hitzebehandlung inaktivierbar. 1 U SAP kann in 10 Minuten bis zu 1 pmol 5'-„sticky ends“ und in 60 Minuten bis zu 0.2 pmol 5'-„blunt ends“ dephosphorylieren.

2.1.2.6 DNA ligieren mit T4 DNA Ligase

Reagens	Menge [µl]	Anfangskonzentration
T4 DNA Ligase	0.5	1.5 U
T4 DNA Ligase Puffer	1.0	10x
DNA (Plasmid)	x	100 ng
DNA (Insert)	y	50-500 ng
sH ₂ O	ad 10.0	

Inkubation: 16 Stunden bei 16°C

Je nach gewünschtem Insert / Plasmid-Verhältnis wurde der Anteil an Insert-DNA variiert.

2.1.2.7 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

2.1.2.7.1 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Zellen wurden 20 ml LB Medium mit einer 5 ml Übernacht-Kultur angeimpft und solange bei 37°C wachsen gelassen, bis die OD₆₀₀ zwischen 0.6 und 0.8 lag. Die Kultur wurde anschliessend 5 Minuten auf Eis gelagert. Alle nachfolgenden Schritte waren nun ausschliesslich gekühlt oder auf Eis durchzuführen. 15 ml Kultur wurden in einer Laborzentrifuge 5 Minuten bei 4°C mit 3000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 7.5 ml CaCl₂ 0.1 M aufgenommen und erneut 5 Minuten bei 4°C mit 3000 g zentrifugiert. Das lose Pellet wurde dann in 1.5 ml CaCl₂ 0.1 M aufgenommen, in 200 µl-Portionen aliquotiert und die kompetenten Zellen mindestens 30 Minuten auf Eis gelagert. Falls man die Zellen nicht direkt für eine Transformation weiterverwenden wollte,

konnte man hier unterbrechen, indem die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden und bei -80°C gelagert wurden. So waren sie mehrere Monate haltbar.

Um die chemisch-kompetenten Zellen zu transformieren wurden sie mit 10-40 fmol (4-10 µl Ligationsansatz) DNA versetzt und 30 Minuten auf Eis gelagert. Als Positivkontrolle wurde pQE-8 in der „supercoiled“-Form eingesetzt und als Negativkontrolle keine DNA dazugegeben. Danach wurden die Zellen 30 Sekunden bei 42°C erhitzt, mit 1 ml LB Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. 100 µl der transformierten Zellen wurden auf LB Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgeplattet, das restliche Volumen kurz zentrifugiert, um das Pellet in 100 µl LB Medium aufzunehmen und ebenfalls auf gleichen Nährböden auszustreichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.1.2.7.2 Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 200 ml LB Medium mit einer 5 ml Übernacht-Kultur angeimpft und solange bei 37°C wachsen gelassen, bis die OD₆₀₀ zwischen 0.6 und 0.8 lag. Alle nachfolgenden Schritte waren nun ausschliesslich gekühlt oder auf Eis durchzuführen. Die Zellen wurden in einen Sorvallbecher überführt und 30 Minuten auf Eis gekühlt. Anschliessend wurde die Kultur während 15 Minuten bei 4°C mit 4000 g im GSA-Rotor der Sorvallzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abdekantiert und gut abgetropft. Das Pellet wurde in 100 ml eisgekühltem K-HEPES 1 mM aufgenommen und erneut während 15 Minuten bei 4°C mit 4000 g im GSA-Rotor der Sorvallzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde wie oben beschrieben verworfen und das Pellet in 50 ml eisgekühltem K-HEPES 1 mM aufgenommen. Nach einer weiteren wie oben beschriebenen Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 10 ml eisgekühltem Glycerin 10% aufgenommen und in ein kleines Sorvallröhrchen überführt. Die Suspension wurde während 10 Minuten bei 4°C mit 1500 g im SS34-Rotor der Sorvallzentrifuge mit ausgeschalteter Bremse pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 300 µl eisgekühltem Glycerin 10% durch leichtes Rotieren des Röhrchens resuspendiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden zu 40 µl-Portionen aliquotiert und auf Eis gelagert. Falls man die Zellen nicht direkt für eine Elektroporation weiterverwenden wollte, konnte man hier unterbrechen, indem die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden und bei -80°C gelagert wurden. So waren sie mehrere Monate haltbar.

Um die elektrokompetenten Zellen zu transformieren wurde die Zellsuspension in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette einer Schichtdicke von 2 mm transferiert und mit 1-4 fmol (1 µl Ligationsansatz) DNA versetzt. Als Positivkontrolle wurde pQE-8 in der „supercoiled“-Form eingesetzt und als Negativkontrolle keine DNA dazugegeben. Die Küvette wurde in den Elektroporator zwischen die leitenden Platten gestellt, zugedeckt und ein Puls gegeben. Die Einstellungen waren 2.5 kV, 25 µF und 400 Ω was zu Pulszeiten zwischen 7.5 und 9 ms führte. Die transformierten Zellen wurden sofort in 1 ml auf 37°C vorgewärmtes SOC Medium aufgenommen und zu weiteren, ebenfalls vorgewärmten 2 ml SOC Medium in ein Falconröhrchen gegeben. Nach 1 Stunde Inkubation bei 37°C auf einem Schüttler wurden 7 ml auf 37°C vorgewärmtes SLB Medium dazugegeben und eine weitere Stunde inkubiert. 10, 100 und 1000 µl wurden auf LB Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die restlichen 9 ml wurden mit Antibiotika versetzt und ebenfalls über Nacht bei 37°C weiterinkubiert.

Die Transformationsraten waren normalerweise in der folgenden Grössenordnung:

10⁶-10⁷ für chemisch-kompetente Zellen (CaCl₂-Methode)

10⁸-10⁹ für gekaufte chemisch-kompetente Zellen

10⁹-10¹⁰ für elektrokompetente Zellen

wobei sich die Angaben auf die Anzahl Kolonien pro µg „supercoiled“ DNA beziehen.

2.1.2.8 Expression in *E. coli* Zellen

2.1.2.8.1 Expression in 100 ml LB Medium

5 ml LB Medium wurden mit den gewünschten Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 220 rpm inkubiert. Für die Wachstumsphasen wurden 100 ml LB Medium mit den 5 ml Übernacht-Kultur inokuliert und während 3 Stunden weiterhin bei 37°C und 220 rpm wachsen gelassen. 10 ml der Kultur wurden entnommen und in einer Laborzentrifuge während 10 Minuten mit 3000 g bei 4°C pelletiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Der Kultur wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Für die Expressionsphase wurden die Zellen weitere 3 Stunden bei 37°C mit 220 rpm geschüttelt. 10 ml der Kultur sowie die restlichen 80 ml wurden wie oben beschrie-

ben pelletiert und direkt weiterverwendet oder bei -80°C aufbewahrt. Die beiden 10 ml Proben dienten als Kontrolle der Stimulation durch IPTG nach SDS-PAGE Analyse.

2.1.2.8.2 Expression in 2 l LB Medium

5 ml LB Medium wurden mit den gewünschten Zellen angeimpft und während 8 Stunden bei 37°C im Schüttler bei 220 rpm inkubiert. 100 ml LB Medium wurden am Abend 1:100 mit der Starterkultur inokuliert und über Nacht weiterhin bei 37°C und 220 rpm wachsen gelassen. Für die Wachstumsphase wurden zweimal 1 l LB Medium mit je 30 ml Übernacht-Kultur angeimpft und bei 37°C und 220 rpm solange wachsen gelassen bis die OD₆₀₀ etwa 0.8 betrug. Nach 5 Stunden wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Für die Expressionsphase wurden die Zellen 5 Stunden bei 37°C oder - je nach Konstrukt - 18 Stunden (über Nacht) bei 20°C und 220 rpm wachsen gelassen. Die Zellen wurden in tarierte 1 l Sorvallbecher transferiert und in einer Sorvallzentrifuge RC3B Plus während 30 Minuten bei 4°C mit 8000 g pelletiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das nasse Zellpellet gewogen, wobei die Ausbeute jeweils ca. 3 g/l (5 Stunden) bis 5 g/l (über Nacht) betrug. Die Zellpellets wurden entweder direkt weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

2.1.2.8.3 Expression in 6 l ¹⁵N-M9 Medium

5 ml LB Medium wurden mit den gewünschten Zellen angeimpft und während 8 Stunden bei 37°C im Schüttler bei 220 rpm inkubiert. 300 ml ¹⁵N-M9 Medium wurden am Abend mit den 5 ml Starterkultur inokuliert und über Nacht weiterhin bei 37°C und 220 rpm wachsen gelassen. Für die Wachstumsphase wurden sechsmal 1 l ¹⁵N-M9 Medium mit je 40 ml Übernacht-Kultur angeimpft und bei 37°C und 220 rpm solange wachsen gelassen bis die OD₆₀₀ etwa 0.7 betrug. Nach 4.5 Stunden wurde IPTG zu einer Endkonzentration von 2 mM zugegeben. Für die Expressionsphase wurden die Zellen 5.5 Stunden bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden in tarierte 1 l Sorvallbecher transferiert und in einer Sorvallzentrifuge RC3B Plus während 30 Minuten bei 4°C mit 8000 g pelletiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das nasse Zellpellet gewogen, wobei die Ausbeute jeweils ca. 2 g/l betrug. Die Zellpellets wurden entweder direkt weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

2.2 Proteinchemie

2.2.1 Material

2.2.1.1 Antikörper

Antikörper	Art	Konzentration	Lieferant
sheep anti-hPg (HRP-gekoppelt)	Polyklonal	5 mg/ml	Anawa

2.2.1.2 Marker

Marker	Banden	Lieferant
SDS-PAGE Grössenstandard	97.2, 66.4, 42.8, 29.0, 20.0, 14.2 kDa	Amersham

2.2.1.3 Kits

Kit	Anwendung	Lieferant
Ni-NTA Spin Kit	Isolation von 6xHis-Proteinen < 150 µg	Qiagen
TNT [®] T7 Quick Coupled Transcription / Translation System Kit	<i>In vitro</i> Transkriptions- / Translations-system aus Kaninchen-Reticulocytenlysate	Promega
<i>E. coli</i> T7 S30 Extract System for Circular DNA Kit	<i>In vitro</i> Transkriptions- / Translations-system aus <i>E. coli</i>	Promega

2.2.1.4 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Die Qualität der eingesetzten Substanzen war *purum* oder *puriss p.a.*, für die Analytik sogar „sequencing grade“:

Reagens / Lösung / Puffer	Beschreibung	Lieferant
Acrylamidlösung	30% Acrylamid/Bis, 37.5:1	Bio-Rad
Ameisensäure		Merck
6-AHA-Lösung	200 mM 6-Aminohexansäure in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8.5	Merck
APS-Lösung	10% Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
AS-EDTA-Lösung	7 mM EDTA (für AS-Analyse)	Merck
AS-HCl-Lösung	6 M HCl mit 0.1% Phenol	Romil, Merck
AS-Puffer A	40% MeOH, 20% Triethylamin	Merck, Pierce
AS-Puffer B	77% MeOH, 11% Triethylamin, 1% Phenylisothiocyanat	Merck, Pierce, Fluka
AS-RP-HPLC-Laufmittel A	4% Acetonitril, 0.14 M Ammoniumacetat, 13 µM DTT, 0.575% Triethylamin, pH 6.4	Merck, Fluka, Fluka, Pierce
AS-RP-HPLC-Laufmittel B	60% Acetonitril	Merck
Bio-Gel	Bio-Gel® P-300	Bio-Rad
Complete EDTA-free	Proteaseinhibitorenmix	Roche
Coomassie-Färbelösung	1x Coomassie R-250 Staining Solution	Bio-Rad
DTT	1,4-Dithio-DL-treitol	Fluka
ECL Plus A	Lumigen™ PS-3 Detektionsreagens A	Amersham
ECL Plus B	Lumigen™ PS-3 Detektionsreagens B	Amersham
EDTA-Lösung	0.1 M EDTA, pH 8	Fluka
Elutionspuffer	20 mM Tris, 0.3 M NaCl, 0.5 M Imidazol, pH 8.5	Sigma, Merck, Fluka
Entfärbelösung	50% MeOH, 10% Eisessig	beide Merck
Glutathion	oxidierte Form reduzierte Form	Sigma
Gu-Puffer	6 M Gu-HCl, 20 mM Tris, 0.3 M NaCl, 5 mM Imidazol, 5 mM 2-Mercaptoetha- nol, pH 8.5	Fluka, Sigma, Merck, Fluka, Bio-Rad
Gu-HCl-Puffer	6 M Gu-HCl, 0.1 M NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, diverse pH	Fluka, Merck, Sigma
HCl-Lösung	0.3 M	Merck
Hydrazinhydroxidlösung	80%	Merck
Kammerpuffer	5x (0.5 M Tricin, 0.5 M Tris, 15 mM SDS)	Applichem, Sigma, Fluka
Ladepuffer nach Lämmli	2x (62.5 mM Tris-HCl, 25% Glycerin, 2% SDS, 0.1% Bromphenolblau, pH 6.8)	Bio-Rad
Lysinlösung	4.7 M L-Lysin-HCl in 0.2 M Na ₂ CO ₃	Merck Merck
2-Mercaptoethanol		Bio-Rad
³⁵ S-Methionin	5 mCi/ml	Hartmann Analytik
mQH ₂ O-pH3.5	5 l milliQ Wasser, mit einigen Tropfen HCOOH auf pH 3.5 einstellen	Millipore Merck
NaCl-Lösung	0.1 M und 0.9% NaCl	Merck
NaOH-Lösung	4 M	Fluka
Nativ-Puffer	20 mM Tris, 0.3 M NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8.5	Sigma, Merck, Fluka

Natriumazid		Merck
Natriumnitritlösung	1 M	Merck
Natriumphosphatpuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 8.5	Merck
NH ₄ Cl/NH ₃ -Lösung	2 M Ammoniumchlorid / Ammoniak, pH 8.8	beide Merck
Ni-Lösung	0.1 M NiSO ₄	Merck
Non-Fat-Dry-Milk-Lösung	5% und 0.5% in PBST	Bio-Rad
PBST	1x (10 mM Phosphate buffered saline (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl), 0.5% Tween 20, pH 7.4)	Sigma
Ponceau S-Lösung	1x (0.2% Ponceau S, 3% Trichloressigsäure, 3% Sulfosalicylsäure)	Sigma
PVDF Membran	Invitrolon PVDF, 0.45 µm	Invitrogen
Regenerationspuffer	6 M Gu-HCl, 0.2 M Essigsäure	Fluka, Merck
RP-HPLC-Laufmittel A	0.1% TFA oder 0.5% HCOOH	Fluka Merck
RP-HPLC-Laufmittel B	0.1% TFA, 80% Acetonitril oder 0.5% HCOOH, 80% Acetonitril	Fluka, Merck beide Merck
Sammelgelpuffer	0.5 M Tris, 0.25 M H ₃ PO ₄	Sigma, Merck
SDS-Lösung	2% und 10%	Fluka
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Bio-Rad
Transferpuffer	1x (40 mM Tricin, 50 mM Tris, 1 mM SDS, 20% MeOH)	Applichem, Sigma, Fluka, Merck
Tris-pH8	50 mM Tris, pH 8	Sigma
Trenngelpuffer	3 M Tris, 0.5 M HCl	Sigma, Merck
Urea-Puffer	6 M Harnstoff, 20 mM Tris, 0.3 M NaCl, 5 mM Imidazol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8.5	Merck, Sigma, Merck, Fluka, Bio-Rad

2.2.1.5 Geräte

Gerät	Bemerkungen	Lieferant
French press	French [®] pressure cell press 30 ml Zelle <40'000 psi	SLM Aminco [®]
Ultraschallgerät	Sonicator SonoPlus-Becher	MSE
Chromatographiersystem	Äkta [™] prime HiTrap [™] Chelating HP Säule: 5 ml HiTrap [™] Desalting Säule: 5 ml HiPrep [™] 26/10 Desalting Säule: 53 ml	Amersham
Fraktioniersystem	GradiFrac LKB pump P-1 LKB optical unit UV-1	Amersham
Entwickler	FPM-100A	Fuji
Autoradiographiefilm	Biomax MR	Kodak
PAGE-Zelle	Mini Protean [™] II	Bio-Rad
Scanner	FLA-3000	Fuji
RP-HPLC System	HP 1090 Aquapore Butyl Säule: 7 µm, 2.1 x 100 mm	Agilent Technologies
AS-RP-HPLC System	HP 1090L Nova-Pak Säule: C ₁₈ , 4 µm, 3.9 x 150 mm	Agilent Technologies

Sequenator	Procise™ 492 cLC PTH Säule: 5 µm, 0.8 x 250 mm Steuerung: Procise™ 1.1	Applied Biosystems
ESI-MS	VG Plattform Single Quadrupol Mass Spectrometer Steuerung: Mass Lynx™ 3.2	Micromass
Fluoreszenzspektrometer	LS 50 B Steuerung: FLWINLAB Quarzküvette: 1 ml	Perkin Elmer

2.2.2 Methoden

2.2.2.1 Aufschluss der Zellen

2.2.2.1.1 Denaturierender Zellaufschluss von 10 ml Proben aus Kleinansätzen (siehe 2.1.2.8.1)

Die Zellpellets der entnommenen 10 ml Proben einer 100 ml Expression wurden in 500 µl eisgekühltem Tris 50 mM pH 8 aufgenommen und 30 Sekunden zentrifugiert. Die Pellets wurden in 97.5 µl 1x Ladepuffer nach Lämmli unter Zugabe von 2.5 µl 2-Mercaptoethanol während 20 Sekunden auf dem Vortex resuspendiert. Nach 5-minütigem Kochen der Proben bei 95°C wurden sie für 2 Minuten im Ultraschallwasserbad beschallt und schliesslich 10 Minuten in einer Eppendorfszentrifuge mit 20'000 g zentrifugiert. Die Überstände konnten auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen werden.

2.2.2.1.2 Denaturierender Zellaufschluss von Grossansätzen (siehe 2.1.2.8.2-3)

Das Zellpellet aus einem Liter im Falle einer 2 l LB Expressionskultur wurde in 5 ml Gu-HCl-Puffer pH 8.5 pro Gramm Zellpellet aufgenommen und in einen 250 ml Sorvallbecher übergeführt. Falls es sich um eine 6 l ¹⁵N-M9 Expressionskultur handelte, wurden die Pellets aus zwei Litern entsprechend den obigen Angaben aufgenommen und vereinigt. Die Zellen wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter ständigem Rühren lysiert und anschliessend mit der Sorvallzentrifuge RC5B Plus im GSA-Rotor während 30 Minuten bei 4°C mit 20'000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und weiterverwendet.

2.2.2.1.3 Nativer Zellaufschluss

Das Zellpellet aus einem Liter einer Expression wurde in 5 ml Nativ-Puffer pH 8.5 pro Gramm Zellpellet aufgenommen, in einen 250 ml Sorvallbecher transferiert und mit einer Tablette complete EDTA-free versetzt. Die Zellen wurden zweimal in der French press mit der 30 ml Zelle bei 16'000 psi aufgebrochen. Darauf folgte eine fünfminütige Ultraschallbehandlung auf Eis mit dem Ultraschallstab in einem SonoPlus-Becher bei 8-10 microns, um einen maximalen Zellaufschluss zu erzielen. Das Lysat wurde mit der Sorvallzentrifuge RC5B Plus im GSA-Rotor während 30 Minuten bei 4°C mit 20'000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und weiterverwendet.

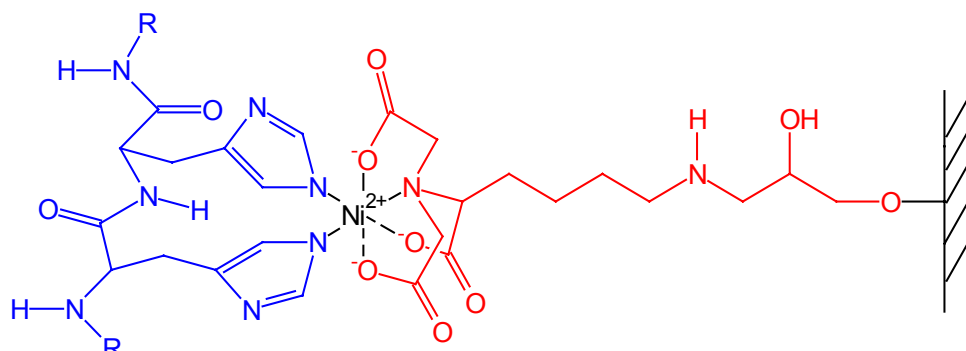
2.2.2.2 Metallchelataffinitätschromatographie

2.2.2.2.1 Binden von Ni²⁺-Ionen an chelatbildende Matrizen

Die an eine Matrix gebundene Nitrilotriessigsäure (NTA) besetzt vier der insgesamt sechs vorhandenen Koordinationsstellen des Ni²⁺-Ions, womit eine genügend starke elektrostatische Bindung sogar unter Verwendung hoher Salzkonzentrationen gewährleistet ist. Damit können drei benachbarte Ni²⁺-Ionen eine sechsfache Histidinsequenz von Proteinen mit den jeweils zwei noch „freien“ von Wasser besetzten Koordinationsstellen binden.

Zwei verschiedene Desorptionsverfahren der 6xHis-Proteine von den Ni-NTA-Matrizen können angewendet werden. Die 6xHis-Proteine binden bei pH-Werten über 6.0 an die Ni²⁺-Ionen. Unter basischen Bedingungen ist der an das Ni²⁺ bindende Imidazolrest der Histidinreste ungeladen. Wenn der pH unter 6.0 sinkt, wird der Imidazolrest, dessen pK_A-Wert 6.0 beträgt, an einem Stickstoff protoniert. Das am einsamen Elektronenpaar des Stickstoffs gebundene Ni²⁺ wird durch ein Proton substituiert, womit

die Histidinreste ihre Affinität zur Ni^{2+} -chelatierenden Matrix verlieren und die Proteine eluiert werden können. Statt die 6xHis-Proteine pH-abhängig abzulösen, können die Histidinreste auch mit einer 0.5 M Lösung des Strukturanalogs Imidazol von den Ni^{2+} -Ionen verdrängt werden und somit die Proteine ebenfalls eluiert werden.



Ni-NTA-Chelat

NTA-Agarose besteht aus NTA, welche an eine Sepharose® CL-6B Matrix gekoppelt ist. Diese kann 5-10 mg 6xHis-Proteine pro ml Ni-NTA-Agarose binden. In der NTA-Superflow ist die NTA an eine komprimierbare Superflow™ Matrix gekoppelt. Damit kann die mit NTA-Superflow bepackte Säule im Gegensatz zur frei fließenden NTA-Agarose Säule mit Druck betrieben werden, ohne eine reduzierte Bindungskapazität in Kauf nehmen zu müssen. Anstatt NTA-Superflow wurde eine mit Ni^{2+} -beladene HiTrap™ Chelating HP Säule auf dem Äkta™ prime System verwendet. Die Matrix besteht aus einer Chelating Sepharose™ High Performance mit Iminodiessigsäureresten. NTA-Silica ist in dem erhältlichen Ni-NTA Spin Kit vorhanden, in welchem die Matrix aus einem makroporösen Silikat besteht. Die Bindungskapazität von 6xHis-Proteinen von solchen vorgepackten Säulen beträgt 150 µg.

Programm zum Laden der 5ml HiTrap™ Chelating HP Säule auf dem Äkta™ prime System:

Volumen [ml]	Fluss [ml/min]	%B	Ventilposition	Laufmittel	Säulenvolumen
0	5	0	5	Regenerationspuffer	2
10	5	0	1	mQH ₂ O	5
35	5	0	2	SDS-Lösung 2%	3
50	5	0	1	Gradient mQH ₂ O/EtOH	5
75	5	100	1	EtOH	5
100	5	100	1	Gradient EtOH/mQH ₂ O	5
125	5	0	1	mQH ₂ O	1
130	5	0	3	EDTA-Lösung	5
155	5	0	1	mQH ₂ O	5
180	5	0	4	Ni-Lösung	3
195	5	0	1	mQH ₂ O	1
200	5	0	5	Regenerationspuffer	2
210	5	0	1	mQH ₂ O	8
250	END	END	END	END	END

2.2.2.2.2 pH-abhängige Proteinreinigung mittels Ni-Affinität

Analytische Mengen wurden mittels Ni-NTA-Spin Kit gereinigt. Dazu wurde wenig Überstand vom Zelllysat in Gu-HCl-Puffer pH 8.5 gemäß der Anleitung auf die Säule geladen. Gewaschen wurde mit Gu-HCl-Puffer in drei pH-Stufen von 8.5, 6.3 und 5.9. Eluiert wurde mit zweimal 100 µl Gu-HCl-Puffer pH 4.5. Das Eluat konnte für die Analyse mittels RP-HPLC, Aminosäurezusammensetzung, Sequenzierung und ESI-MS weiterverwendet werden.

Präparative Mengen wurden auf dem ÄKTA prime System gereinigt. Dazu wurde der Überstand aus dem denaturierenden Zellaufschluss auf die frisch mit Ni^{2+} -Ionen beladene und mit Gu-HCl-Puffer pH 8.5 konditionierte HiTrap™ Chelating HP Säule mit einer Flussrate von 1.0 ml/min geladen. Mit Gu-HCl-Puffer wurde in drei pH-Stufen von 8.5, 6.3 und 5.9 mit einer Flussrate von 5.0 ml/min gewaschen, bis die gemessene Absorption bei 280 nm einen konstanten Wert anzeigte. Das gebundene

Material wurde mit Gu-HCl-Puffer pH 4.5 mit 5.0 ml/min von den Ni^{2+} -Ionen abgelöst und das Eluat der Absorption entsprechend gesammelt und für die Rückfaltung weiterverwendet. Zunächst wurde der pH-Wert des Eluats auf 8.5 eingestellt. Nach der Zugabe von DTT zu einer Endkonzentration von 5 mM wurde die Proteinlösung zur vollständigen Reduktion der Disulfidbrücken über Nacht bei 4°C gerührt. Während 6 Stunden wurden 4 Volumina 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.5 mit je 1.25 mM oxidiertem und reduziertem Glutathion unter Rühren bei 4°C hinzugetropft. Fünfmal wurde die Lösung gegen 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.5 bei 4°C dialysiert, wobei alle 24 Stunden das Dialysewasser gewechselt wurde. Das Dialysat wurde in der Laborzentrifuge mit 3000 g während 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um ausgefallenes Protein zu pelletieren. Der Überstand wurde gesammelt und weiterverwendet.

2.2.2.2.3 Rückfaltende Proteinreinigung mittels Ni-Affinität

Im Gegensatz zur pH-abhängigen Reinigung enthielten die denaturierenden Puffer zusätzlich 5 mM 2-Mercaptoethanol. Durch graduellen Entzug der reduzierenden und denaturierenden Reagenzien konnte eine Rückfaltung und Renaturierung auf der Säule erfolgen. Hierzu wurde der Überstand aus dem denaturierenden Zellaufschluss auf die frisch mit Ni^{2+} -Ionen beladene und mit Gu-Puffer pH 8.5 konditionierte HiTrap™ Chelating HP Säule mit einer Flussrate von 1.0 ml/min geladen. Das Programm für die Rückfaltung auf dem Äkta™ prime System sah wie folgt aus:

Volumen [ml]	Fluss [ml/min]	%B	Ventilposition	Laufmittel	Säulenvolumen
0	5	0	1	Gu-Puffer	10
50	5	0	4	Urea-Puffer	15
125	2.5	0	4	Gradient Urea-Puffer / Nativ-Puffer	30
275	5	100	4	Nativ-Puffer	20
375	5	100	5	Gradient Nativ-Puffer / Elutionspuffer	20
475	5	0	5	Elutionspuffer	10
525	END	END	END	END	END

Die Protein-enhaltenden Fraktionen wurden der Absorption bei 280 nm entsprechend vereinigt und weiterverwendet.

2.2.2.2.4 Native Proteinreinigung mittels Ni-Affinität

Der Überstand aus dem nativen Zellaufschluss wurde auf die frisch mit Ni^{2+} -Ionen beladene und mit Nativ-Puffer pH 8.5 konditionierte HiTrap™ Chelating HP Säule mit einer Flussrate von 1.0 ml/min geladen. Mit Nativ-Puffer pH 8.5 wurde mit einer Flussrate von 5.0 ml/min gewaschen, bis die gemessene Absorption bei 280 nm einen konstanten Wert anzeigte. Das gebundene Material wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 5.0 ml/min mit einem steigenden Gradienten von 5%/min Elutionspuffer durch das darin enthaltene Imidazol von den Ni^{2+} -Ionen abgelöst und das Eluat der Absorption entsprechend gesammelt und weiterverwendet.

2.2.2.3 Affinitätschromatographie auf Lysin-Bio-Gel

2.2.2.3.1 Herstellung von Lysin-Bio-Gel

Kringel 1, 2, 4 und 5 des humanen Plasminogens binden ω -Aminosäuren wie Lysin. Diese Eigenschaft kann man sich bei der Isolation von Plasminogen und deren Kringel-enhaltenden Fragmenten zu nutze machen, indem man an eine Bio-Gel-Matrix Lysin koppelt und dann mit kringelhaltigem Protein belädt. Die Elution des Proteins erfolgt mit einem Überschuss an 6-Aminohexansäure (6-AHA), einem Lysinanalogon, welches Lysin in den Bindungsstellen der Kringel verdrängt.

In einem ersten Schritt wurde die Bio-Gel-Matrix bestehend aus Polyacrylamidresten in reaktive Hydrazinderivate überführt. Dazu wurden 20 g Bio-Gel über Nacht in mQH_2O (ca. 700 ml) gequollen. Nach Bestimmung des Volumens (ca. 600 ml) des gequollenen Bio-Gels wurde es abgenutscht und mit der 1.3-fachen Menge mQH_2O in einen 2.5 l Sulfierkolben gespült. Bei 47°C wurden 635 ml vorgewärmte Hydrazinhydroxidlösung zugegeben und unter Rühren während 6 Stunden reagieren gelassen. Danach wurde das Hydrazin-Bio-Gel mit einer 0.1 M NaCl-Lösung hydrazinfrei gewaschen.

Im zweiten Schritt wurde das Lysin an das Bio-Gel gekoppelt. Dazu wurde das Hydrazin-Bio-Gel abgenutscht und in einem Eisbad in 975 ml 0.3 M HCl-Lösung resuspendiert. Unter pH-Kontrolle sowie starkem Rühren wurden 130 ml Natriumnitritlösung zugegeben. Nach 90 Sekunden wurden 585 ml Lysinlösung zugegeben und der pH sofort mit 4 M NaOH-Lösung (ca. 120 ml) auf 9.4 eingestellt. Nach zweistündiger Reaktion bei 4°C wurde das Lysin-Bio-Gel abgenutscht und mit 10 l mQH₂O neutral gewaschen. Das Lysin-Bio-Gel wurde mit 1.5 l NH₄Cl/NH₃-Lösung versetzt und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Mit 15 l einer 0.9% NaCl-Lösung wurde das Lysin-Bio-Gel gewaschen und in einer 0.9% NaCl-Lösung mit einer Spatelspitze Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.3.2 Proteinreinigung mittels Lysinaffinität

Die Proteinlösung in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8.5 wurde auf eine konditionierte, frei fließende 10 ml Lysin-Bio-Gel Säule geladen und mit Natriumphosphatpuffer gewaschen bis die gemessene Absorption bei 280 nm einen konstanten Wert anzeigte. Das gebundene Material wurde mit 200 mM 6-Aminohexansäurelösung (6-AHA) von der Lysin-Bio-Gel-Matrix abgelöst und das Eluat der Absorption entsprechend gesammelt.

Gebundenes 6-AHA konnte anschliessend unter leicht sauren Bedingungen abgelöst werden. Dazu wurde das Eluat viermal gegen je 5 l mQH₂O-pH3.5 dialysiert, wobei alle 12 Stunden das Dialysewasser gewechselt wurde. Der pH wurde jeweils mit Ameisensäure eingestellt. Diese wurde aus zwei Gründen der Salzsäure vorgezogen: Erstens ist die Ameisensäure bei der anschliessenden Lyophilisation flüchtig und zweitens ist von de Vos *et al.* (1992) gezeigt worden, dass die Kringel eine Affinität zu Chloridionen besitzen und damit deren Löslichkeit stark herabsetzen. Zudem wird von Cl⁻ der „T-state“ (tight conformation) des Glu¹-Pg induziert, wie von McCance und Castellino (1995) gezeigt.

2.2.2.4 *In vitro* Transkription / Translation

Die beiden verwendeten Kits dienen der *in vitro* Transkription / Translation in einem einzigen Ansatz und sind für Vektoren geeignet, die das zu exprimierende Gen nach einem T7 Promotor eingefügt haben. Das Gen wird transkribiert und mittels radioaktiv markiertem ³⁵S-Methionin zu autoradiographisch detektierbaren Mengen transliert. Es wurden die beiden Systeme aus *E. coli* und aus Kaninchen-Reticulocytenlysate verwendet, entsprechend prokaryontischer und eukaryontischer Transkription / Translation.

Folgende Transkriptions- / Translationsansätze zu 25 µl wurden zusammenpipettiert:

Reagens	<i>E. coli</i> System [µl]	Reticulocytensystem [µl]
S30 Premix ohne AS	10	-
T7 S30 Extrakt (supercoiled)	7.5	-
AS-Mix ohne Methionin	2.5	-
TNT [®] T7 Quick Mastermix	-	20
³⁵ S-Methionin	2	2
DNA (supercoiled)	2	2
sH ₂ O (Nuclease-frei)	1	1

Die Ansätze wurden während 90 Minuten bei 37°C (*E. coli* System) oder 30°C (Reticulocytensystem) inkubiert. Je 1 µl (*E. coli* System) oder 2 µl (Reticulocytensystem) der Proben wurden mit sH₂O auf 10 µl ergänzt und im Verhältnis 1:1 mit 2x Ladepuffer nach Lämmli unter Zugabe von 2.5% 2-Mercaptoethanol gemischt. Nach 10-minütiger Hitzebehandlung bei 70°C, wurden die Proben während 2 Minuten in einer Eppendorfzentrifuge mit 20'000 g zentrifugiert. Der Überstand konnte auf ein wie unter 2.2.2.5 beschriebenen SDS-Polyacrylamidgel geladen werden. Allerdings wurde die Elektrophorese nur solange durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront kurz vor dem Auslaufen war. Das Gel wurde anschliessend wie unter 2.2.2.5 mit Coomassieblau gefärbt, während 15 Minuten in Ionentauscherwasser äquilibriert und auf einem Geltdrockner bei 80°C am Vakuum während 2 Stunden getrocknet. Während 16 Stunden wurde das Gel auf einem Biomax MR Autoradiographiefilm exponiert und auf dem Entwickler FPM-100A entwickelt.

2.2.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die zu analysierenden Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit 2x Ladepuffer nach Lämmli unter Zugabe von 2.5% 2-Mercaptoethanol gemischt, 10 Minuten bei 95°C gekocht und 10 Minuten in einer Eppendorfschüttelmaschine mit 20'000 g zentrifugiert. Die Überstände konnten auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen werden.

Zur Herstellung der 0.75 mm dicken Gele in Mini Protean™ II Zellen wurden folgende Lösungen pipettiert:

Reagens	Trenngel 10% [µl]	Sammelgel 3% [µl]
mQH ₂ O	2650	2300
Trenngelpuffer	625	-
Sammelgelpuffer	-	375
SDS-Lösung 10%	50	30
Acrylamidlösung 30%	1650	300
TEMED	4	4
APS-Lösung 10%	25	25

Damit die katalysierte Polymerisation nicht schon im Reagenzglas ablief, wurde erst kurz vor dem jeweiligen Giessen die APS-Lösung hinzupipettiert.

Puffer: Kammerpuffer 1x
Spannung: 200 V
Dauer: 30 bis 35 Minuten

Falls das Gel nicht geblottet wurde, konnte es mit Coomassieblau gefärbt werden:

Färben: 30 Minuten bei 50°C in Coomassie-Färbelösung schwenken
Entfärben: 45 Minuten bei 50°C in Entfärbelösung schwenken (Lösung ca. dreimal wechseln)

2.2.2.6 Blotten der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf PVDF-Membranen

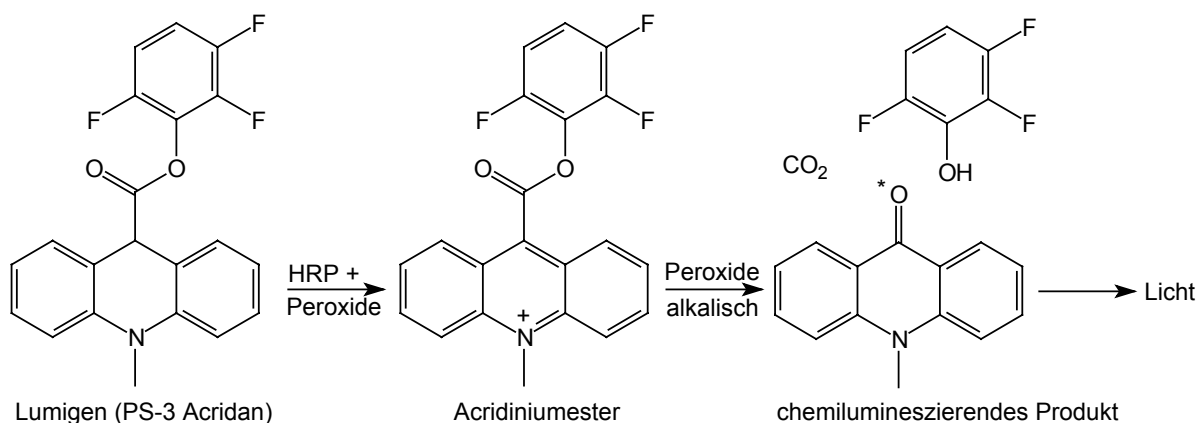
Die Proteinbanden aus SDS-Polyacrylamidgelen wurden nach dem „semi-dry“-Verfahren auf PVDF-Membranen geblottet.

Puffer: Transferpuffer 1x
Stromstärke: 2.5 mA/cm²
Dauer: 90 Minuten

Die geblottete PVDF-Membran wurde mehrmals in mQH₂O gewaschen. Anschliessend wurde sie während 5 Minuten mit Ponceau S-Lösung inkubiert und mehrere Male mit mQH₂O gespült, bis sich die roten Banden vom weissen Hintergrund abhoben.

2.2.2.7 Immunnachweis auf PVDF-Membranen mit ECL Plus

Das „ECL Plus Western blotting detection“ System ist geeignet für den Nachweis von konjugierten „Horseradishperoxidase“-gekoppelten Antikörper, wie beispielsweise der sheep anti-hPg (HRP conjugated). Die HRP zusammen mit Peroxid oxidiert enzymatisch das Lumigen PS-3 Acridan zu einem Acridiniumester. Dieses Zwischenprodukt reagiert mit Peroxiden unter leicht alkalischen Bedingungen zu einem intensiv chemilumineszierenden Produkt mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm, welches auf einem photographischen Film nachgewiesen werden kann. Zusätzlich entsteht durch Anregung bei 430 nm im lichtproduzierenden Reaktionsweg ein fluoreszierendes Zwischenprodukt mit einem Emissionsmaximum um 503 nm, welches auf einem Fluoreszenzmessgerät wie dem Scanner FLA-3000 sichtbar gemacht werden kann.



Reaktionsmechanismus des ECL Plus Systems

Vorgehen für den Immunnachweis mit dem Scanner:

Blocken: 60 Minuten mit 5% Non-Fat-Dry-Milk-Lösung
 Waschen: 2x 2 Minuten mit PBST
 Antikörper: 60 Minuten mit 1:20'000 Anti-hPg (HRP-gekoppelt) in 0.5% Non-Fat-Dry-Milk-Lösung
 Waschen: 2x 1 Minute, 1x 15 Minuten, 3x 5 Minuten mit PBST
 Entwickeln: 5 Minuten mit 2 ml ECL Plus A und 50 µl ECL Plus B
 Messen: Scanner: 473 nm mit Y520 und O580

Auf dem Scanner wurde durch die „Fluor stage“ Platte die Fluoreszenz dieses Zwischenprodukts bestimmt. Die Anregungsfrequenz betrug 473 nm und die Messung erfolgte mit den Filtern Y520 und O580 entsprechend 520 nm und 580 nm.

2.2.2.8 Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

Die gereinigten Proben und Eluate wurden zur Analyse der Reinheit mittels „reverse-phase high performance liquid chromatography“ (RP-HPLC) auf dem HP 1090 mit einer Aquapore Butyl Säule chromatographiert. Wird das Ionenpaarreagens TFA den Lösungen beigegeben, ist die Retention des jeweiligen Proteins nur von der Stärke der hydrophoben Wechselwirkung mit der aliphatischen Matrix abhängig. Die anionischen Seitenketten der Proteine und Peptide sind protoniert und die kationischen Seitenketten gehen eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem TFA-Anion ein und bilden das sogenannte Ionenpaar. Damit sind die Proteine und Peptide ungeladen und werden im wesentlichen nur noch nach Hydrophobizität aufgetrennt.

Von einer wässrigen Probe wurden 50 µl auf die Säule eingespritzt und mit einem Acetonitrilgradienten aufgetrennt. Der lineare Gradient von RP-HPLC-Laufmittel B in A lief von 0-100% in 50 Minuten mit einer Flussrate von 0.3 ml/min. Die Detektion wurde bei 210 und 280 nm durchgeführt, entsprechend der Absorptionsmaxima von Peptidbindungen und aromatischen Aminosäuren.

2.2.2.9 Aminosäureanalyse von Proteinen

Die hier verwendete quantitative Aminosäureanalyse wurde von Bidlingmeyer *et al.* (1984) beschrieben und benutzt Phenylisothiocyanat (PITC) als Kopplungsreagens. Aus einer solchen Analyse kann die relative Aminosäurezusammensetzung und die genaue Proteinmenge eruiert werden, falls die Masse und Zusammensetzung des Proteins bekannt sind. Da die Hydrolyse sauer durchgeführt wird, desamidieren Asn und Gln zu den entsprechenden Säuren. Demnach sind die Werte für Asp und Glu höher, da die gemessenen Werte Asx (Asp+Asn) und Glx (Glu+Gln) entsprechen. Ferner wird Trp vollständig, Ser und Thr partiell (ca. 10%) zerstört. Somit sind die Werte von Ser und Thr tiefer als erwartet, während jener von Trp fehlt.

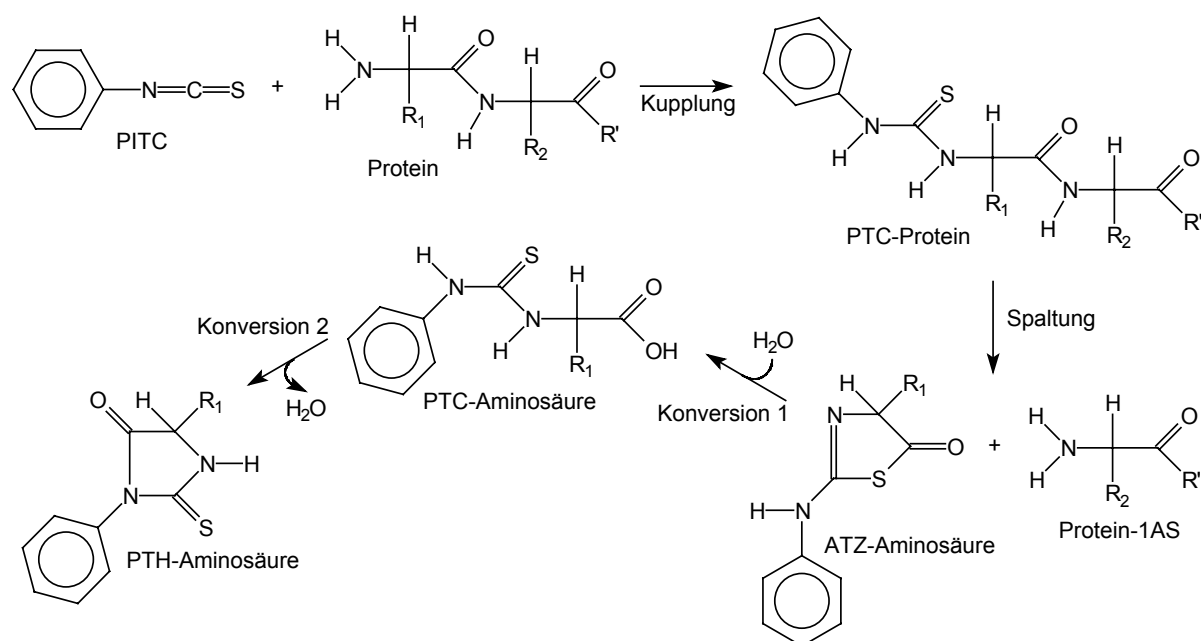
Eine genau bestimmte Menge Protein, üblicherweise 10 µg, wurde in einem Röhrchen mit 5 µl AS-EDTA-Lösung versetzt und in der Speed Vac Zentrifuge getrocknet. In ein Hydrolysegefäß wurden 200 µl AS-HCl-Lösung pipettiert, das Röhrchen hineingestellt, dreimal evakuiert und mit Stickstoff belüftet. Unter Vakuum fand die Hydrolyse bei 115°C während 22 Stunden statt. Nach der Belüftung

wurde die Probe in der Speed Vac Zentrifuge getrocknet und in 10 µl AS-Puffer A aufgenommen. Nach erneutem Trocknen wurde der Rückstand in 10 µl AS-Puffer B gelöst und 20 Minuten bei Raumtemperatur reagieren gelassen, um das PITC an die Amin-Reste zu koppeln. Die Phenylthiocarbamyl-aminosäuren (PTC-Aminosäuren) wurden 45 Minuten mittels Speed Vac getrocknet und für die RP-HPLC in 50 µl AS-RP-HPLC-Laufmittel A aufgenommen. Die Chromatographie wurde bei 50°C mit einem Gradienten von AS-RP-HPLC-Laufmittel B in A von 2-45% in 13 Minuten mit einer Flussrate von 1 ml/min auf einer Nova-Pak Säule eines HP 1090L durchgeführt. Die Detektion der PTC-Aminosäuren erfolgte bei 247 nm. Sie wurden mit Hilfe eines ebenfalls umgesetzten Aminosäurestandards von bekannter Menge und Zusammensetzung quantifiziert.

2.2.2.10 Sequenzierung von Proteinen nach Edman

Die Sequenzierung von Proteinen erfolgt durch Edman-Abbau. Dabei wird die jeweils N-terminale Aminosäure wie von Edman (1950) beschrieben mit PITC modifiziert und spezifisch abgespalten. Diese werden anschliessend nach neuen Verfahren mittels HPLC aufgetrennt und photometrisch detektiert. Jeder Abbauzyklus umfasst drei Schritte:

In der Kupplungsreaktion werden die α- und ε-Aminogruppen der Proteine mit PITC zu einem Phenylthiocarbamyl-Protein (PTC-Protein) umgesetzt. In der Spaltungsreaktion wird mit TFA ein nucleophiler Angriff des Schwefels an die Carbonylgruppe der ersten Amidbindung induziert, wobei die N-terminale Aminosäure als 2-Anilino-5-thiazolinon (ATZ-Aminosäure) abgespalten wird. In der Konversionsreaktion wird in wässriger Säure die ATZ-Aminosäure zu einer PTC-Aminosäure hydrolysiert, die durch eine sauer katalysierte Umlagerung zur stabilen Phenylthiohydantoinaminosäure (PTH-Aminosäure) umgesetzt wird. Die PTH-Aminosäuren werden mittels RP-HPLC aufgetrennt, photometrisch detektiert und identifiziert werden.



Chemische Reaktionen beim Edman-Abbau von Peptiden

Die Sequenzierungen erfolgten auf einem automatischen PE 492 cLC Sequenator, welcher eine minimale Menge von 0.2 pmol Protein benötigt, um verlässliche Resultate zu liefern. Es konnten sowohl Proteine in fester wie flüssiger Form, als auch Proteine auf Coomassie-gefärbten PVDF-Membranen analysiert werden.

Für die Sequenzierung von flüssigen oder festen Proben wurden zuerst 7.5 µl Biobrene, welches der besseren Adsorption der Proteine an den Glasfilter dient, auf den Filter geladen und mit dem Programm „Filter Precycle“ 5 Zyklen durchgeführt. Durch diese Zyklen wurde das Biobrene von Verunreinigungen gewaschen. 7.5 µl flüssige Probe oder 7.5 µl in 0.1% TFA aufgenommene feste Probe wurden anschliessend auf den Filter geladen und mit dem Programm „Pulsed Liquid“ die Anzahl gewünschter Sequenzierschritte ausgeführt. Zur Analyse von Proteinen auf PVDF-Membranen wurde

die zu sequenzierende Bande ausgeschnitten und direkt mit dem Programm „Pulsed Liquid“ die Anzahl der gewünschten Sequenzierschritte durchgeführt. Auf einer PTH Säule wurden die PTH-Aminosäuren jedes Abbauzyklus aufgetrennt, bei 269 nm photometrisch detektiert und identifiziert.

2.2.2.11 Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Massen der isolierten Proteine wurden auf einem VG Plattform Single Quadrupol Mass Spectrometer, das von Mass Lynx[™] gesteuert wird, bestimmt. Nichtflüchtige Moleküle können dank der Elektrospray Ionisationstechnik (ESI) in die Gasphase überführt und somit auch analysiert werden. Damit ist es möglich die Masse von Proteinen von einer Grösse bis zu 100 kDa mit einer Messgenauigkeit von 0.1‰ zu bestimmen.

Die Proteinlösung wird mit 10 µl/min unter Atmosphärendruck durch eine Stahlkapillare geleitet, an der eine Spannung von 3500 V angelegt ist, um die Probe zu ionisieren. Durch einen Stickstoffstrom wird die Probe beim Austreten aus der Kapillare zerstäubt, wodurch ein Aerosol aus geladenen Tröpfchen entsteht. Das Lösungsmittel wird durch die erhöhte Temperatur von 60°C und durch das einströmende Trocknungsgas verdampft. Die ionisierten Moleküle werden über zwei Linsen mit einer angelegten Cone-Spannung von 60 V und mit einem Hexapole zu einem feinen Strahl gebündelt, der durch einen Quadrupol analysiert wird. Die Detektion der Ionen erfolgt mit einem Dynolite[™]-Detektor System, worin das Signal über einen Photomultiplier amplifiziert wird.

Da beim Quadrupol das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) im Bereich von 2-3000 Da pro Ladung gemessen wird und die Proteine in der Regel mehrfach geladen werden, entsteht auf dem Diagramm eine sogenannte „Envelope“, d.h. eine Serie von Massepeaks, deren Höhe kontinuierlich zu- und wieder abnimmt. Für die Berechnung der effektiven Masse braucht es mindestens zwei benachbarte Massen, die sich nur in einer Ladung unterscheiden und zum selben Molekül gehören. Die zu bestimmende Totalmasse M kann nach der Formel $M = n_2(M_2 - H^+)$ berechnet werden, wobei $n_2 = (M_1 - H^+) / (M_2 - M_1)$ die Anzahl Ladungen der gemessenen Masse M_2 ist. Für die gemessenen Massen M_1 und M_2 gilt: $M_1 < M_2$.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zu analysierenden Proteinproben mittels Speed Vac getrocknet und in 50% Acetonitril mit 0.5% Ameisensäure zu einer Konzentration von einigen pmol/µl aufgenommen. Für die Messung der Primer wurde die wässrige Stammlösung von 100 µM auf 20 pmol/µl mit 50% Acetonitril verdünnt, welches zusätzlich 2% Triethylamin enthielt. 10 µl dieser Protein- oder Primerlösungen wurden jeweils eingespritzt, gemessen und mit Mass Lynx[™] ausgewertet.

2.2.2.12 Fluoreszenzspektroskopie

Die Interaktion eines Liganden mit einem Protein bewirkt eine Konformationsänderung, welche die Umgebung von Tryptophanresten beeinflusst und eine Änderung der intrinsischen Fluoreszenz zur Folge hat. Mit dieser Änderung kann nach der Methode von Scatchard (1948) die Assoziations- oder Dissoziationskonstante (K_a respektive K_d) ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fluoreszenz in einer auf 25°C thermostatisierten Quarzküvette mit Magnetrührer auf einem Fluoreszenzspektrometer mit folgenden Geräteeinstellungen gemessen: Excitation 296 nm, Emission 340 nm, Scan Start 330 nm, Scan Ende 350 nm, „excitation slit“ 10 nm, „emission slit“ 10 nm und Scangeschwindigkeit 240 nm/min. Für die Fluoreszenztitration wurden jeweils 600 µl einer 5 µM Proteinlösung in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 8 verwendet, deren Fluoreszenz als Nullwert definiert wurde. In 10 Schritten wurden jeweils 2 µl der entsprechenden 5 µM Ligandlösung zugegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen der Lösung mit einer Pasteurpipette wurde die Fluoreszenzintensität dreimal hintereinander gemessen und die Assoziations- beziehungsweise Dissoziationskonstante bestimmt.

3 *P. pastoris*: Material und Methoden

In diesem Teil werden nur *P. pastoris*-spezifische oder vom *E. coli* Teil abweichende Materialien und Methoden beschrieben, die nicht schon im Kapitel 2 erwähnt worden sind.

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Material

3.1.1.1 Bakterien- und Hefestämme

Stamm	Beschreibung	Lieferant
TOP10F' (<i>E. coli</i>)	<i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80/ <i>lacI</i> ^q Z Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^r), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> λ^- , [F': <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q Z Δ M15, Tn10 (Tet ^r)] Leicht transformierbar mit grösseren Vektoren (>10 kbp) Verwandt mit DH10B, der von MC1061 abstammt Beschrieben von Wertman <i>et al.</i> (1986)	Invitrogen
GS115 (<i>P. pastoris</i>)	<i>his4</i> Phänotyp: Mut ⁺ , His ⁻ Beschrieben von Cregg <i>et al.</i> (1985)	Invitrogen
KM71 (<i>P. pastoris</i>)	<i>his4</i> , <i>arg4</i> , <i>aox1::ARG4</i> Phänotyp: Mut ^S , His ⁻ Beschrieben von Tschopp <i>et al.</i> (1987)	Invitrogen
GS115 β -Gal (<i>P. pastoris</i>)	<i>HIS4</i> Phänotyp: Mut ⁺ , His ⁺ Referenzstamm: - Intrazelluläre Expression (β -Galactosidase) - Mut ⁺ Phänotyp Beschrieben von Invitrogen (2002)	Invitrogen
GS115 Albumin (<i>P. pastoris</i>)	<i>HIS4</i> , <i>aox1</i> Phänotyp: Mut ^S , His ⁺ Referenzstamm: - Sekretierte Expression (Albumin) - Mut ^S Phänotyp Beschrieben von Invitrogen (2002)	Invitrogen

Zur Lagerung der *E. coli* und *P. pastoris* Stämme wurde wie in Kapitel 2.1.1.1 beschrieben vorgegangen.

3.1.1.2 Nährmedien

Nährmedium	Substanz	Menge	Lieferant
YPD	Bacto TM Pepton	20 g/l	Becton Dickinson
(Medium)	Bacto TM Hefe-Extrakt	10 g/l	Becton Dickinson
Nach dem Lösen in 900 ml Ionentauscherwasser und dem Abkühlen der autoklavierten Lösung auf 60°C wurde folgendes hinzugegeben:			
	10x D	100 ml/l	

<u>YPD</u> (Platten)	Bacto™ Pepton	20 g/l	Becton Dickinson
	Bacto™ Hefe-Extrakt	10 g/l	Becton Dickinson
	Bacto™ Agar	20 g/l	Becton Dickinson

Nach dem Lösen in 900 ml Ionentauscherwasser und dem Abkühlen der autoklavierten Lösung auf 60°C wurde folgendes hinzugegeben, gut gemischt und in Petrischalen gegossen:

10x D	100 ml/l
-------	----------

<u>YPD-G418</u> (Platten)	Bacto™ Pepton	20 g/l	Becton Dickinson
	Bacto™ Hefe-Extrakt	10 g/l	Becton Dickinson
	Bacto™ Agar	20 g/l	Becton Dickinson

Nach dem Lösen in 900 ml Ionentauscherwasser und dem Abkühlen der autoklavierten Lösung auf 60°C wurde folgendes hinzugegeben, gut gemischt und in Petrischalen gegossen:

10x D	100 ml/l
Geneticin®-Stammlösung	2.5 bis 40 ml/l

<u>RDB & RDHB</u> (Platten)	Sorbitol	186 g/l	Fluka
	Bacto™ Agar	20 g/l	Becton Dickinson

Nach dem Lösen in 700 ml Ionentauscherwasser und dem Abkühlen der autoklavierten Lösung auf 60°C wurde folgender auf 45°C vorgewärmter Mix hinzugegeben, gut gemischt und in Petrischalen gegossen:

10x D	100 ml/l
10x YNB	100 ml/l
500x B	2 ml/l
100x AA	10 ml/l
sH ₂ O	88 ml/l

Im Falle von RDHB Platten wurden nur 78 ml/l sH₂O hinzugegeben, jedoch zusätzlich mit 100x H 10 ml/l ergänzt.

<u>RD & RDH</u> (Top-Agar)	Sorbitol	186 g/l	Fluka
	Bacto™ Agar	10 g/l	Becton Dickinson

Nach dem Lösen in 700 ml Ionentauscherwasser und dem Abkühlen der autoklavierten Lösung auf 60°C wurde folgender auf 45°C vorgewärmter Mix hinzugegeben:

10x D	100 ml/l
10x YNB	100 ml/l
500x B	2 ml/l
100x AA	10 ml/l
sH ₂ O	88 ml/l

Nach gutem Mischen bis zum Gebrauch in einem Wasserbad bei 45°C warmhalten.

Im Falle von RDH Top-Agar wurden nur 78 ml/l sH₂O hinzugegeben, jedoch zusätzlich mit 100x H 10 ml/l ergänzt.

<u>MD & MM</u> (Platten)	Bacto™ Agar	15 g/l	Becton Dickinson
---------------------------------	-------------	--------	------------------

Nach dem Lösen in 800 ml Ionentauscherwasser und dem Abkühlen der autoklavierten Lösung auf 60°C wurde folgendes hinzugegeben, gut gemischt und in Petrischalen gegossen:

10x D	100 ml/l
10x YNB	100 ml/l
500x B	2 ml/l

Im Falle von MM Platten wurden die 10x D 100 ml/l durch 10x M 100 ml/l ersetzt.

BMGY & BMMY (Medium)	Bacto™ Pepton	20 g/l	Becton Dickinson
	Bacto™ Hefe-Extrakt	10 g/l	Becton Dickinson
Nach dem Lösen in 700 ml Ionentauscherwasser und dem Abkühlen der autoklavierten Lösung auf Raumtemperatur wurde folgendes hinzugegeben:			
	Kaliumphosphatpuffer	100 ml/l	
	10x YNB	100 ml/l	
	500x B	2 ml/l	
	10x GY	100 ml/l	

Im Falle von BMMY wurden die 10x GY 100 ml/l durch 10x M 100 ml/l ersetzt.

3.1.1.3 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung / Endkonzentration	Lieferant
Geneticin® (G418)	100 mg/ml → 2.5 - 40 µl/ml = 0.25 - 4 mg/ml	Invitrogen

3.1.1.4 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Lieferant
pPIC3.5K	9004 bp Amp ^r & Kan ^r (<i>E. coli</i>), G418 ^r (<i>P. pastoris</i>), <i>HIS4</i> Für intrazelluläre Expression Kozak-Konsensussequenz nicht vorhanden Beschrieben von Scorer <i>et al.</i> (1994)	Invitrogen
pPIC9K	9276 bp Amp ^r & Kan ^r (<i>E. coli</i>), G418 ^r (<i>P. pastoris</i>), <i>HIS4</i> Für sekretierte Expression 5'-terminales α-Faktor Sekretionssignal aus <i>S. cerevisiae</i> Kozak-Konsensussequenz vorhanden Beschrieben von Scorer <i>et al.</i> (1994)	Invitrogen

3.1.1.5 Enzyme

Enzym	Beschreibung	Konzentration	Sequenz	Lieferant
<i>Eco</i> RI	Restriktionsenzym	12 U/µl	5'-G/AATTC-3'	Promega
<i>Hga</i> I	Restriktionsenzym	2 U/µl	5'-GACGC(N) ₅ -3'	New England Biolabs
Lyticase	Zellwandverdau	733 U/mg	-	Sigma
<i>Sa</i> I	Restriktionsenzym	20 U/µl	5'-G/TCGAC-3'	New England Biolabs
<i>Sna</i> BI	Restriktionsenzym	5 U/µl	5'-TAC/GTA-3'	New England Biolabs
T4 PNK	Phosphokinase	10 U/µl	-	New England Biolabs
Zymolyase	Zellwandverdau	30 U/µl	-	Invitrogen

3.1.1.6 Primer

Name	Sequenz
pPIC3.5K for	5'-GCGTACGTAACCATGGCGCATCACCATCACCATCAC-3'
pPIC9K for	5'-GCGTACGTACATCACCATCACCATCACGGATCCAT-3'
N289A	5'-CCTCACACACATGCCAGGACACCA-3'
N289A tail	5'-TTATGACCTCACACACATGCCAGGACACCA-3'
T346A	5'-CAGGTGGTGCTGCGGGAGCCAAT-3'

T346A tail	5'-CACAGACAGGTGGTGCTGCGGGAGCCAAT-3'
HC back	5'-GCGTACGTATTACTAGGCCGCACACTGAGGGACAT-3'
HC tail	5'-CACGATGGCCGCACACTGAGGGACAT-3'
hPg for	5'-CGAGGCAAGAGGGCGACCACTGTTA-3'
hPg tail	5'-AAGTTGCCTGGCAAGTCAGTCTTAGAACA-3'
S741A	5'-GGACCTCCAGCGTCACCCTGGCAACTGT-3'
hPg back	5'-GCGTACGTATTACTAATTATTTCTCATCACTC-3'

Alle Primer wurden von der Microsynth GmbH (Balgach, SG) in HPLC-gereinigter Form bezogen und wie in Kapitel 2.1.1.7 beschrieben gelöst.

3.1.1.7 Kits

Kit	Anwendung	Lieferant
S.N.A.P.™ UV-Free Gel Purification Kit	DNA-Isolation aus Agarosegelen ohne UV-Licht	Invitrogen
One Shot® TOP10F' Competent Cells	Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i>	Invitrogen
<i>Pichia</i> Spheroplast Module	Herstellung von <i>P. pastoris</i> Spheroplasten	Invitrogen
DNeasy® Tissue Kit	Isolation genomischer DNA	Qiagen

3.1.1.8 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Die Qualität der eingesetzten Substanzen war *purum* oder *puriss p.a.*:

Reagens / Lösung / Puffer	Beschreibung	Lieferant
100x AA	L-Glutaminsäure, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Methionin Lösung mit 0.5% jeder AS sterilfiltrieren	alle Fluka
500x B	L-Biotin 0.02 prozentige Lösung sterilfiltrieren	Fluka
CaS	1 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl ₂ , pH 7.5	Invitrogen
CV-Lösung	2 mg/ml Crystal Violet	Invitrogen
CV-Ladepuffer	6x (100 µg/ml Crystal Violet, 20 mM EDTA, 30% Glycerin)	Invitrogen
10x D	Dextrose (D-Glucose) 20 prozentige Lösung sterilfiltrieren	Fluka
10x GY	Glycerin wasserfrei 10 prozentige Lösung sterilfiltrieren	Fluka
100x H	L-Histidin 0.4 prozentige Lösung sterilfiltrieren	Fluka
Kaliumphosphatpuffer	1 M KH ₂ PO ₄ , pH 6.0 Autoklavieren	Fluka
10x M	Methanol 5 prozentige Lösung sterilfiltrieren	Merck
PEG/CaT	1:1-Mischung aus PEG (40% PEG 3350) und CaT (20 mM Tris, 20 mM CaCl ₂ , pH 7.5)	Invitrogen
Puffer 1	10x (100 mM Bis Tris Propan-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, pH 7.0)	New England Biolabs
Puffer H	10x (900 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 100 mM MgCl ₂ , pH 7.5)	Promega

SalI Puffer	10x (1500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, pH 7.9)	New England Biolabs
SCE	1 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 10 mM Natrium-citratpuffer, pH 5.8	Invitrogen
SED	19 ml SE (1 M Sorbitol, 25 mM EDTA, pH 8.0) + 1 ml DTT (1 M DTT)	Invitrogen
Sorbitol	1 M	Invitrogen
Sorbitolpuffer	1 M Sorbitol, 100 mM EDTA, 14 mM 2-Mercaptoethanol	beide Fluka, Bio-Rad
SOS	1 M Sorbitol, 10 mM CaCl ₂ , 0.3x YPD	Invitrogen
10x YNB	Yeast Nitrogen Base mit Ammoniumsulfat und ohne Aminosäuren 13.4 prozentige Lösung sterilfiltrieren	Sigma

3.1.1.9 Geräte

Gerät	Bemerkungen	Lieferant
Sterilfilter	Stericup [™] GP Express Membran, 0.22 µm 1000, 500, 250 ml	Millipore

3.1.2 Methoden

3.1.2.1 DNA mit Restriktionsenzymen verdauen

Reagens	Menge [µl]						Anfangskonzentration
<i>Bam</i> HI	1.0	-	-	-	-	-	10 U
<i>Eco</i> RI	-	1.0	-	-	-	-	12 U
<i>Hga</i> I	-	-	1.0	-	-	-	2 U
<i>Nde</i> I	-	-	-	0.5	-	-	10 U
<i>Sal</i> I	-	-	-	-	0.5	-	10 U
<i>Sna</i> BI	-	-	-	-	-	1.0	5 U
Puffer 1	-	-	1.0	-	-	-	10x
Puffer B	1.0	-	-	-	-	-	10x
Puffer H	-	1.0	-	-	-	-	10x
Puffer 4	-	-	-	1.0	-	1.0	10x
<i>Sal</i> I Puffer	-	-	-	-	1.0	-	10x
BSA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	10x
DNA	x	x	x	x	x	x	100 fmol
sH ₂ O	ad 10.0	ad 10.0	ad 10.0	ad 10.0	ad 10.0	ad 10.0	

Inkubation: 30 Minuten bei 37°C

<i>Nde</i> I	-	-	-	0.5	-	-	10 U
--------------	---	---	---	-----	---	---	------

Inkubation: 30 Minuten bei 37°C

Stoppen: 4 µl DNA-Ladepuffer 6x

Bei mehr eingesetzter DNA wurde auch die Menge an Restriktionsenzym entsprechend angepasst.

3.1.2.2 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Grundsätzlich wurde nach Kapitel 2.1.2.3 verfahren, jedoch wurden für die DNA-Isolation den Agarosegelen vor dem Giessen 0.8 µl CV-Lösung pro ml Gel beigemischt. Die Proben wurden statt mit DNA-Ladepuffer mit CV-Ladepuffer versetzt (beide Lösungen stammen aus dem S.N.A.P.[™] UV-Free Gel Purification Kit von Invitrogen). Nach der Elektrophorese konnten die gewünschten Banden statt

unter UV-Licht auf weissem Hintergrund aus den Gelen geschnitten werden, womit eine Strahlenschädigung der DNA vermieden wurde.

Kleine Fragmente bis zu einer Grösse von 4 kbp wurden anschliessend gemäss dem MinElute™ Gel Extraction Kit von Qiagen behandelt (siehe auch Kapitel 2.1.2.3).

Grössere Fragmente bis zu einer theoretischen Grösse von 50 kbp wurden im Gelstück zuerst mit 3 Volumen Puffer QG versetzt und durch Schmelzen des Gels bei 50°C während 10 Minuten die darin enthaltene DNA freigesetzt (nach Protokoll vom MinElute™ Gel Extraction Kit von Qiagen). Dieser Lösung wurden 5 Volumen Puffer PB beigemischt und das Ganze durch eine Miniprepsäule bei 20'000 g während 1 Minute zentrifugiert. Die Säule wurde mit 750 µl Puffer PE beladen und erneut auf gleiche Art und Weise zentrifugiert. Nach einer weiteren einminütigen Zentrifugation, um Spuren restlichen Ethanol zu entfernen, wurden 25 µl auf 70°C-vorgewärmtes sH₂O auf die Membran pipettiert, 5 Minuten stehen gelassen und während 1 Minute bei 20'000 g die DNA eluiert (nach Protokoll vom QIAprep® Spin Miniprep Kit von Qiagen).

3.1.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.1.2.3.1 PCR für die Inserts InNK15 und ExNK15

	Reagens	Menge [µl]	Anfangskonzentration	Produkt
Mastermix	<i>Pfu</i> DNA Polymerase Puffer dNTPs sH ₂ O	5.0 1.0 ad 50.0	10x je 10 mM (Gesamtvolumen)	
Polymerase	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	1.0	2.9 U	
Ansatz 1	Primer for: pPIC3.5K for	}	1.25	a
	pPIC9K for			
	N289A	}	1.25	c
	Primer back: T346A tail			
	T346A tail	}	1.25	b
	HC back			
Templat:	NK15pQE-8*	}	1.0	10 fmol
	NK15pQE-8*			
	NK15pQE-8*			
Ansatz 2	Primer for: pPIC3.5K for	}	1.25	d
	pPIC9K for			
	Primer back: HC back	}	1.25	d
	HC back			
	Templat: a + c ⇒ d	}	je 0.25	10 fmol
	b + c ⇒ e			
Ansatz 3	Primer for: pPIC3.5K for	}	1.25	f
	pPIC9K for			
	N289A tail	}	1.25	h
	Primer back: T346A			
	T346A	}	1.25	g
	HC back			
Templat:	d	}	0.5	10 fmol
	e			
	d			
Ansatz 4	Primer for: pPIC3.5K for	}	1.25	i
	pPIC9K for			
	Primer back: HC back	}	1.25	j
	HC back			
	Templat: f + h ⇒ i	}	je 0.5	10 fmol
	g + h ⇒ j			

*: linear

	# Zyklen	Beschreibung	Temperatur	Zeit
Programm	1x	Denaturierung	96°C	5 Minuten
	30x	{ Denaturierung Hybridisierung Elongation	96°C 60°C 72°C	1 Minute 1 Minute 4 Minuten
	1x	Endextension	72°C	10 Minuten

3.1.2.3.2 PCR für die Inserts *InhPg* und *ExhPg*

	Reagens	Menge [µl]	Anfangskonzentration	Produkt
Mastermix	<i>Pfu</i> DNA Polymerase Puffer dNTPs sH ₂ O	5.0 1.0 ad 50.0	10x je 10 mM (Gesamtvolumen)	
Polymerase	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	1.0	2.9 U	
Ansatz 1	Primer for: hPg for hPg tail Primer back: S741A hPg back Templat: pPLGKG* pPLGKG*	{ 1.25 } { 1.25 } { 2.5 }	20 µM 20 µM 10 fmol	a b a b
Ansatz 2	Primer for: hPg for pPIC3.5K for pPIC9K for Primer back: hPg back HC tail HC tail Templat: a + b ⇒ c InNK15pPIC3.5K* ExNK15pPIC9K*	{ 1.25 } { 1.25 } { je 0.1 1.0 }	20 µM 20 µM 10 fmol 10 fmol	c d e c d e
Ansatz 3	Primer for: pPIC3.5K for pPIC9K for Primer back: hPg back hPg back Templat: c + d ⇒ f c + e ⇒ g	{ 1.25 } { 1.25 } { je 0.2 }	20 µM 20 µM 10 fmol	f g f g

*: linear

	# Zyklen	Beschreibung	Temperatur	Zeit
Programm	1x	Denaturierung	96°C	5 Minuten
	35x	{ Denaturierung Hybridisierung Elongation	96°C x°C 72°C	1 Minute 1 Minute y Minuten
	1x	Endextension	72°C	10 Minuten

x°C = 55°C für PCR b, c, f, g; 60°C für PCR a, d, e.

y Minuten = 3 Minuten für PCR a, b; 4 Minuten für PCR c, d, e; 6 Minuten für PCR f, g.

3.1.2.4 DNA phosphorylieren, dephosphorylieren und ligieren

Für die Ligation wurde nach Kapitel 2.1.2.6 verfahren und für die Dephosphorylierung wurde nach Kapitel 2.1.2.5 gearbeitet, jedoch mit einer Inkubationszeit von 60 Minuten statt nur deren 10, entsprechend der erforderlichen Dephosphorylierungszeit von „blunt-end“ DNA.

In der Literatur fand sich keine Angabe über die minimale Anzahl Basenpaare, die an den Enden linearer DNA vorhanden sein müssen, damit das Restriktionsenzym *Sna*BI seine Schnittstelle noch erkennen und verdauen kann. Für den Fall dass dieses nicht schneiden würde, wurde als weiterer Schritt eine Phosphorylierung der DNA nach dem Verdau mit *Sna*BI durchgeführt. Somit war sowohl eine Ligation mit *Sna*BI-verdauter DNA (generiert 5'-phosphorylierte „blunt-ends“), als auch mit unverdauter DNA (von den 5'-unphosphorylierten Primern stammende, durch Phosphonucleotidkinase 5'-phosphorylierte „blunt-ends“) möglich. Die Phosphorylierung wurde wie folgt durchgeführt:

Reagens	Menge [µl]	Anfangskonzentration	Bemerkungen
T4 DNA Ligase Puffer	2.0	10x	= T4 PNK Puffer + ATP
DNA (verdaute Inserts)	15.0	<30 pmol	
sH ₂ O	ad 19.0		
Erhitzung:	5 Minuten bei 70°C		
Abkühlung:	5 Minuten auf Eis		
T4 PNK	1.0	10 U	
Inkubation:	30 Minuten bei 37°C		
Inaktivierung:	20 Minuten bei 65°C		

T4 Phosphonucleotidkinase ist vollständig und irreversibel durch Hitzebehandlung inaktivierbar. 1 U T4 PNK kann in 30 Minuten bis zu 30 pmol 5'-Enden phosphorylieren. Die Effizienz von „blunt-end“-Phosphorylierungen kann durch Erhitzen auf 70°C während 5 Minuten und anschliessendem Kühlen auf Eis vor der T4 PNK-Zugabe gesteigert werden.

3.1.2.5 Transformation von One Shot® TOP10F' Competent Cells

Die 50 µl Aliquots chemisch-kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 20 fmol DNA (10 µl Ligationsansatz) versetzt und 30 Minuten auf Eis gelagert. Als Positivkontrolle wurde pPIC9K in der „supercoiled“-Form eingesetzt und als Negativkontrolle keine DNA dazugegeben. Danach wurden die Zellen 30 Sekunden bei 42°C erhitzt, kurz auf Eis gestellt, mit 250 µl auf 37°C vorgewärmtem SOC Medium versetzt und 1 Stunde bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Um die transformierten Zellen in zwei verschiedenen Zelldichten auszuplatten, wurden 30 µl und die restlichen 270 µl auf LB Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.1.2.6 Transformation von *P. pastoris* Zellen mit dem *Pichia* Spheroplast Module

3.1.2.6.1 „Spheroplasting“ von *P. pastoris* Zellen

YPD-Platten wurden mit je einer Öse der *P. pastoris* Stämme GS115 und KM71 angeimpft und während 2 Tagen bei 28°C im Brutschrank inkubiert. Je 1 Kolonie wurde in 10 ml YPD Medium überimpft und über Nacht bei 30°C und 220 rpm angezogen. Je 3x 200 ml YPD wurden mit 5, 10 oder 20 µl Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 30°C und 220 rpm wachsen gelassen.

Am nächsten Tag wurden jene beiden Kulturen geerntet, deren OD₆₀₀ zwischen 0.2 und 0.3 lag, indem die Zellen während 5 Minuten mit 1500 g bei Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Die Pellets wurden in 20 ml sH₂O aufgenommen und erneut unter den selben Bedingungen pelletiert. Die Zellen wurden anschliessend in 20 ml SED resuspendiert und wiederum auf gleiche Art und Weise zentrifugiert. Die Pellets wurden in 20 ml 1 M Sorbitol aufgenommen und erneut während 5 Minuten mit 1500 g bei Raumtemperatur pelletiert. Die Zellen wurden schliesslich in 20 ml SCE resuspendiert und in 2 Portionen (A und B) aufgeteilt, wobei erstere (A) der Ermittlung der optimalen Inkubationszeit zur Bildung von Spheroplasten diente und letztere (B) für die eigentliche Herstellung der transformierbaren Spheroplasten gedacht war.

Die optimale Inkubationszeit zur Bildung der Spheroplasten mit Zymolyase ist erreicht, wenn etwa 70% der Zellen Spheroplasten sind. Unterhalb dieses Wertes hat es zu wenig Spheroplasten im Vergleich zu ganzen Zellen und oberhalb hat es zu viele lysierte Zellen im Verhältnis zu den Spheroplasten. Aus diesem Grund wurde spektrophotometrisch die Zeit ermittelt, nach welcher etwa 70% der Zellen als Spheroplasten vorlagen, d.h. mit SDS lysierbar waren.

Ein Röhrchen Zymolyase wurde auf Eis aufgetaut, durch auf- und abpipettieren gut gemischt und 7.5 µl der Suspension unter gutem Mischen zu A hinzugegeben. Der Verdau wurde in einem Wasser-

bad bei 30°C inkubiert und durfte nicht mehr geschüttelt werden, weil die Spheroplasten sonst vorzeitig lysieren konnten. Eine Zeitserie zwischen 0 und 30 Minuten wurde spektrophotometrisch bei OD₈₀₀ gemessen. Der Nullabgleich wurde mit 800 µl 5% SDS + 200 µl SCE durchgeführt, während als Referenz zur Zeit 0 Minuten 800 µl 5% SDS + 200 µl A vor der Zugabe von Zymolyase gemessen wurde. Danach wurde jeweils die OD₈₀₀ von 800 µl 5% SDS + 200 µl A mit Zymolyase nach 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 und 30 Minuten bestimmt. Die optimalen „Spheroplasting“-Zeiten lagen üblicherweise zwischen 4 und 10 Minuten, bei welchen etwa 70% Spheroplasten vorhanden waren.

Die bereits aufgetaute Zymolyase wurde erneut gut resuspendiert und 7.5 µl der Suspension unter gutem Mischen zu B hinzugegeben. Der Verdau wurde wiederum in ein Wasserbad gestellt und bei 30°C solange wie die vorher bestimmte optimale Zeit inkubiert. Die Spheroplasten wurden anschliessend während 10 Minuten mit 750 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 10 ml 1 M Sorbitol aufgenommen und unter den selben Bedingungen pelletiert. Die Spheroplasten wurden vorsichtig in 10 ml CaS resuspendiert und wiederum auf gleiche Art und Weise zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 0.6 ml CaS aufgenommen und für die Transformation verwendet.

3.1.2.6.2 Transformation der Spheroplasten

Je 100 µl der Spheroplastensuspension wurden mit 5 - 10 µg *Sa*I-linearisierter DNA versetzt und während 10 Minuten bei Raumtemperatur transformiert. Als Kontrollen wurden pPIC3.5K und pPIC9K eingesetzt und als Negativkontrolle keine DNA dazugegeben. Zu jedem Transformationsansatz wurde vorsichtig 1 ml PEG/CaT beigemischt und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden die transformierten Spheroplasten während 10 Minuten mit 750 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Pellets wurden in 150 µl SOS vorsichtig resuspendiert und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 850 µl 1 M Sorbitol vorsichtig hinzupipetiert.

3x 300 µl jedes Transformationsansatzes wurde mit 10 ml auf 45°C vorgewärmtem RD Top-Agar gemischt und auf RDB-Platten gegossen. Als Überlebenskontrolle der Spheroplasten wurden die restlichen 100 µl jedes Transformationsansatzes mit 10 ml auf 45°C vorgewärmtem RDH Top-Agar gemischt und auf RDHB-Platten gegossen. Nachdem der Top-Agar gefestigt war, konnten die Platten während etwa 4 Tagen bei 28°C im Brutschrank inkubiert werden.

3.1.2.7 Selektion der transformierten *P. pastoris* Zellen

1. Selektion: His⁺ / His⁻
Alle Kolonien, die im RD Top-Agar auf RDB-Platten gewachsen waren, sollten durch Rekombination der linearisierten Plasmid-DNA am *his4*-Locus wieder zu *HIS4*-Zellen geworden sein.
2. Selektion: G418^r
In diesem Schritt konnten Geneticin-hyperresistente Kolonien mit mehrfachen Rekombinationen ausfindig gemacht werden, indem die Zellen desto resistenter werden, je mehr Kopien des Resistenzgens sie in sich bergen.
Dazu wurde der Top-Agar der RDB-Platten in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und unter Zugabe von 20 ml sH₂O während 2 Minuten auf dem Vortex gemischt und die Agarstücke zerkleinert, sowie anschliessend 5 Minuten stehen gelassen, damit die Agarstücke sedimentieren konnten. Der Überstand wurde so gut wie möglich in ein neues Falconröhrchen transferiert und während 30 Minuten mit 3000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 900 µl sH₂O aufgenommen, wovon je 100 µl auf YPD- und YPD-G418-Platten ausgestrichen und während etwa 3 Tagen bei 28°C im Brutschrank inkubiert wurden. Um auszuschliessen, dass einzelne Kolonien aufgrund restlichen Agars aus dem Aufschluss des Top-Agars als Geneticin-hyperresistent erschienen, wurden gut gewachsene Kolonien auf frische Platten überimpft und erneut inkubiert.
3. Selektion: Mut⁺ / Mut^S
Um den Mut-Phänotyp zu bestätigen, wurden die ausgewählten Geneticin-hyperresistenten Kolonien auf MM- und MD-Platten überimpft und während etwa 2 Tagen bei 28°C im Brutschrank inkubiert. Auf MD-Platten sollten alle Kolonien etwa gleich schnell wachsen, jedoch auf MM-Platten sollten Mut^S-Kolonien weniger schnell sichtbar sein als Mut⁺-Kolonien.

3.1.2.8 Isolation genomischer DNA aus *P. pastoris* Zellen

Die Kolonien wurden in 15 ml YPD überimpft und während 2 Tagen bei 30°C und 220 rpm inkubiert. Die OD₆₀₀ wurde bestimmt und 4·10⁷ Zellen abpipettiert, entsprechend der Gleichung: OD₆₀₀ = 1.0 ≈ 2·10⁷ Zellen / ml, und während 10 Minuten mit 5000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Pellets wurden in 600 µl Sorbitolpuffer mit 200 U Lyticase aufgenommen, während 30 Minuten bei 30°C inkubiert und schliesslich während 10 Minuten mit 300 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das in 180 µl Puffer ATL resuspendierte Pellet wurde gemäss Protokoll des DNeasy® Tissue Kits von Qiagen weiterverarbeitet.

3.1.2.9 Expression in *P. pastoris* Zellen

3.1.2.9.1 Expression von Mut⁺-Stämmen im Kleinansatz

Die zu exprimierenden Stämme wurden auf YPD-Platten ausgestrichen und während 2 Tagen bei 28°C im Brutschrank wachsen gelassen. Je 25 ml BMGY wurden in 250 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen angeimpft und mit 2 Schichten Butterquarktuch zugedeckt, um eine optimale Belüftung zu garantieren. Die Zellen wurden über Nacht bei 29°C und 300 rpm inkubiert, bis die OD₆₀₀ zwischen 2 und 6 lag. Die Zellen wurden während 5 Minuten mit 5000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Pellets zu einer OD₆₀₀ von 1 in BMMY aufgenommen. Die Suspensionen wurden in 1000 ml Erlenmeyer mit Schikanen überführt, ebenfalls mit Butterquarktuch zugedeckt und bei 29°C und 300 rpm induziert. Alle 24 Stunden wurden die Zellen mit 100% Methanol zu einer Endkonzentration von 0.5% gefüttert. Nach 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 und 96 Stunden wurde immer 1 ml entnommen und während 2 Minuten mit 20'000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im Falle von intrazellulärer Expression (pPIC3.5K) wurde das Pellet, im Falle sekretierter Expression (pPIC9K) zusätzlich auch der Überstand in einem separaten Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Am Ende der Expression wurden je nachdem nur die Pellets oder zusätzlich auch noch die Überstände bei -80°C aufbewahrt, um zu einem späteren Zeitpunkt anstehende Experimente durchführen zu können.

3.1.2.9.2 Expression von Mut^S-Stämmen im Kleinansatz

Die zu exprimierenden Stämme wurden wie die Mut⁺-Stämme auf YPD-Platten ausgestrichen und angezogen. Je 100 ml BMGY wurden in 1000 ml Erlenmeyer mit Schikanen angeimpft, mit Butterquarktuch zugedeckt und über Nacht bei 29°C und 300 rpm inkubiert, bis die OD₆₀₀ zwischen 2 und 6 lag. Die Zellen wurden während 5 Minuten mit 5000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, die Pellets in 20 ml BMMY aufgenommen und in 250 ml Erlenmeyer mit Schikanen überführt, ebenfalls mit Butterquarktuch zugedeckt und bei 29°C und 300 rpm induziert. Alle 24 Stunden wurden die Zellen mit 100% Methanol zu einer Endkonzentration von 0.5% gefüttert. Nach 0, 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden wurde immer 1 ml entnommen und wie bei den Mut⁺-Stämmen entsprechend zentrifugiert, schockgefroren und gelagert. Am Ende der Expression erfolgte die Lagerung ebenfalls gemäss den Mut⁺-Stämmen.

3.1.2.9.3 Expression von Mut⁺-Stämmen im Grossansatz

Mit Kolonien von YPD-Platten wurden je 25 ml BMGY in 250 ml Erlenmeyer mit Schikanen angeimpft, mit Butterquarktuch zugedeckt und über Nacht bei 29°C und 300 rpm inkubiert, bis die OD₆₀₀ zwischen 2 und 6 lag. Je 500 ml BMGY wurden mit den 25 ml der kleinen Vorkulturen in 2000 ml Erlenmeyer angeimpft, mit Butterquarktuch zugedeckt und mehrere Stunden bei 29°C und 300 rpm inkubiert, bis die OD₆₀₀ zwischen 2 und 6 lag. Die Zellen wurden während 15 Minuten mit 3000 g bei Raumtemperatur pelletiert, zu einer OD₆₀₀ von 1 in 2x 500 ml BMMY in 2000 ml Erlenmeyer aufgenommen und mit Butterquarktuch zugedeckt. Die Zellen wurden 60 Stunden induziert, wobei jeweils nach 24 und 48 Stunden nochmals 0.5% Methanol zum Volumen zugegeben wurde. Je 1 ml wurde entnommen und analog den Kleinansätzen pelletiert und gelagert, während die restlichen Zellen 15 Minuten lang mit 3000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Pellets oder zusätzlich auch noch die Überstände bei -80°C aufbewahrt wurden.

3.1.2.9.4 Expression von *Mut^S*-Stämmen im Grossansatz

Mit Kolonien von YPD-Platten wurden analog dem Grossansatz mit *Mut⁺*-Stämmen kleine Vorkulturen angesetzt und wachsen gelassen, bis die OD₆₀₀ zwischen 2 und 6 lag. Auch die grossen Vorkulturen in je 500 ml BMGY wurden entsprechend den *Mut⁺*-Stämmen überimpft und inkubiert, bis die OD₆₀₀ zwischen 2 und 6 lag. Die Zellen wurden ebenfalls analog pelletiert, jedoch anschliessend nur in 100 ml BMMY 5x konzentriert resuspendiert, in 250 ml Erlenmeyer mit Schikanen überführt und mit Butterquarktuch zugedeckt. Die Zellen wurden 60 Stunden induziert, wobei jeweils nach 24 und 48 Stunden nochmals 0.5% Methanol zum Volumen zugefügt wurde. Je 1 entnommener ml, wie auch die restlichen Zellen wurden entsprechend den *Mut⁺*-Stämmen zentrifugiert und gelagert.

3.2 Proteinchemie

3.2.1 Material

3.2.1.1 Marker

Marker	Banden	Lieferant
MagicMark™ Grössenstandard	120, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 20 kDa Proteine enthalten IgG Bindungsstelle	Invitrogen

3.2.1.2 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Die Qualität der eingesetzten Substanzen war *purum* oder *puriss p.a.*:

Reagens / Lösung / Puffer	Beschreibung	Lieferant
Aufschlusspuffer	Aufschlusspuffer Stammlösung 24:1 vermischen mit Complete Lösung	
Aufschlusspuffer Stammlösung	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 5% Glycerin, pH 7.4	Merck, Fluka
Complete Lösung	1 Tablette Complete EDTA-free in 1 ml 50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4	Roche Merck
Glasperlen	Säurebehandelt, Ø 0.5 mm	Sigma
NAP	NAP™-BLOCKER	Geno Technology, Inc.

3.2.2 Methoden

3.2.2.1 Probenvorbereitung für SDS-PAGE

3.2.2.1.1 Probenvorbereitung der Pellets aus 1 ml Kultur

Die Zellpellets wurden kurz aufgetaut und anschliessend auf Eis mit 100 µl Aufschlusspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von etwa einem Pelletvolumen Glasperlen wurden die Zellen durch 8x wiederholtes Schütteln auf dem Vortex während 30 Sekunden und zwischenzeitlichem 30 Sekunden langem Abkühlen auf Eis aufgebrochen. Die Suspension wurde während 10 Minuten mit 20'000 g bei 4°C zentrifugiert, 50 µl des Überstandes in ein neues Röhrchen transferiert und mit 50 µl Ladepuffer nach Lämmli, 5% 2-Mercaptoethanol enthaltend, gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 95°C wurde 2 Minuten mit 20'000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und 20 µl der Überstände auf SDS-Polyacrylamidgele geladen.

3.2.2.1.2 *Probenvorbereitung der Überstände aus 1 ml Kultur*

Nach kurzem Auftauen der Überstände wurden 50 µl in ein neues Röhrchen transferiert, mit 50 µl Ladepuffer nach Lämmli, 5% 2-Mercaptoethanol enthaltend, gemischt und während 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach 2-minütiger Zentrifugation mit 20'000 g bei Raumtemperatur konnten 20 µl der Überstände auf SDS-Polyacrylamidgele geladen werden.

3.2.2.2 **Vorbereitung für Lysin-Bio-Gel-Säule**

3.2.2.2.1 *Vorbereitung der Pellets aus Grosskulturen*

Die Pellets wurden in etwa 5 ml Natriumphosphatpuffer pH 8.5 pro g Zellpellet aufgenommen und mit einer Tablette Complete EDTA-free versetzt. Die suspendierten Zellen wurden 2x mit 20'000 psi in der „French press“ aufgebrochen und anschliessend während 5 Minuten im SonoPlus-Becher auf Eis mit Ultraschall behandelt. Das visköse Lysat wurde in ein 50 ml Falconröhrchen transferiert, mit etwa einem ursprünglichen Zellpelletvolumen Glasperlen versetzt und durch 8x wiederholtes Schütteln auf dem Vortex während 30 Sekunden und zwischenzeitlichem 30 Sekunden langem Abkühlen auf Eis ein letztes Mal aufgebrochen. Nach 15-minütiger Zentrifugation mit 3000 g bei 4°C wurde der Überstand 4x in 5 l Natriumphosphatpuffer pH 8.5 dialysiert. Die Dialysate konnten direkt auf eine konditionierte Lysin-Bio-Gel-Säule geladen werden (siehe Kapitel 2.2.2.3.2).

3.2.2.2.2 *Vorbereitung der Überstände aus Grosskulturen*

Die Überstände wurden 4x in 5 l Natriumphosphatpuffer pH 8.5 dialysiert. Die Dialysate konnten ebenfalls direkt auf eine konditionierte Lysin-Bio-Gel-Säule geladen werden.

3.2.2.3 **Immunnachweis auf PVDF-Membranen mit ECL Plus**

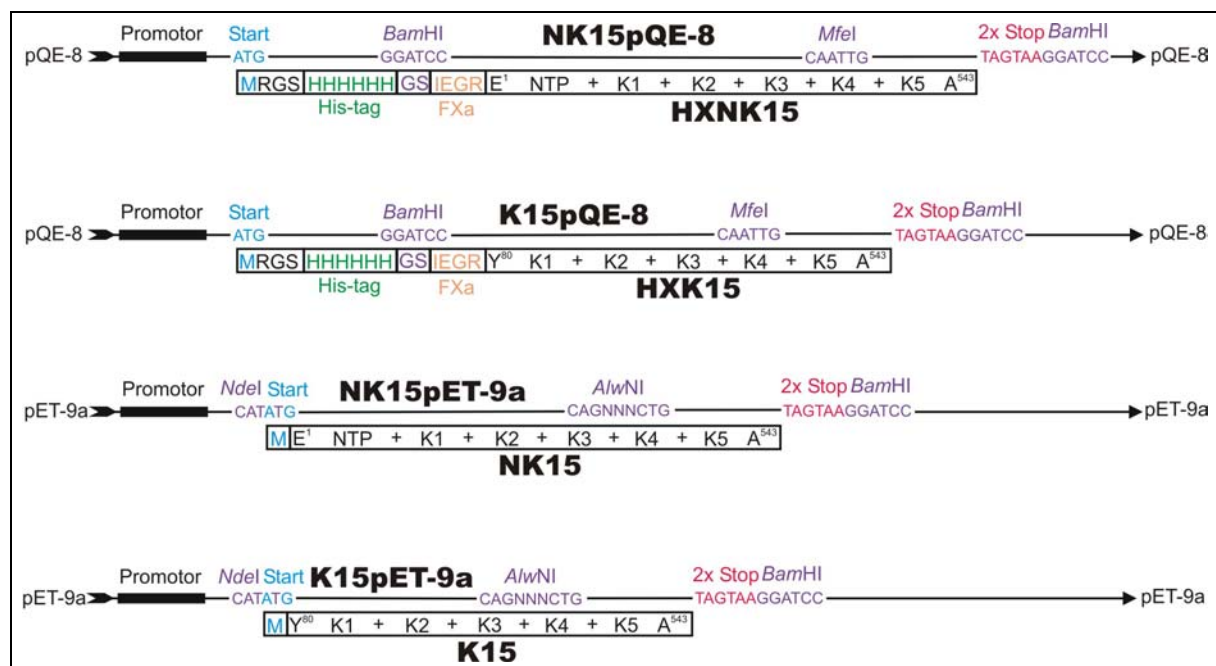
Das „ECL Plus Western blotting detection“ System ist schon in Kapitel 2.2.2.7 näher beschrieben worden. Hier wird nur das optimierte Vorgehen für den Immunnachweis mit dem Scanner beschrieben:

Waschen: 10 Minuten bei Raumtemperatur mit PBST direkt nach dem Blotten
Blocken: über Nacht bei 4°C mit NAP:PBST als 1:1-Gemisch
Antikörper: 60 Minuten bei 4°C mit 1:5000 Anti-hPg (HRP-gekoppelt) in NAP:PBST als 1:1-Gemisch
Waschen: 5x 1 Minute, 2x 15 Minuten, 1x 30 Minuten bei Raumtemperatur mit PBST
Entwickeln: 5 Minuten mit 2 ml ECL Plus A und 50 µl ECL Plus B
Messen: Scanner: 473 nm mit Y520 und O580

4 E. coli: Resultate

4.1 NK15 und K15 in pQE-8 und pET-9a

Die Vektoren pQE-8 und pET-9a wurden schon mehrfach in unserem Labor zur Expression von größeren Mengen Protein verwendet [Douglas *et al.* (2002); Marti *et al.* (1997); Marti *et al.* (1994)], insbesondere auch für die Überexpression von kleineren Untereinheiten von humanem Plasminogen (hPg) wie in der Einleitung näher erläutert. Die Expression der Gene in pQE-8 Vektoren erfolgte in M15[pREP4] oder SG13009[pREP4] Zellen, Gene in pET-9a Vektoren hingegen in BL21(DE3) Zellen. Die rekombinanten Proteine trugen im Falle einer Expression mit pQE-8 eine N-terminale Polyhistidinsequenz, einen sogenannten „His-tag“, während in pET-9a exprimierte Proteine mit einem N-terminalen Methionin begannen. Somit standen für die Reinigung der aus pQE-8 überexprimierten Proteine zwei Arten von Affinitätschromatographie zur Verfügung, nämlich Bindung an eine Ni^{2+} -haltige Matrix, beziehungsweise an Lysin-Bio-Gel, für Proteine aus pET-9a hingegen nur die Chromatographie an Lysin-Bio-Gel. Die pET-9a Konstrukte wurden nicht weiter verändert, die pQE-8 Konstrukte wurden jedoch so ausgestattet, dass nach erfolgter Proteinreinigung die Möglichkeit bestand, den unerwünschten N-terminalen Teil mittels Faktor Xa wegzuschneiden, um Proteine mit natürlichem N-Terminus herzustellen. Diese Protease wurde ausgewählt, weil man in früheren Experimenten mit Fragmenten von hPg gute Erfahrungen gemacht hatte [Söhnle *et al.* (1996); Marti *et al.* (1994)]. Zwei der insgesamt vier Konstrukte begannen mit dem N-terminalen Peptid (NTP), d.h. mit Glutaminsäure¹, und enthielten die 5 Kringel K1 - K5 bis zum Alanin⁵⁴³. Die anderen zwei Konstrukte hatten zwar den gleichen C-Terminus, starteten aber ohne NTP mit dem ersten Kringel bei Tyrosin⁸⁰. Diese Aminosäure wurde dem Lysin⁷⁸, welches den N-Terminus des natürlichen Lys-Plasminogens darstellt, vorgezogen, da ein endständiges Lysin durch Wechselwirkungen mit den Lysinbindungsstellen (LBS) der Kringel vor allem Bindungsstudien und die Messung von Dissoziationskonstanten, sowie allenfalls die Isolation hätte stören können [Rijken und Sakharov (2001)]. Zudem entsprach Tyrosin⁸⁰ gerade der 5'-terminalen Exongrenze des Exons 4 des hPg. Wie in Figur 4.1 dargestellt, werden nachfolgend die Gene immer als NK15pQE-8, K15pQE-8, NK15pET-9a beziehungsweise K15pET-9a, die daraus resultierenden Proteine als HXNK15, HXK15, NK15 respektive K15 bezeichnet.



Figur 4.1: **DNA-Konstrukte und ihre Proteine.** NK15pQE-8: Gen von NTP bis K5 in pQE-8. HXNK15: Protein von NTP bis K5 mit N-terminalem „His-tag“ und Faktor Xa (FXa) Schnittstelle. K15pQE-8: Gen von K1 bis K5 in pQE-8. HXK15: Protein von K1 bis K5 mit N-terminalem „His-tag“ und Faktor Xa Schnittstelle. NK15pET-9a: Gen von NTP bis K5 in pET-9a. NK15: Protein von NTP bis K5 mit N-terminalem Methionin. K15pET-9a: Gen von K1 bis K5 in pET-9a. K15: Protein von K1 bis K5 mit N-terminalem Methionin.

4.1.1 Molekularbiologie

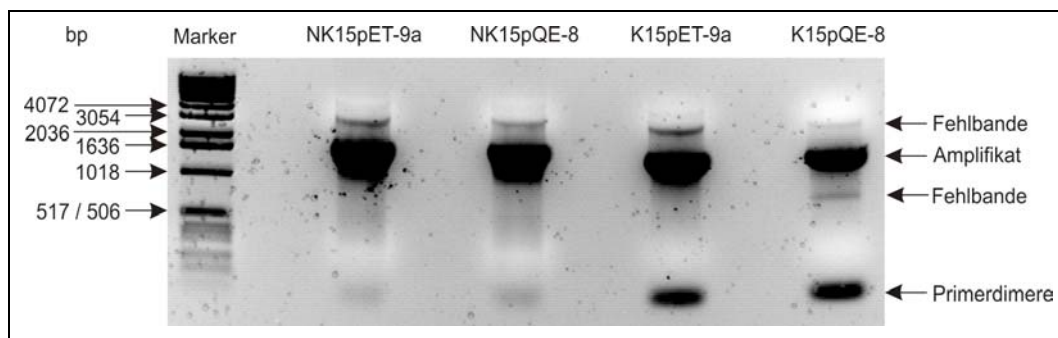
4.1.1.1 PCR

Das Plasmid pPLGKG, welches die cDNA des hPg trägt, wurde aus 100 ml über Nacht in LB gewachsenen HB101 Zellen mittels HiSpeed™ Plasmid Midi Kit isoliert. Das in der „supercoiled“-Form vorliegende Plasmid wurde mit *Bam*HI linearisiert, um die DNA für die Primer zugänglicher zu machen. Die Primer wurden vor der PCR mittels ESI-MS auf die richtige Masse hin überprüft (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Massen der Primer mittels ESI-MS ermittelt

Primer	Masse theoretisch	Masse gemessen
HXNK15 for	13966.0 Da	13965.63 ± 2.51 Da
HXK15 for	12963.4 Da	12964.13 ± 1.81 Da
NK15 for	12108.8 Da	12109.13 ± 2.06 Da
K15 for	13040.4 Da	13040.38 ± 1.54 Da
HC back	11343.4 Da	11343.56 ± 2.11 Da

Die PCR wurde mit *Pfu* Polymerase während 35 Zyklen vollzogen und lieferte vier verschiedene Amplifikate. Diese wurden mittels MinElute™ Gel Extraction Kit aus einem Agarosegel von 1.0% isoliert, um Primerdimere und Fehlbanden (Figur 4.2), sowie den PCR Puffer zu eliminieren.



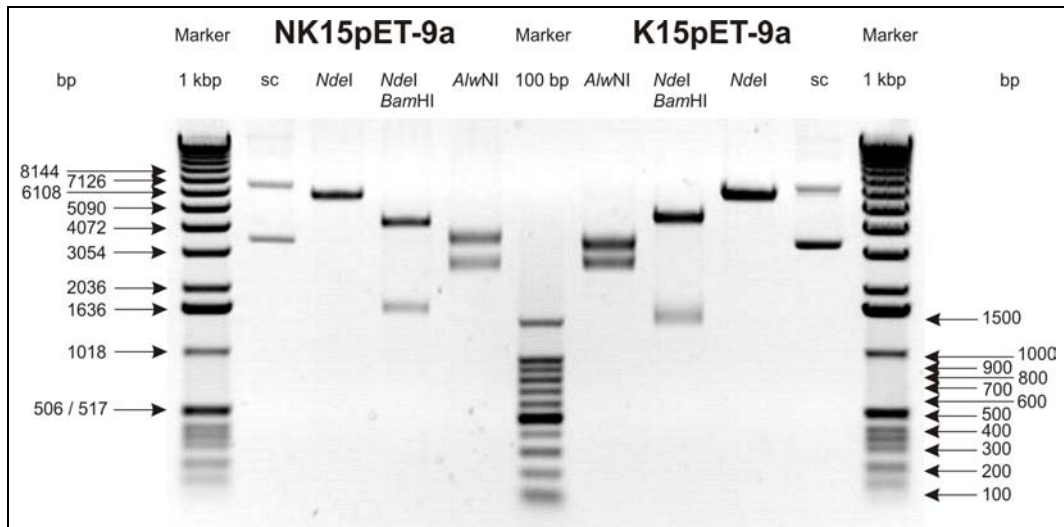
Figur 4.2: **PCR-Amplifikate.** Marker: 1 kbp DNA Grössenstandard. NK15pET-9a: 1659 bp. NK15pQE-8: 1665 bp. K15pET-9a: 1422 bp. K15pQE-8: 1428 bp.

4.1.1.2 Ligation und Transformation

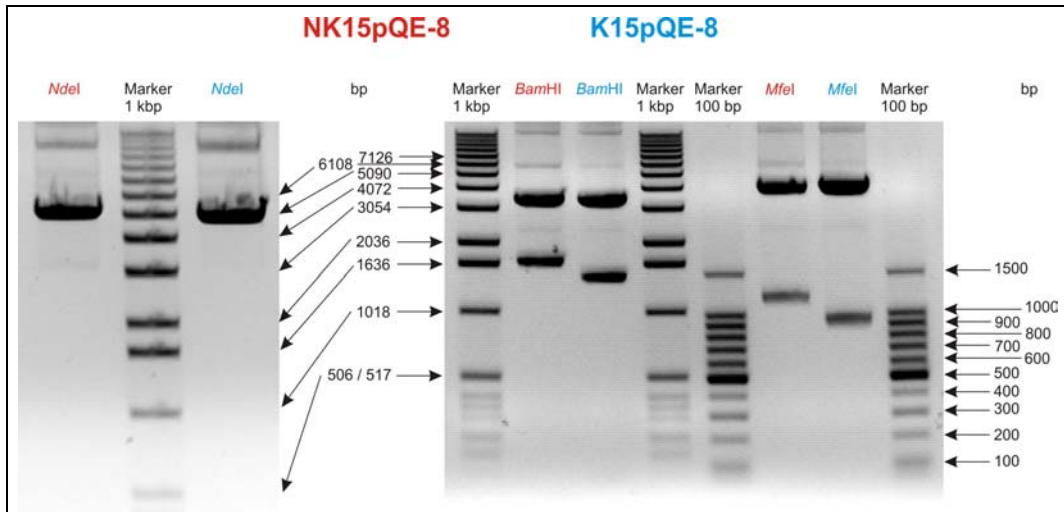
Aus 100 ml über Nacht in LB gewachsenen JM109 und LR2/168 Zellen wurden mittels HiSpeed™ Plasmid Midi Kit die Vektoren pET-9a respektive pQE-8 isoliert. Das Plasmid pET-9a wurde mit *Nde*I und *Bam*HI verdaut, pQE-8 jedoch nur mit *Bam*HI. Beide Vektoren wurden für die Ligation mittels MinElute™ Gel Extraction Kit aus einem Agarosegel von 0.7% isoliert und mit SAP dephosphoryliert. Die vier PCR-Amplifikate wurden ebenfalls entsprechend mit *Bam*HI und für die Ligation mit pET-9a noch zusätzlich mit *Nde*I verdaut. Nach der Reinigung mittels MinElute™ Gel Extraction Kit wurden die PCR-Amplifikate mit dem entsprechenden Plasmid in einen Ligationsansatz gegeben und zur Reaktion stehen gelassen. Chemisch-kompetente XL1-Blue Zellen wurden mit den Ligationsansätzen transformiert und über Nacht auf LB-Agar Platten wachsen gelassen. Nur die Transformation mit den pET-9a Ligationsansätzen führte zu einigen wenigen Kolonien, deren Plasmide das gewünschte PCR-Produkt eingebaut hatten. Die Transformation mit den pQE-8 Ligationsansätzen war jedoch ergebnislos. Deshalb wurde, um diese Konstrukte zu erhalten, mit neuen pQE-8 Ligationsansätzen eine Elektroporation mit elektrokompenten XL1-Blue Zellen durchgeführt. Diesmal fanden sich mehrere Kolonien mit den gewünschten Konstrukten. Von den vier Plasmid-tragenden Zellvarianten wurde je eine 100 ml Übernachtskultur angesetzt, mittels HiSpeed™ Plasmid Midi Kit die Zellen aufgeschlossen und die Plasmide isoliert. Chemisch-kompetente BL21(DE3) Zellen wurden mit den pET-9a Konstrukten transformiert, M15[pREP4] Zellen mit den pQE-8 Konstrukten.

Die mittels HiSpeed™ Plasmid Midi Kit isolierten Plasmide NK15pET-9a und K15pET-9a wurden mit drei Restriktionsansätzen (Figur 4.3) auf ihre Richtigkeit überprüft. Mit *Nde*I wurden die Plasmide linearisiert, mit *Nde*I und *Bam*HI konnten die „Inserts“ nachgewiesen werden, und mit *A*lvNI konnte die

Richtung der „Inserts“ bestätigt werden, sowie Mehrfachinsertionen ausgeschlossen werden. Ebenfalls mit drei Restriktionsansätzen (Figur 4.4) konnten die mittels HiSpeed™ Plasmid Midi Kit isolierten Plasmide NK15pQE-8 und K15pQE-8 analysiert werden. Mit *NdeI* wurden die Plasmide linearisiert, mit *BamHI* konnten die „Inserts“ nachgewiesen werden, und mit *MfeI* konnte die Richtung der „Inserts“ bestimmt werden, sowie Mehrfachinsertionen ausgeschlossen werden. Alle vier Plasmide wurden mit Standardprimern, auf die Promotorregionen passend, sequenziert. Damit konnte die fehlerfreie Sequenz der „Inserts“ bestätigt werden.



Figur 4.3: **Restriktion von NK15pET-9a und K15pET-9a.** Marker 1 kbp: 1 kbp Grössenstandard. Marker 100 bp: 100 bp Grössenstandard. NK15pET-9a: sc: „supercoiled“, *NdeI*: 5942 bp, *NdeI* / *BamHI*: 4302 / 1640 bp, *AlwNI*: 3386 / 2556 bp. K15pET-9a: *AlwNI*: 3150 / 2556 bp, *NdeI* / *BamHI*: 4302 / 1404 bp, *NdeI*: 5706 bp, sc: „supercoiled“.



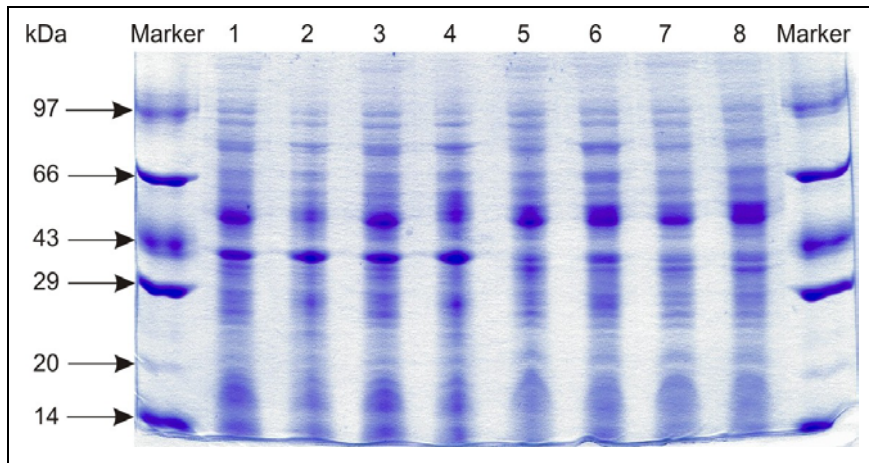
Figur 4.4: **Restriktion von NK15pQE-8 und K15pQE-8.** Marker 1 kbp: 1 kbp Grössenstandard. Marker 100 bp: 100 bp Grössenstandard. **NK15pQE-8**: *NdeI*: 5080 bp, *BamHI*: 3427 / 1653 bp, *MfeI*: 3964 / 1116 bp. **K15pQE-8**: *NdeI*: 4843 bp, *BamHI*: 3427 / 1416 bp, *MfeI*: 3964 / 879 bp.

4.1.2 Proteinchemie

4.1.2.1 Expression im Kleinansatz

In 5 ml LB wurden die vier sequenzierten Klone über Nacht angezogen und für die Expression in 100 ml LB überführt. Nach 3 Stunden Wachstum wurden die Zellen induziert und weitere 3 Stunden inkubiert. Die Analyse der entnommenen Proben vor der Induktion und nach 3 Stunden Expression

wurde mit SDS-PAGE (Figur 4.5) und Immunoblotting durchgeführt. Bei keinem der Klone konnte eine eindeutige Überexpression des Proteins der gewünschten Grösse nachgewiesen werden. Auch die Analyse von weiteren nicht-sequenzierten Klonen ergaben keine eindeutigeren Resultate.



Figur 4.5: SDS-PAGE zum Nachweis der Überexpression im Kleinansatz. Marker: SDS-PAGE Grössenstandard. Bahnen 1, 3, 5, 7: Vor der Induktion. Bahnen 2, 4, 6, 8: Nach 3 Stunden Expression. Bahnen 1 und 2: NK15. Bahnen 3 und 4: K15. Bahnen 5 und 6: HXNK15. Bahnen 7 und 8: HXK15.

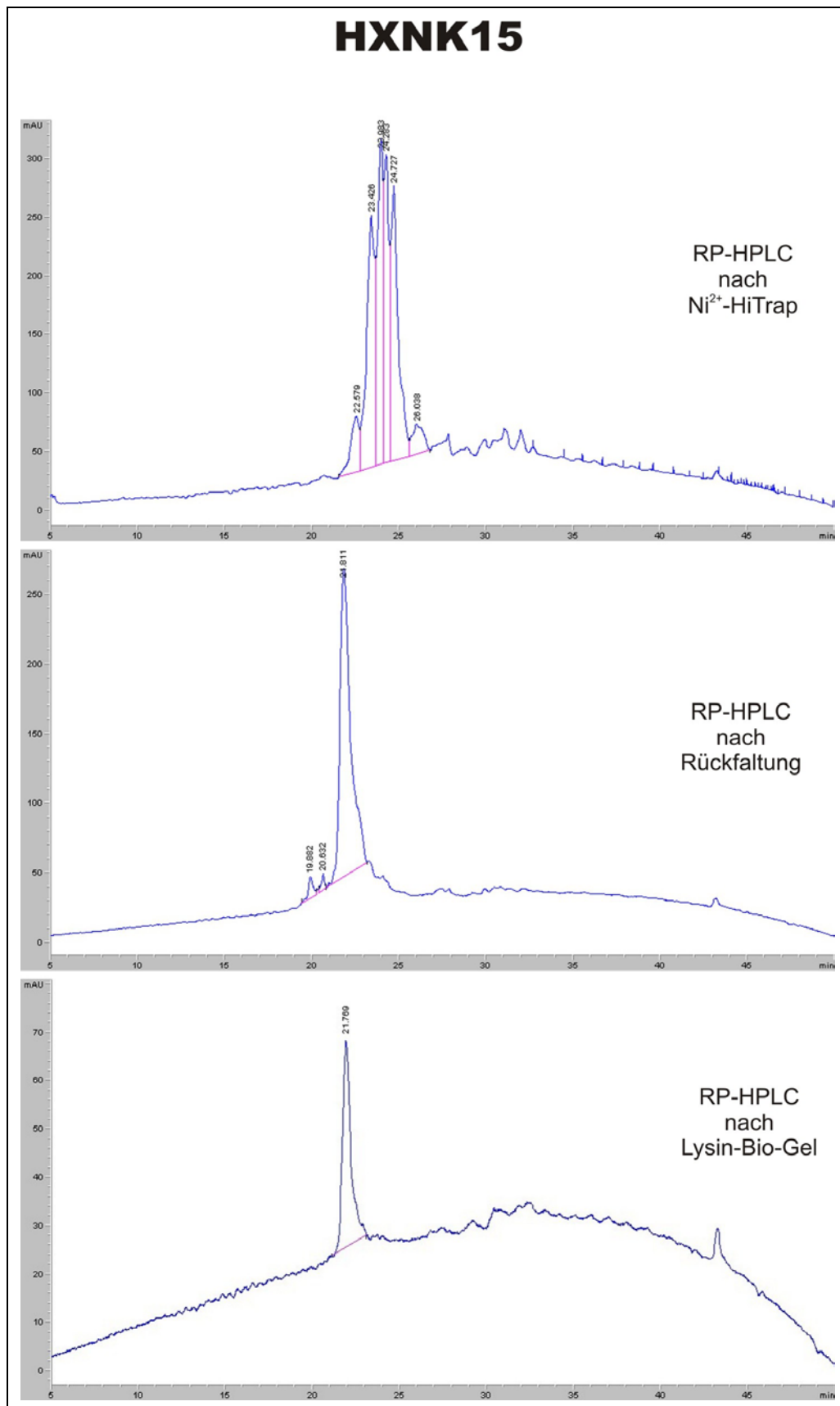
Wurden exprimierte pET-9a Konstrukte in BL21(DE3) Zellen unter nicht-denaturierenden, d.h. nativen Bedingungen aufgeschlossen und über eine Lysin-Bio-Gel Säule chromatographiert, wurde kein oder zumindest keine nachweisbare Menge Protein spezifisch gebunden. Dies liess den Schluss zu, dass die Proteine NK15 und K15 entweder nicht produziert wurden, oder aber als sogenannte „inclusion bodies“ in den Zellen aggregiert waren. Im letzteren Fall musste davon ausgegangen werden, dass die Proteine nicht richtig gefaltet waren; denn bereits einzelne Kringel, welche durch rekombinante Expressionen aus *E. coli* gewonnen wurden, mussten, um biologisch aktives Material zu erhalten, *in vitro* zurückgefaltet werden [siehe beispielsweise Marti *et al.* (1997)].

Die denaturierend isolierten Lysate von M15[pREP4] Zellen, die die exprimierten pQE-8 Konstrukte enthielten, hatten den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu NK15 und K15 ohne Rückfaltung an einer Ni-Chelat Säule chromatographiert werden konnten. Demnach wurden die Lysate mittels Ni-NTA Spin Kit gereinigt und mit RP-HPLC analysiert. Hierbei konnte bei beiden Konstrukten je ein kleiner breiter inhomogener Peak entdeckt werden, was auf wenig Protein in verschiedenen Faltungszuständen hindeutete.

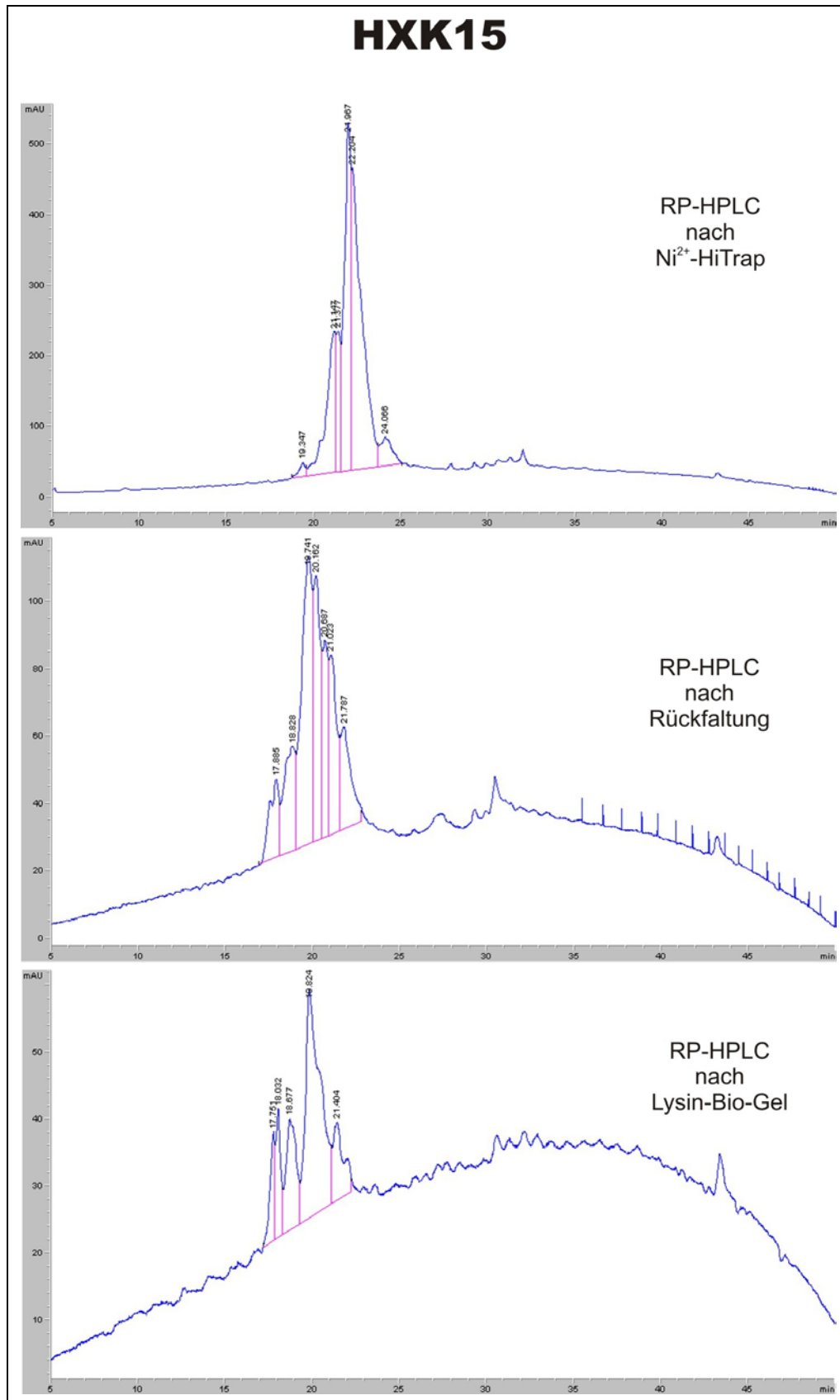
Aus diesen Gründen wurde die Isolation von HXNK15 und HXK15 gegenüber jener von NK15 und K15 als erfolgversprechender betrachtet und mit grösseren Ansätzen in Angriff genommen. Zudem wurde versucht mit Übernacht-Expressionen bei Raumtemperatur statt bei 37°C mehr Protein herzustellen. Frank (2002) konnte nämlich für den in der Grösse vergleichbaren α_2 -Plasmininhibitor zeigen, dass bei grösseren Proteinen dadurch die Ausbeute gesteigert werden konnte. Die für *E. coli* nicht physiologische Raumtemperatur vermag in gewissen Fällen die Proteinaggregation in „inclusion bodies“ zu verhindern, indem die Ausbildung von „Chaperons“ induziert wird und damit eine korrekte Rückfaltung des exprimierten Proteins die Folge sein kann [Baneyx (1999); Makrides (1996)].

4.1.2.2 Expression im Grossansatz

Um aus 2 l Kulturen die Proteine HXNK15 und HXK15 isolieren zu können, wurden zunächst je 5 ml LB mit den verschiedenen M15[pREP4] Zellstämmen inokuliert und nach 8 Stunden in 100 ml LB überimpft. Mit diesen Übernacht-Kulturen wurden je 2 l LB angeimpft und nach 5 Stunden Inkubation die Zellkulturen induziert. Nach der Übernacht-Expression bei 20°C wurde das Abtropfgewicht bestimmt, welches jeweils ca. 4 g/l Kultur entsprach. Die Zellen wurden denaturierend lysiert und mittels einer mit Ni^{2+} -beladenen HiTrap™ Chelating HP Säule auf dem ÄKTA prime System pH-abhängig chromatographiert. Das Eluat wurde mit DTT vollständig reduziert und anschliessend unter langsamer Zugabe von oxidiertem und reduziertem Glutathion *in vitro* zurückgefaltet, sowie dialysiert. Das zurückgefaltete Dialysat wurde mittels einer Lysin-Bio-Gel Säule als zweitem Reinigungsschritt chromatographiert und sauer dialysiert. Die Reinigung der beiden Proteine wurde mittels RP-HPLC (Figuren 4.6 und 4.7) analysiert. Die Ausbeuten der Lyophilisate nach Reinigung über Lysin-Bio-Gel Säule betrugen hochgerechnet 0.4 mg/l Kultur im Falle von HXNK15, bei HXK15 sogar 0.5 mg/l Kultur.



Figur 4.6: Analyse von HXNK15 mittels RP-HPLC in Gegenwart von 0.1% TFA bei 210 nm. Chromatogramm 1: Eluat nach der Reinigung mittels Ni^{2+} -beladener HiTrapTM Chelating HP Säule auf dem ÄKTA prime System, Retentionszeit des Hauptpeaks: 24.0 min. Chromatogramm 2: Dialysat nach der Rückfaltung, Retentionszeit: 21.8 min. Chromatogramm 3: Eluat nach der Reinigung mittels Lysin-Bio-Gel Säule, Retentionszeit: 21.8 min.



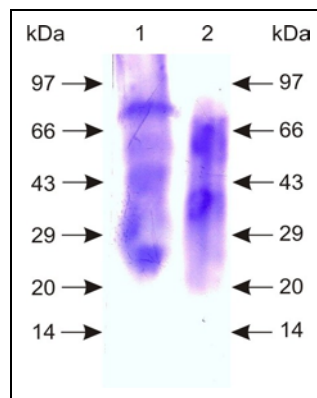
Figur 4.7: Analyse von HXK15 mittels RP-HPLC in Gegenwart von 0.1% TFA bei 210 nm. Chromatogramm 1: Eluat nach der Reinigung mittels Ni^{2+} -beladener HiTrap™ Chelating HP Säule auf dem ÄKTA prime System, Retentionszeit des Hauptpeaks: 22.0 min. Chromatogramm 2: Dialysat nach der Rückfaltung, Retentionszeit des Hauptpeaks: 19.7 min. Chromatogramm 3: Eluat nach der Reinigung mittels Lysin-Bio-Gel Säule, Retentionszeit des Hauptpeaks: 19.8 min.

Im Falle von HXNK15 (Figur 4.6) konnten nach der Reinigung auf einer Ni^{2+} -beladenen Säule mehrere einander überlagernde Peaks beobachtet werden. Zwar hatte der „His-tag“ gebunden, aber das isolierte Protein war nicht homogen gefaltet. Nach der Rückfaltung wurde ein einzelner Peak beobachtet, jedoch immer noch mit einer kleinen Schulter. Diese ging nach dem zweiten Reinigungsschritt mittels Lysin-Bio-Gel Säule fast gänzlich verloren. Zusätzlich fand eine Verschiebung der Retentionszeit statt, wenn man die Chromatogramme vor und nach der Rückfaltung verglich. Dies wurde schon mehrfach bei der denaturierenden Isolation und Rückfaltung von Kringeln beobachtet [siehe z.B. Douglas *et al.* (2002)] und konnte daher als positiver Hinweis zur korrekten Rückfaltung betrachtet werden. Der Effekt dürfte von der sich ändernden Hydrophobizität an der Oberfläche des Proteins herrühren.

Etwas anders sah es mit der Isolation des anderen Proteins HXK15 (Figur 4.7) aus. Nach dem ersten Reinigungsschritt durch Affinität des „His-tags“ an Nickel konnten ebenfalls mehrere einander überlagernde Peaks beobachtet werden. Allerdings verbesserte sich das Bild nur unwesentlich nach Rückfaltung und selbst nach Reinigung über eine Lysin-Bio-Gel Säule. Allerdings konnte auch hier eine Verschiebung zu kürzeren Retentionszeiten beobachtet werden.

Aus den ESI-MS Massenspektren beider Proteine gingen keine für Proteine charakteristische „Envelopen“ hervor, aus welchen sich Massen hätten berechnen lassen. Zudem betrug der durch Aminosäureanalyse bestimmte Proteingehalt, unter Annahme, dass es sich nur um das richtige Protein handelte, lediglich 10%. Jedoch ergab die Sequenzierung nach Edman von beiden Proben die gesuchte Aminosäuresequenz, die an fünfter Stelle den „His-tag“, an dreizehnter Stelle die Erkennungssequenz für den Faktor Xa und anschliessend Glutaminsäure¹ respektive Tyrosin⁸⁰ beinhaltete. Hingegen ergab die Analyse mittels SDS-PAGE und Immunoblotting (Figur 4.8) bei HXNK15 mehrere relativ breite Banden, sowie eine schwache Bande um 70 - 75 kDa. Im Falle von HXK15 waren nur Banden unterhalb des Bereichs des gesuchten Proteins beobachtbar.

Aufgrund dieser Befunde, aber vor allem wegen der RP-HPLC Chromatogramme und der Immunoblots der beiden Proteine, wurde entschieden, nur noch mit dem Protein HXNK15 weitere Experimente durchzuführen. Dabei wurde versucht, der Fragmentierung, wie sie auf dem SDS-PAGE zu sehen war, beizukommen und die Frage zu klären, ob es sich dabei um proteolytische Prozesse handelte oder ob schon bei der Translation verschieden lange Produkte gebildet wurden.



Figur 4.8: Immunoblot Analyse von HXNK15 und HXK15. Bahn 1: HXNK15. Bahn 2: HXK15.

4.1.2.3 Versuche zur Optimierung der Isolationsmethoden

Um die sehr geringen Ausbeuten zu verbessern, wurden diverse Optimierungen und Änderungen ausprobiert, allerdings ohne Erfolg. Die sogenannte native Isolation ohne Verwendung denaturierender Agentien, wie bei der Isolation des α_2 -Plasmininhibitors aus *E. coli* verwendet [Frank (2002)], war erfolglos, sowohl über Ni^{2+} -beladene HiTrap™ Chelating HP Säule, als auch über Lysin-Bio-Gel. Die konsequente Verwendung von 5 mM 2-Mercaptoethanol (HSEtOH) im ganzen denaturierenden Isolationsverfahren, um die Proteine und ihre „His-tags“ vollständig offenkettig zu halten, brachte auch keine verbesserte Bindung an die Ni-Chelat Säule. Die Verkürzung des ganzen Isolationsverfahrens auf einen einzigen Tag, mit denaturierendem Aufschluss unter Verwendung von 2-Mercaptoethanol und Rückfaltung auf der Ni^{2+} -beladenen HiTrap™ Chelating HP Säule des ÄKTA prime Systems, brachte ebenfalls keine Verbesserung. Allerdings konnte diese Methode erfolgreich bei der Isolation von rekombinantem K3 und NK1 angewandt werden, wo sich auch zeigte, dass das Umstellen von Gu-Puffer (Gu-HCl-Puffer mit 2-Mercaptoethanol, siehe Kapitel 2.2.1.4) auf Urea-Puffer (Harnstoff-Puffer mit 2-Mercaptoethanol, siehe Kapitel 2.2.1.4) vor der Rückfaltung einen eindeutig positiven Einfluss auf die Reinheit der Proteine hatte. Die Versuche sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

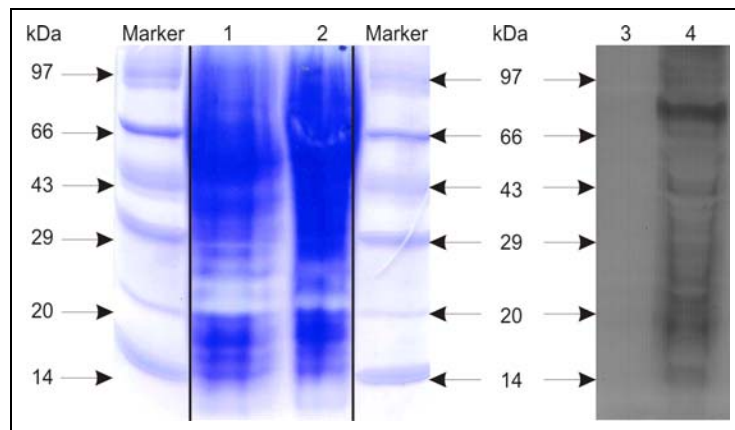
Tabelle 4.2: Versuche zur Optimierung der Isolationsmethoden

Angewandte Methoden	Resultate
1 Nativer Aufschluss (2.2.2.1.3) Native Reinigung auf Ni-Chelat (2.2.2.2.4)	Chromatogramm: Kleiner Peak Immunoblot: Nur kleine Fragmente RP-HPLC: Mehrere kleine Peaks MS: Nicht auswertbar
2 Nativer Aufschluss (2.2.2.1.3) Reinigung auf Lysin-Bio-Gel (2.2.2.3.2)	Chromatogramm: Kein Peak
3 Denaturierender Aufschluss (2.2.2.1.2) + HSEtOH pH-Reinigung auf Ni-Chelat (2.2.2.2.2) + HSEtOH	Chromatogramm: Grosser Peak Immunoblot: Bande richtiger Grösse + kleine Fragmente RP-HPLC: 1 Peak MS: Nicht auswertbar
4 Denaturierender Aufschluss (2.2.2.1.2) + HSEtOH Rückfaltende Reinigung auf Ni-Chelat (2.2.2.2.3)	Chromatogramm: Grosser Peak Immunoblot: Bande richtiger Grösse + kleine Fragmente RP-HPLC: 1 Peak + mehrere kleine Peaks MS: Nicht auswertbar

4.1.2.4 Analyse von HXNK15 aus dem besten Grossansatz

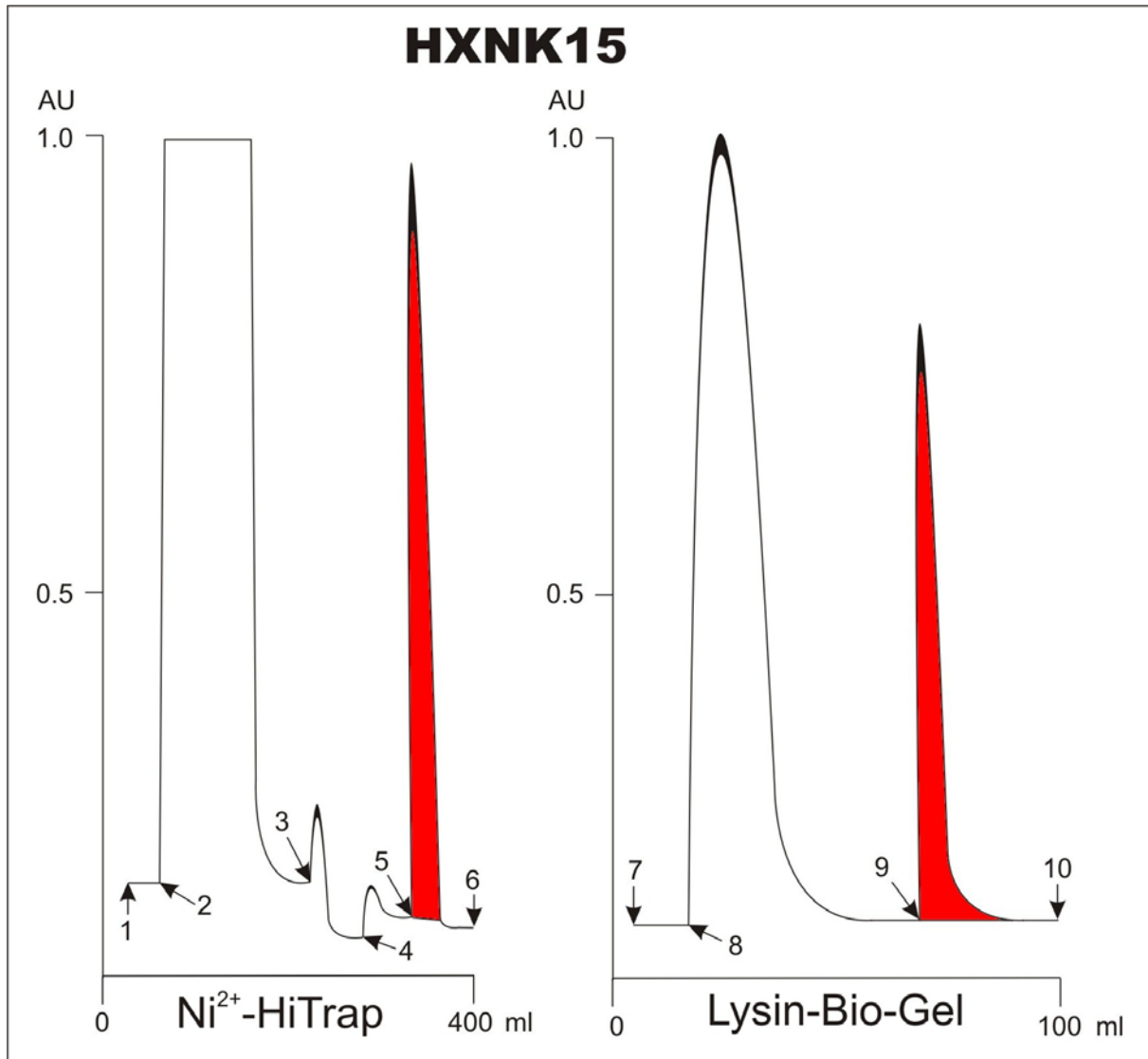
All die vorangehenden Versuche, die Fragmentierung des Proteins durch schnellere Isolation und Reinigung zu unterdrücken, fruchteten nicht. Demnach waren für das Auftreten der Proteinfragmente kaum die proteolytischen Prozesse während der Isolation verantwortlich, denn selbst unter Zugabe von Proteaseinhibitoren wurden keine besseren Resultate erzielt. Vielmehr schienen die Fragmente bereits bei der Translation zu entstehen, weil möglicherweise entscheidende Sequenzen der mRNA wegen deren stabilen 3D-Struktur schlecht zugänglich waren. Vielleicht war auch der „codon usage“ von *E. coli* ungeeignet für das humane Gen, sodass, weil gewisse Codons und deren tRNAs in *E. coli* sehr selten sind, dies zur frühzeitigen Termination oder einem „frame shifting“ führte [Rosenberg *et al.* (1993)].

Deshalb wurde das NK15pQE-8 Konstrukt neu in *E. coli* SG13009[pREP4] kloniert. Der von Gottesman *et al.* (1981) beschriebene Stamm konnte nämlich gewisse in M15[pREP4] schwer zu exprimierenden Proteine in grösseren Mengen herstellen. Die Analyse mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unmittelbar nach dem Ernten der während 3 Stunden induzierten Zellen ist in Figur 4.9 dargestellt. Eine intensive Bande um 70 - 75 kDa hätte das gesuchte Protein HXNK15 sein können. Diese abgeschätzte Masse war zwar grösser als die theoretische Masse von 63 kDa, doch wurde schon verschiedentlich in unserem Labor eine Verlagerung zu grösseren Massen beobachtet, wenn Kringel auf SDS-PAGE aufgetrennt wurden [von Haller (1999)]. Zusätzlich zu dieser Bande waren vor allem im niedermolekularen Bereich etliche weitere Banden zu sehen, was auf mögliche kürzere Fragmente hindeutete.



Figur 4.9: SDS-PAGE und Immunoblot von SG13009[pREP4] mit dem NK15pQE-8 Konstrukt. Marker: SDS-PAGE Grössenstandard. Bahn 1: SDS-PAGE Analyse vor der Induktion. Bahn 2: SDS-PAGE Analyse nach 3 Stunden Induktion. Bahn 3: Immunoblot Analyse vor der Induktion. Bahn 4: Immunoblot Analyse nach 3 Stunden Induktion.

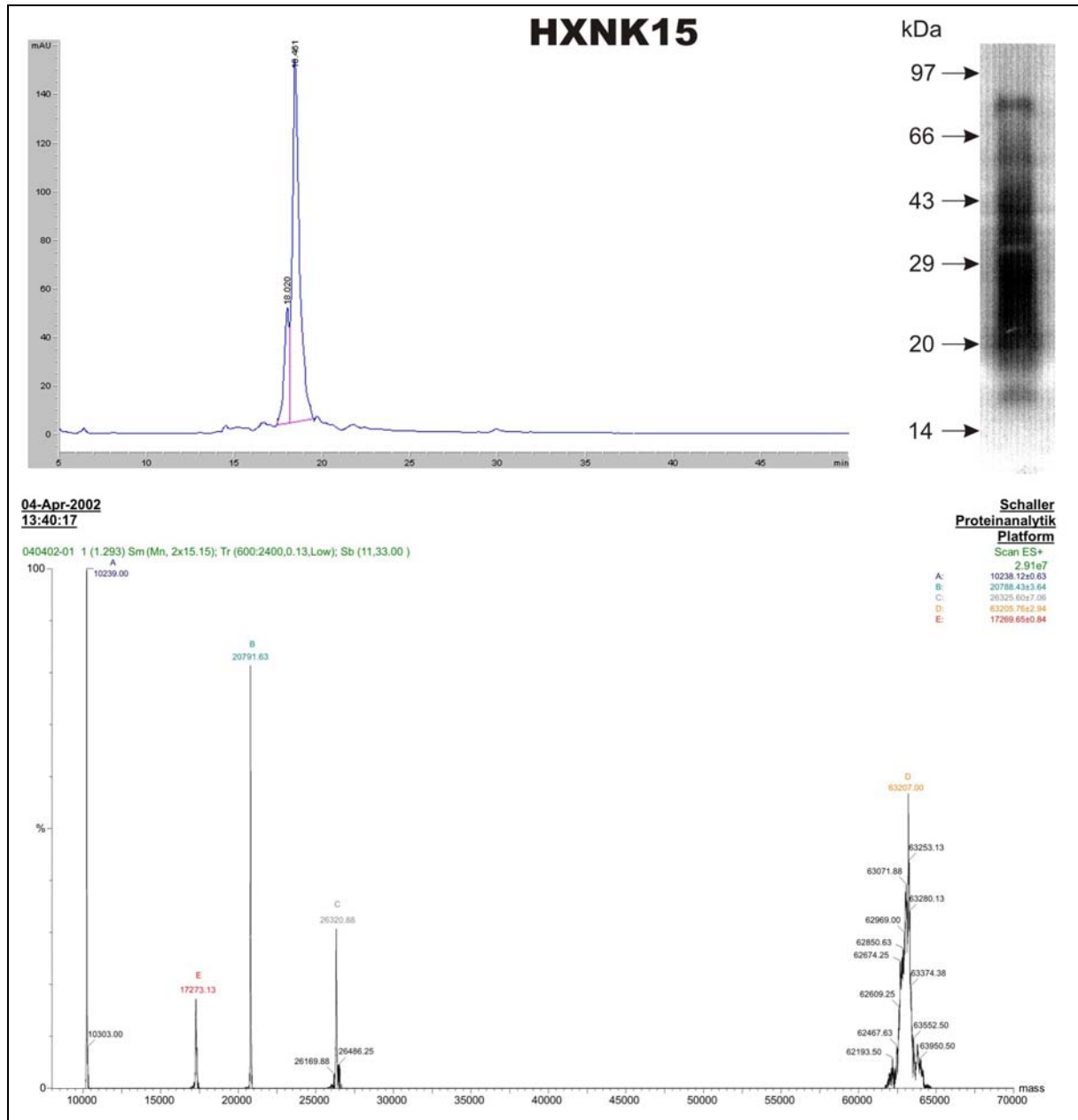
In einer neuen Expression in 1 l LB wurde versucht, genügend und reines Material herzustellen, um davon zumindest die genaue Masse mittels ESI-MS bestimmen zu können. 5 ml LB wurden mit den Zellen inokuliert und während 8 Stunden angezogen. 100 ml LB wurden 1:100 mit dieser Starterkultur angeimpft und über Nacht wachsen gelassen. Mit 30 ml wurde schliesslich 1 l LB angeimpft, für 5 Stunden inkubiert und über Nacht bei Raumtemperatur induziert. Die Lyse der Zellen wurde während einer Stunde bei Raumtemperatur mit Gu-HCl-Puffer durchgeführt und der Überstand über eine mit Ni^{2+} -beladene HiTrap™ Chelating HP Säule auf dem ÄKTA prime System pH-abhängig chromatographiert (Figur 4.10). Das Eluat wurde mit DTT reduziert und mit reduziertem sowie oxidiertem Glutathion zurückgefaltet. Nach 5 Dialysen in Natriumphosphatpuffer wurde das Dialysat mittels Lysin-Bio-Gel Säule chromatographiert (Figur 4.10). Das Eluat wurde in leicht saurem Wasser dialysiert und lyophilisiert.



Figur 4.10: **Darstellung von Affinitätschromatogrammen Ni^{2+} -beladener HiTrap™ Chelating HP Säule und Lysin-Bio-Gel Säule.** Chromatogramm 1: Chromatogramm auf Ni^{2+} -Chelat Säule. Punkt 1: Säule äquilibriert mit Gu-HCl-Puffer pH 8.5. Punkt 2: Zelllysate laden und Säule waschen mit Gu-HCl-Puffer pH 8.5. Punkt 3: Säule waschen mit Gu-HCl-Puffer pH 6.3. Punkt 4: Säule waschen mit Gu-HCl-Puffer pH 5.9. Punkt 5: Eluieren mit Gu-HCl-Puffer pH 4.5. Punkt 6: Ende des Chromatogramms. Chromatogramm 2: Chromatogramm auf Lysin-Bio-Gel Säule. Punkt 7: Säule äquilibriert mit Natriumphosphatpuffer pH 8.5. Punkt 8: Dialysat laden und Säule waschen mit Natriumphosphatpuffer pH 8.5. Punkt 9: Eluieren mit 200 mM 6-AHA in Natriumphosphatpuffer pH 8.5. Punkt 10: Ende des Chromatogramms. Die roten Bereiche wurden gesammelt und weiterverarbeitet.

Die Ausbeute war sehr gering und betrug etwa 200 µg/l Kultur. Das RP-HPLC wurde in Gegenwart von 0.5% Ameisensäure statt 0.1% TFA durchgeführt, weil sich durch letzteres schon mehrfach eine Signalunterdrückung („Quenching“) im ESI-MS manifestierte, wenn man das Eluat direkt einspritzte.

Das RP-HPLC Chromatogramm (Figur 4.11) zeigte im wesentlichen 1 Peak mit einer kleinen vorgelagerten Schulter, was möglicherweise von inhomogenem Material herrührte. Die N-terminale Sequenzierung nach Edman lieferte hingegen eine eindeutige Sequenz mit sehr geringen Verunreinigungen (Tabelle 4.3). Im Gegensatz dazu betrug unter Annahme, dass das gemessene Material hauptsächlich aus dem ganzen Protein HXNK15 bestand, der Gehalt aus der Aminosäurenanalyse lediglich 4.3%. Dies liess vermuten, dass es sich bei der Probe zwar um HXNK15 handelte, jedoch verschieden lange Fragmente isoliert werden konnten, die allesamt mit dem N-Terminus anfangen. Diese Theorie wurde schliesslich durch die Analyse mittels SDS-PAGE und Immunoblot, sowie einer Messung des RP-HPLC-Eluats mittels ESI-MS bestätigt (Figur 4.11). Demnach bestand die Probe nur zu einem Bruchteil aus dem ganzen Protein HXNK15, der identifizierbare Hauptbestandteil setzte sich vor allem aus einem NTP-Fragment bis zum Leucin⁷⁴ und einem NTP + K1-Fragment bis zur Glutaminsäure¹⁶⁵ zusammen, wobei die Zahlen der Nummerierung von hPg entsprechen.



Figur 4.11: **Analyse von HXNK15.** Oben links: RP-HPLC Chromatogramm in Gegenwart von 0.5% Ameisensäure bei 280 nm, Retentionszeit: 18.5 min. Oben rechts: Immunoblot. Unten: Massenspektrum gemessen mittels ESI-MS, Hauptmassepeaks: 10239.00 ± 0.63 Da, 20791.63 ± 3.64 Da und 63207.00 ± 2.94 Da.

Aus dem Massenspektrum konnten zwei Fragmente der Grösse 20791.63 ± 3.64 Da respektive 10239.00 ± 0.63 Da erkannt werden, die dem N-terminalen Peptid mit dem ersten Kringel ($M^{16} - E^{165}$), sowie nur dem NTP ($M^{16} - L^{74}$) zugeordnet werden konnten. Diese beiden Massen stimmten relativ

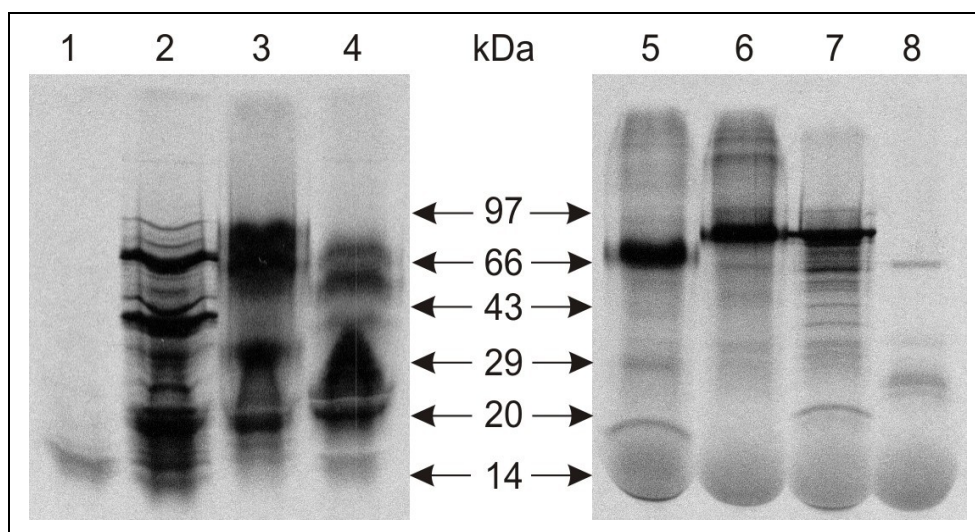
gut mit den theoretischen Werten überein, doch im Gegensatz dazu war der Peak bei $63'207.00 \pm 2.94$ Da sehr breit, wodurch eine genaue Bestimmung fast nicht möglich war. Es war aber mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass es sich um das ganze Protein HXNK15 handelte. Da die beiden Fragmente den grössten Teil der gemessenen Probe ausmachten, ist es nun klar, warum nur eine einzige Sequenz identifiziert werden konnte und weshalb der Gehalt so tief war. Das Ganze wurde durch den Immunoblot bestätigt. Die Resultate sind in Tabelle 4.3 zu finden.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der analytischen Resultate

ESI-MS:	<i>gemessen</i>	<i>theoretisch</i>
	63207.00 \pm 2.94 Da	63108.13 Da M ⁻¹⁶ - A ⁵⁴³ (HXNK15)
	26320.88 \pm 7.06 Da	-
	20791.63 \pm 3.64 Da	20791.08 Da M ⁻¹⁶ - E ¹⁶⁵ (HX + NTP + K1)
	17273.13 \pm 0.84 Da	-
	10239.00 \pm 0.63 Da	10239.49 Da M ⁻¹⁶ - L ⁷⁴ (HX + NTP)
	16951.63 \pm 1.32 Da	16951.48 Da (Referenz Myoglobin)
N-terminale Sequenzierung:	MRGSHHHHHHGSIEGREPLDDY	
Gehaltsbestimmung:	4.3%	
RP-HPLC:	18.5 min (mit 0.5% Ameisensäure)	
Immunoblot:	schwache Bande bei 70 - 75 kDa verschiedene niedermolekulare Banden	
Ausbeute:	200 µg/l Kultur	

4.1.2.5 Expression mit *in vitro* Transkriptions- / Translationssystemen

Zur *in vitro* Expression wurden zwei verschiedene Kits verwendet, wobei das prokaryontische System aus *E. coli*, das eukaryontische System aus Kaninchen-Reticulocytenlysate stammte. Beide Systeme dienen der *in vitro* Transkription / Translation in einem einzigen Ansatz und sind für Vektoren geeignet, die das zu exprimierende Gen nach einem T7 Promotor eingefügt haben. Dies traf auf die beiden Konstrukte NK15pET-9a und K15pET-9a in BL21(DE3) zu, welche nach den misslungenen Kleinan-sätzen nicht mehr weiterverfolgt worden waren. Mit den beiden Kits konnte nun die Transkription des Vektors und die Translation der mRNA in radioaktives Protein, mittels Zugabe von ³⁵S-Methionin, überprüft werden, wie dies in Figur 4.12 gezeigt ist.



Figur 4.12: *In vitro* Transkription / Translation von NK15pET-9a und K15pET-9a autoradiographisch detektiert. Bahnen 1 - 4: *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA. Bahnen 5 - 8: TNT[®] Quick Coupled Transcription / Translation System from Rabbit Reticulocyte Lysate. Bahn 1: keine DNA. Bahn 2: Luciferase (Referenz). Bahn 3: NK15. Bahn 4: K15. Bahn 5: K15. Bahn 6: NK15. Bahn 7: Luciferase (Referenz). Bahn 8: keine DNA.

Im prokaryontischen Expressionssystem waren sowohl bei der Referenz als auch bei den beiden Konstrukten mehrere intensive Banden zu beobachten. Die exprimierte Luciferase bei 65 kDa (theoretisch 61 kDa) entsprach in etwa den Erwartungen, sowie den Angaben und autoradiographischen Bilder des Produktvertreibers, auch was die zusätzlichen kleineren intensiven Banden betraf. Im Falle von NK15 konnte eine sehr intensive Doppelbande bei 60 - 75 kDa (theoretisch 61 kDa) erkannt werden, die zusammen mit weiteren kleineren intensiven Banden auf eine Expression von verschiedenen Proteinfragmenten hindeutete. Das Selbe war der Fall mit dem Konstrukt für K15, wo ebenfalls eine Doppelbande bei 55 - 70 kDa (theoretisch 52 kDa) beobachtet werden konnte.

Im eukaryontischen Expressionssystem waren sowohl für die Referenz als auch für die beiden Konstrukte je eine intensive Bande zu sehen. Für die Luciferase lag sie bei 70 kDa (theoretisch 61 kDa), für NK15 bei 70 kDa (theoretisch 61 kDa) und für K15 bei 65 kDa (theoretisch 52 kDa). Offensichtlich wurde durch das System eine generelle Verschiebung zu etwas grösseren Massen bezüglich des SDS-PAGE Grössenstandards verursacht. Demnach waren die beiden Konstrukte in Ordnung und führten mittels einem höheren eukaryontischen Transkriptions- / Translationssystem ohne weiteres zur Produktion der entsprechenden Proteine NK15 und K15.

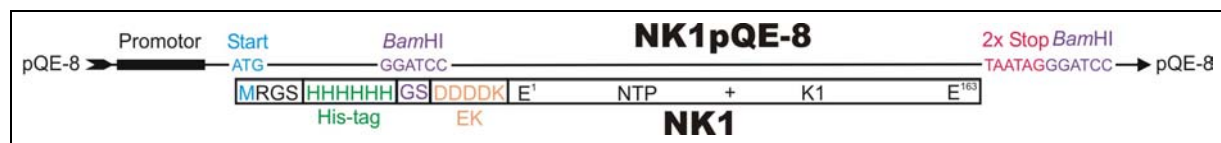
Mit diesem Vergleichsexperiment von prokaryontischem und eukaryontischem Expressionssystem konnten die Erfahrungen bezüglich der Expression der schweren Kette von hPg in *E. coli* belegt und untermauert werden, während die Expression in einem höheren eukaryontischen System offensichtlich weit weniger Probleme bot. Aufgrund der Aufgabenstellung bezüglich Herstellung von ^{15}N - und ^{13}C -markiertem Material kam letzteres aber eindeutig nicht in Frage wie in der Einleitung beschrieben. Einzig in Hefe könnte die Expression der Konstrukte versucht werden, da es sich um einen niederen eukaryontischen Organismus handelt und es relativ einfach wäre markierte Proteine herzustellen. Dies wurde schliesslich in *P. pastoris*, eine Expressionshefe, ausprobiert (siehe Kapitel 5).

4.2 NK1 in pQE-8

4.2.1 Expression von ^{15}N -markiertem NK1

Das Protein NK1 wurde von P. von Haller zum ersten Mal in unserer Gruppe kloniert und erfolgreich in LB und YT Medien exprimiert. Für die vorliegende Arbeit wurde nach Douglas *et al.* (2002) und von Haller (1999) verfahren und entsprechende Anpassungen vorgenommen, um das Protein NK1 mit ^{15}N markieren und in grösseren Mengen produzieren zu können.

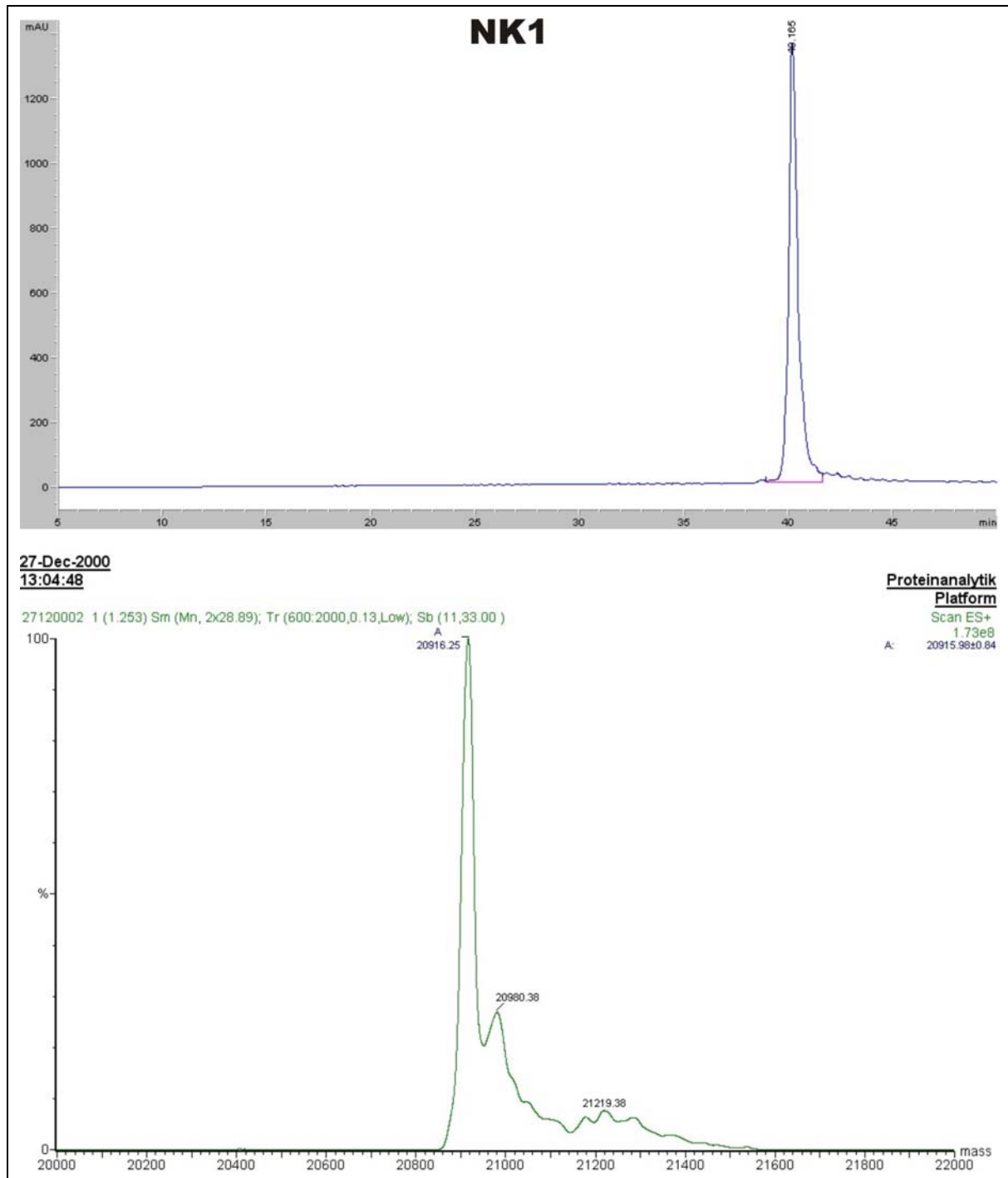
Das NK1pQE-8 Konstrukt wurde in BL21(DE3) Zellen transformiert, die das Plasmid pREP4 enthielten. Das exprimierte Protein NK1 bestand aus einem N-terminalen „His-tag“ und einer Enterokinaseschnittstelle. Allerdings wurde in der folgenden Arbeit auf einen Verdau mit Enterokinase verzichtet, weil schon von von Haller (1999) gezeigt wurde, dass sie zusätzlich in der Scharnierregion zwischen NTP und K1 an zwei Stellen ($\text{R}^{68} - \text{Met}^{69}$ und $\text{K}^{77} - \text{K}^{78}$) ebenfalls schnitt. In Figur 4.13 ist das Konstrukt dargestellt.



Figur 4.13: **DNA-Konstrukt und dessen Protein.** NK1pQE-8: Gen von NTP bis K1 in pQE-8. NK1: Protein von NTP bis K1 mit N-terminalem „His-tag“ und Enterokinaseschnittstelle (EK).

In 5 ml LB wurden die Zellen während 8 Stunden angezogen und in 300 ml ^{15}N -M9 Medium überimpft. Je 40 ml der Übernacht-Kultur wurde zu 6x 1 l ^{15}N -M9 Medium gegeben, während 4.5 Stunden inkubiert und weitere 5.5 Stunden unter Zugabe von IPTG induziert. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 3x 2 l Portionen gesammelt, um diese nacheinander weiterverwenden zu können. Die Zellen wurden denaturierend über Nacht lysiert und der Überstand auf einer Ni-NTA Säule pH-abhängig chromatographiert. Das Eluat wurde mit DTT über Nacht reduziert, die Proteine mit Glutathion in oxidiert und reduzierter Form zurückgefaltet und schliesslich in Natriumphosphatpuffer dialysiert. Im Dialyseschlauch war ein weisser Niederschlag erkennbar, der offensichtlich von nicht korrekt gefalteten Proteinen herrührte. Diese Beobachtung wurde schon mehrfach bei der Rückfaltung von rekombinanten Kringeln des hPg gemacht [siehe beispielsweise Marti *et al.* (1994)]. Das abzentrifugierte Dialysat wurde auf einer Lysin-Bio-Gel Säule chromatographiert. Das mit 6-AHA eluierte Protein wurde sauer

in mQH_2O -pH3.5 dialysiert, wobei der pH mit Ameisensäure eingestellt wurde. Vermutlich trug, wie unter Kapitel 2.2.2.3.2 näher erläutert, die Verwendung von Ameisensäure statt Salzsäure wesentlich zur Steigerung der Ausbeute um das Dreifache bei. De Vos *et al.* (1992) zeigten nämlich, dass die Kringel eine Affinität zu Chloridionen besitzen und damit deren Löslichkeit stark herabsetzen. Das Dialysat wurde lyophilisiert und für die Charakterisierung (Figur 4.14) weiterverwendet. Die Aufarbeitung des Proteins wurde mittels RP-HPLC verfolgt. Dabei konnte nach der Rückfaltung eine Verschiebung zu kürzerer Retentionszeit beobachtet werden (siehe auch Kapitel 4.1.2.2).



Figur 4.14: **Charakterisierung von NK1.** Oben: RP-HPLC Chromatogramm in Gegenwart von 0.1% TFA bei 210 nm mit einem Gradienten B in A von 0 - 50% in 50 min, Retentionszeit: 40.2 min. Unten: Massenspektrum gemessen mittels ESI-MS, Peak: 20916.25 ± 0.84 Da.

Die Werte in Tabelle 4.4 sind die Resultate aus einem 2 l Ansatz. Für die restlichen 4 l wurden sehr ähnliche Werte erhalten. Die gemessene Masse des ESI-MS Spektrums ist kleiner als die theoretische Masse, da das eingesetzte Ammoniumchlorid nur einen ^{15}N -Mindestgehalt von 98% aufwies.

Zudem war ein kleiner Peak bei 20'980.38 Da zu finden, der höchstwahrscheinlich ein Addukt eines niedermolekularen Stoffes an das Protein NK1 darstellte. Die Sequenzierung nach Edman sowie die Retentionszeit auf dem RP-HPLC entsprachen vollumfänglich den Erwartungen. Die Ausbeute war höher als erwartet, denn im Vergleich zur Expression in YT [Douglas *et al.* (2002)], konnte sie im ^{15}N -Minimalmedium weiter gesteigert werden. Das mit ^{15}N markierte Protein NK1 wurde zur weiteren strukturellen Untersuchung und Strukturaufklärung mittels NMR an die Gruppe von Prof. M. Llinás in Pittsburgh gesandt.

Tabelle 4.4: Charakterisierung von NK1

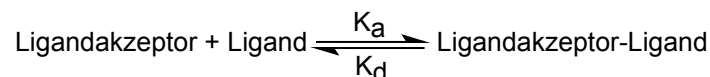
ESI-MS:	<i>gemessen</i>	<i>theoretisch</i>
	20916.25 ± 0.84 Da	20923.16 Da $\text{M}^{-17} - \text{E}^{163}$ (NK1)
	16949.75 ± 0.73 Da	16951.48 Da (Referenz Myoglobin)
Markierungsgrad mit ^{15}N :	97.3%	
N-terminale Sequenzierung:	MRGSH	
Gehaltsbestimmung:	67.2%	
RP-HPLC:	40.2 min (mit 0.1% TFA, Gradient B in A von 0 - 50% in 50 min)	
Ausbeute:	5.6 mg/l Kultur (Lyophilisat)	
	3.7 mg/l Kultur (reines NK1)	

4.2.2 Bestimmung der Bindungskonstanten

Nach obiger Anleitung, aber nach Kultivierung in LB Medium, wurde unmarkiertes Protein NK1 hergestellt. Dieses wurde ebenfalls nach obigem Schema charakterisiert, für gut befunden und für Bindungsstudien mittels Fluoreszenzmessung eingesetzt. Zum Vergleich wurden zwei weitere rekombinante Konstrukte verwendet, nämlich K1 und NTP, die allesamt aus Isolationen stammten, die von Mitarbeitern unserer Gruppe zu einem früheren Zeitpunkt ausgeführt worden waren. Die drei Plasminogenfragmente wurden mit steigenden Ligandkonzentrationen an 6-AHA inkubiert und davon die Fluoreszenz bestimmt.

Ausgehend vom freien Ligandakzeptor sollte durch die Titration ein Endwert entsprechend dem Ligandakzeptor-Ligand-Komplex erreicht werden, d.h. die Fluoreszenz beschreibt eine Sättigungskurve. Die Messwerte der Fluoreszenztitrationskurven wurden auf 1 normiert und bezüglich der jeweiligen Ligandkonzentrationen dargestellt (Figur 4.15). Dabei konnte bei beiden Messreihen mit K1 und NK1 eine Sättigungskurve beobachtet werden, während jene mit NTP nahezu einer Geraden entsprach. Demnach war mit K1 und NK1 im idealen Bereich gemessen worden, während im Falle des NTP die Sättigung sicherlich noch nicht erreicht war und damit auf eine sehr schwache Wechselwirkung mit dem Liganden hindeutete.

Zur Berechnung der Bindungskonstanten des Liganden 6-AHA mit den drei Plasminogenfragmenten wurden die drei Fluoreszenztitrationskurven nach Scatchard (1948) linearisiert (Figur 4.16). Die Scatchardgleichung basiert auf der allgemeinen Gleichung für reversible Bindungen:



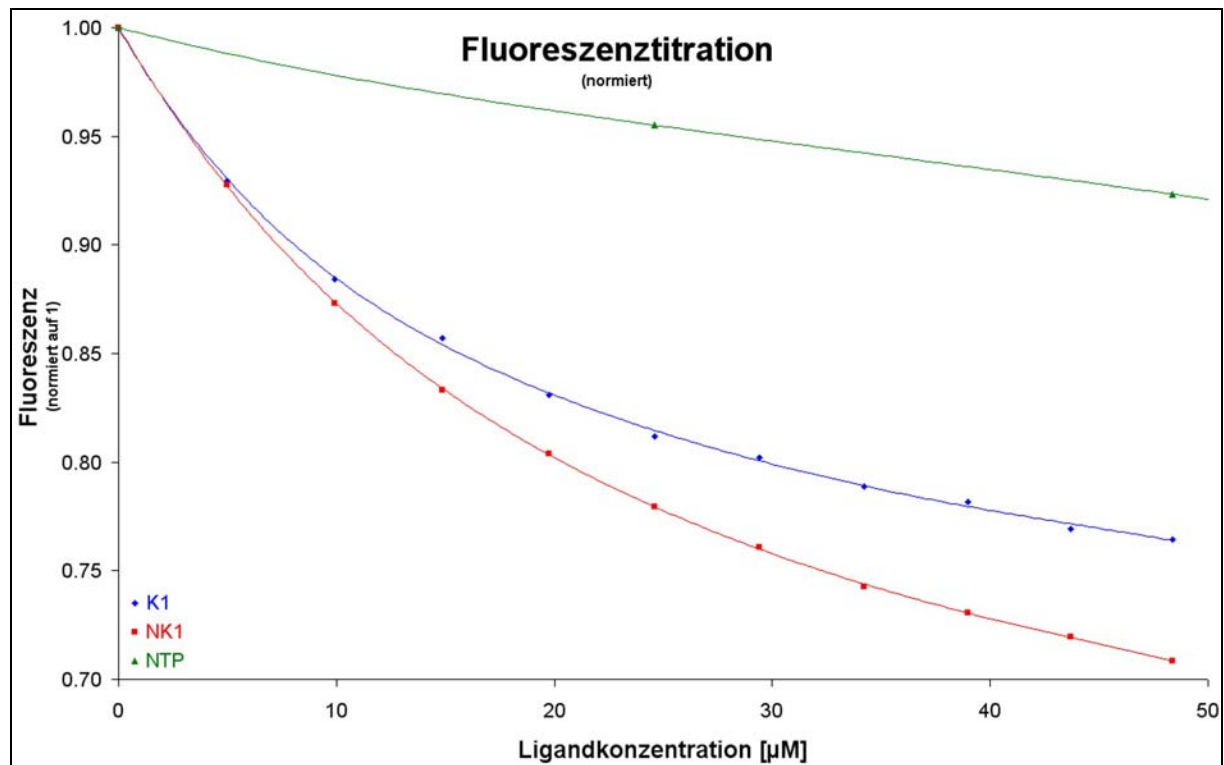
Wie weiter oben schon angedeutet entspricht die gesamte Fluoreszenz F der Summe $F_{\text{frei}} + F_{\text{gebunden}}$, wobei ersteres die Fluoreszenz des Ligandakzeptors beschreibt und letzteres die Fluoreszenz des Ligandakzeptor-Ligand-Komplexes darstellt:

$$F = F_{\text{frei}} \cdot [\text{Ligandakzeptor}] + F_{\text{gebunden}} \cdot [\text{Ligandakzeptor-Ligand}]$$

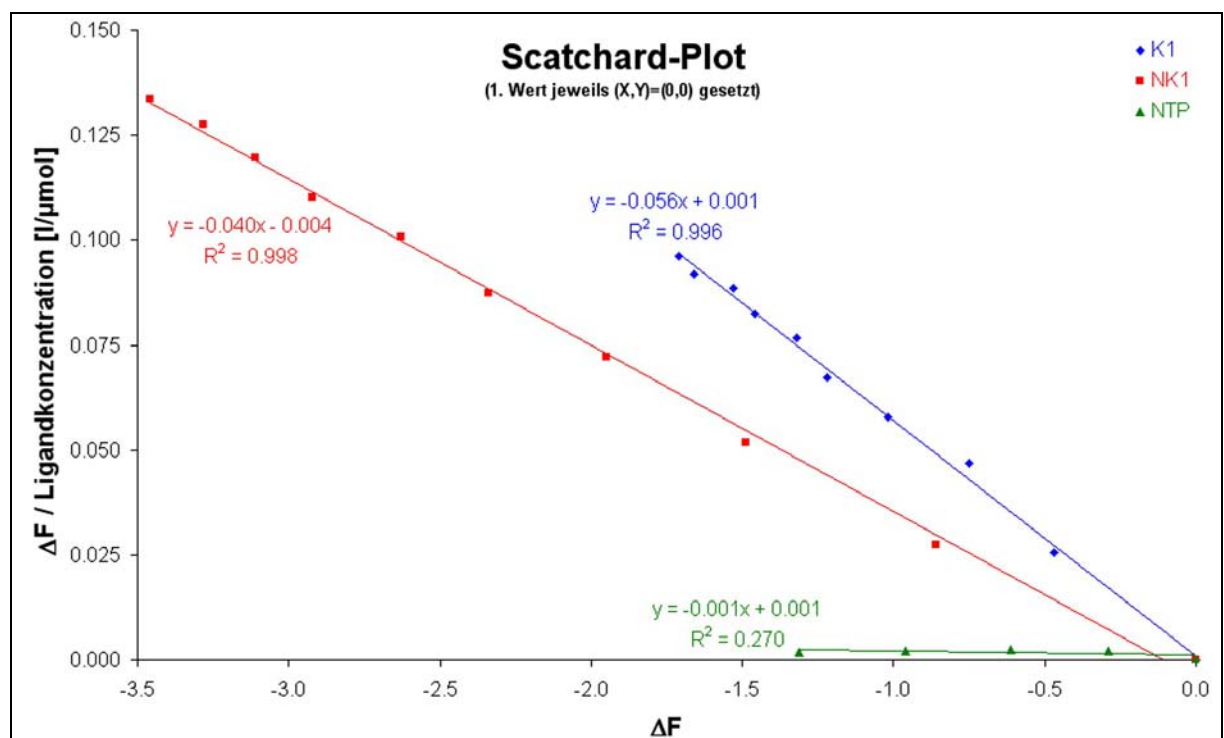
Aufgrund dieser Formel ist die Änderung der Fluoreszenz proportional zur Konzentration des Ligandakzeptor-Ligand-Komplexes und kann somit für die Auswertung benutzt werden. Weiter gilt:

$$[\text{Ligandakzeptor-Ligand}] / [\text{Ligand}] = k \cdot (n - [\text{Ligandakzeptor-Ligand}])$$

wobei k der Konstante der Bindungsreaktion entspricht und n die Anzahl Bindungsstellen des Ligandakzeptors beschreibt. Aus diesen Formeln folgt, dass eine Darstellung von $[\text{Ligandakzeptor-Ligand}] / [\text{Ligand}]$ gegen $[\text{Ligandakzeptor-Ligand}]$ eine Gerade ergibt, falls k konstant ist.



Figur 4.15: **Fluoreszenztitration von 6-AHA mit K1, NK1 und NTP.** Die gemessene Fluoreszenz wurde auf 1 normiert, damit die drei Kurven in einer Grafik dargestellt werden konnten. Blau: K1. Rot: NK1. Grün: NTP.



Figur 4.16: **Scatchard-Plot der Fluoreszenztitration von 6-AHA mit K1, NK1 und NTP.** Die linearisierten Kurven wurden durch den jeweiligen 0-Punkt der beiden Achsen gelegt, d.h. der erste Wert wurde (X,Y) = (0,0) gesetzt. Blau: K1, $y = -0.056x + 0.001$, $K_a = 0.056 \mu\text{M}^{-1}$, $R^2 = 0.996$. Rot: NK1, $y = -0.040x - 0.004$, $K_a = 0.040 \mu\text{M}^{-1}$, $R^2 = 0.998$. Grün: NTP, $y = -0.001x + 0.001$, $K_a = 0.001 \mu\text{M}^{-1}$, $R^2 = 0.270$.

Aus dem Bestimmtheitsmass R^2 der Trendlinien konnte abgeschätzt werden, dass es sich bei den Messungen mit K1 und NK1 um sehr genaue Resultate handeln musste, während jene mit NTP weniger vertrauenswürdig war. Aus der Steigung der Trendlinien konnte zudem der Wert der jeweiligen

Assoziationskonstante K_a herausgelesen werden, während für die Dissoziationskonstanten K_d der Kehrwert berechnet werden musste. Damit die Unterschiede in der Steigung besser zum Ausdruck kamen, wurden die drei Geraden durch den gemeinsamen 0-Punkt der beiden Achsen gelegt.

Die K_a -Werte von 6-AHA mit K1 und NK1 betrugen 56 beziehungsweise 40 mM^{-1} . Damit waren die beiden Werte der Bindungskonstanten durchaus miteinander vergleichbar und unterschieden sich nur unwesentlich. Der relativ ungenaue K_a -Wert von 6-AHA mit NTP betrug lediglich $\sim 1 \text{ mM}^{-1}$, womit keine Wechselwirkung des NTP mit dem niedermolekularen Liganden nachgewiesen werden konnte. Aus den Bindungskonstanten von 6-AHA mit NK1 und K1 wurde ersichtlich, dass das NTP falls überhaupt nur sehr schwach in die LBS des Kringels 1 bindet und demnach den K_a -Wert von NK1 im Vergleich mit jenem von K1 praktisch nicht zu beeinflussen vermag. Demnach kommt Kringel 1 als hauptsächlicher Wechselwirkungspartner in der α -Konformation von Plasminogen nicht in Frage, wie die Studien von Cockell *et al.* (1998) und Ponting *et al.* (1992) auch schon zeigten. Die Messwerte sowie die Resultate sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

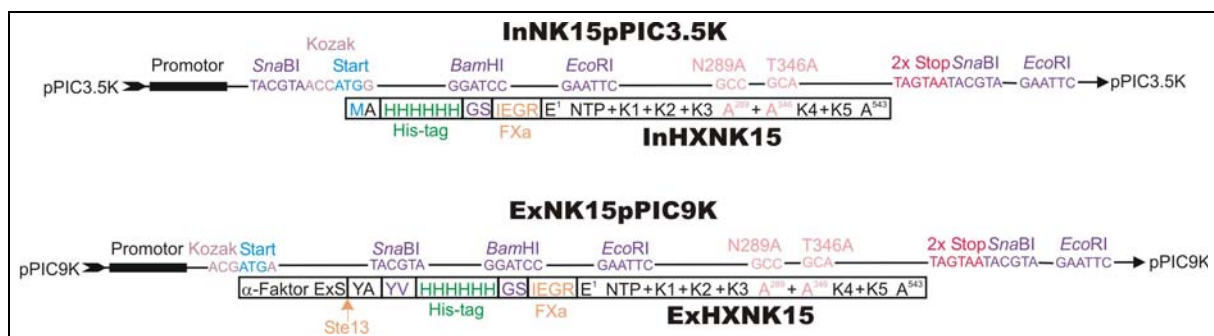
Tabelle 4.5: Resultate der Fluoreszenztitrationen

Ligand [μM]	Fluoreszenz K1		Fluoreszenz NK1		Fluoreszenz NTP	
	gemessen	normiert	gemessen	normiert	gemessen	normiert
0.00	10.36	1.000	15.77	1.000	9.13	1.000
4.98	9.63	0.930	14.63	0.928	-	-
9.93	9.16	0.884	13.77	0.873	-	-
14.85	8.88	0.857	13.14	0.833	-	-
19.74	8.61	0.831	12.68	0.804	-	-
24.59	8.41	0.812	12.29	0.779	8.72	0.955
29.41	8.31	0.802	12.00	0.761	-	-
34.20	8.17	0.789	11.71	0.743	-	-
38.96	8.10	0.782	11.52	0.731	-	-
43.69	7.97	0.769	11.35	0.720	-	-
48.39	7.92	0.764	11.17	0.708	8.43	0.923
71.43	-	-	-	-	8.11	0.888
93.75	-	-	-	-	7.76	0.850
115.39	-	-	-	-	7.41	0.812
	$K_a = 56 \text{ mM}^{-1}$ $K_d = 18 \text{ }\mu\text{M}$ $R^2 = 0.996$		$K_a = 40 \text{ mM}^{-1}$ $K_d = 25 \text{ }\mu\text{M}$ $R^2 = 0.998$		$K_a = \sim 1 \text{ mM}^{-1}$ $K_d = 1033 \text{ }\mu\text{M}$ $R^2 = 0.270$	

5 *P. pastoris*: Resultate

5.1 NK15 in pPIC3.5K und pPIC9K

Die Vektoren pPIC3.5K und pPIC9K [Scorer *et al.* (1994)] wurden schon mehrfach zur Expression von grösseren Mengen Protein in *P. pastoris* verwendet [He *et al.* (1999); Kawano *et al.* (2002); Nilsen *et al.* (1999)]. Zudem konnten einzelne Kringel von den Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA in Mengen von mehreren 10 mg aus Erlenmeyeransätzen isoliert werden, der Einsatz von Fermentern konnte die Ausbeute sogar in die Grössenordnung von 100 mg bis hin zu 1 g verbessern [Nilsen *et al.* (1997); Tsujikawa *et al.* (1996)]. Diese Resultate liessen hoffen, dass auch eine Überexpression der schweren Kette von humanem Plasminogen (hPg) in höheren Mengen und unfragmentiert gelingen könnte. Demnach wurden die hergestellten Konstrukte InNK15pPIC3.5K und ExNK15pPIC9K in *E. coli* transformiert und in genügend grossen Mengen produziert, dass sie in linearisierter Form in die beiden *P. pastoris* Stämme GS115 und KM71 transformiert werden konnten. Im Falle von InNK15pPIC3.5K sollte das rekombinante Protein intrazellulär akkumulieren, bei ExNK15pPIC9K sollte es jedoch ins Medium sekretiert werden, da zusätzlich eine N-terminale α -Faktor Exportsequenz vorhanden war, die posttranslational im ER / Golgi-Apparat durch zwei Enzyme Kex2 und Ste13 prozessiert werden sollte [Invitrogen (2002)]. Beide konstruierten Gene enthielten eine N-terminale Polyhistidinsequenz, einen sogenannten „His-tag“, und eine Faktor Xa Schnittstelle, wie dies auch für zwei der *E. coli* Konstrukte schon der Fall gewesen war. Anschliessend an die Erkennungssequenz des Faktors Xa folgte unmittelbar Glu¹ mit dem N-terminalen Peptid NTP des hPg bis hin zu Ala⁵⁴³ nach dem Ende des Kringels 5, entsprechend einer C-terminal leicht verkürzten schweren Kette von hPg. Es wurden zwei Mutationen eingeführt, nämlich Asn²⁸⁹ zu Ala²⁸⁹ und Thr³⁴⁶ zu Ala³⁴⁶, damit eine Glykosylierung während der Expression in den *P. pastoris* Stämmen ausgeschlossen werden konnte. Asn²⁸⁹ wurde mutiert, weil *P. pastoris* hier mit grosser Wahrscheinlichkeit gemäss dem „high-Mannose“ Typ N-glykosyliert [Grinna und Tschopp (1989); Miele *et al.* (1999)]. Obwohl die O-Glykosylierungen an Threonin und Serin von rekombinanten Proteinen bisher nur sehr selten auftraten [Invitrogen (2002); Bretthauer und Castellino (1999)], wurde trotzdem Thr³⁴⁶ mutiert, weil es im aus Blutplasma isolierten hPg in beiden Varianten 1 und 2 O-glykosyliert ist [Marti *et al.* (1988); Castellino und Powell (1981)]. Auf eine Mutation von Ser²⁴⁹ wurde allerdings verzichtet, da diese O-Glykosylierung in geringerem Ausmass auftritt und nur in Variante 2 des hPg vorkommt [Pirie-Shepherd *et al.* (1997)]. Für die Reinigung der überexprimierten Proteine standen zwei Arten von Affinitätschromatographie zur Verfügung, nämlich Bindung an eine Ni²⁺-haltige Matrix, beziehungsweise an Lysin-Bio-Gel. Wie in Figur 5.1 dargestellt, werden nachfolgend die Gene immer als InNK15pPIC3.5K und ExNK15pPIC9K, die daraus resultierenden Proteine als InHXNK15 und ExHXNK15 bezeichnet.



Figur 5.1: **DNA-Konstrukte und ihre Proteine.** InNK15pPIC3.5K: Gen von NTP bis K5 in pPIC3.5K mit N-terminalem „His-tag“ und Faktor Xa (FXa) Schnittstelle; das ATG-Startcodon ist in der eigens eingeführten Kozak-Konsensussequenz integriert. InHXNK15: Protein von NTP bis K5 mit N-terminalem „His-tag“ und Faktor Xa Schnittstelle, sowie den Mutationen N289A und T346A. ExNK15pPIC9K: Gen von NTP bis K5 in pPIC9K mit N-terminalem α -Faktor Exportsignal (ExS), „His-tag“ und Faktor Xa Schnittstelle; das ATG-Startcodon ist in der vorhandenen Kozak-Konsensussequenz des α -Faktor Exportsignals integriert. ExHXNK15: Protein von NTP bis K5 mit N-terminalem α -Faktor Exportsignal (prozessiert durch Kex2 und Ste13), „His-tag“ und Faktor Xa Schnittstelle, sowie den Mutationen N289A und T346A.

5.1.1 Molekularbiologie

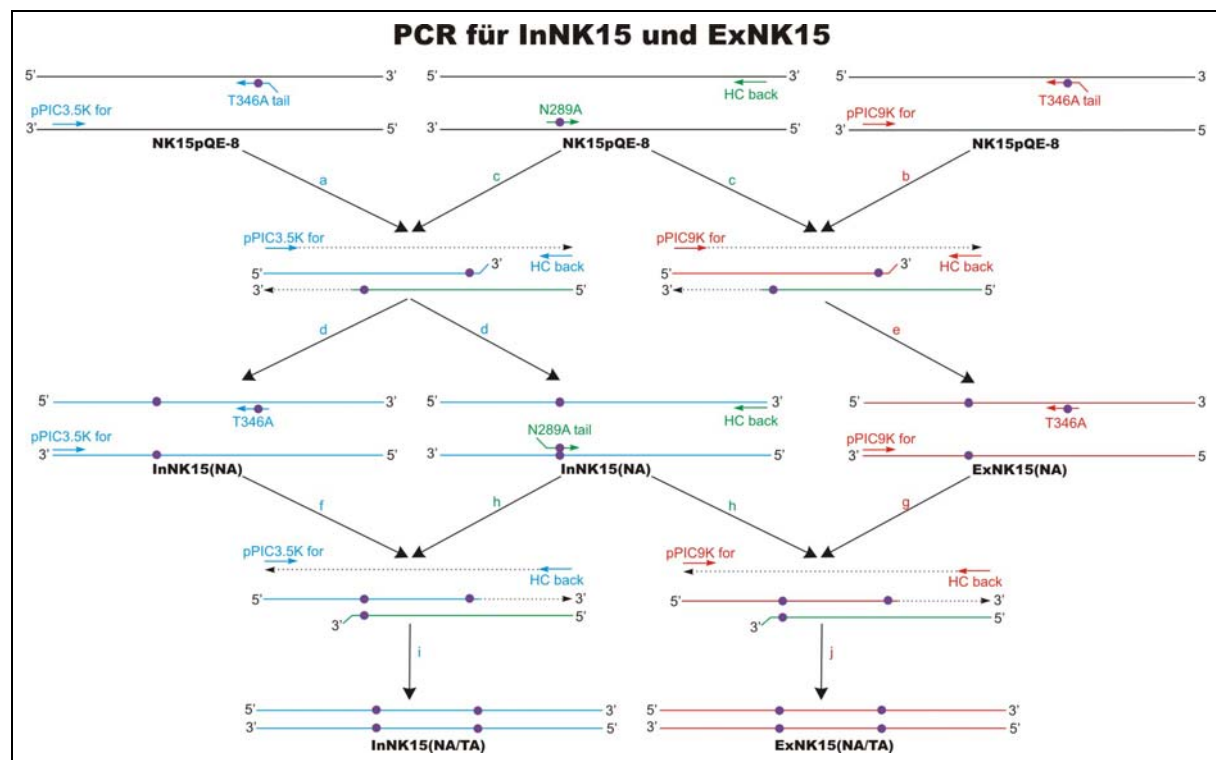
5.1.1.1 PCR

Das Plasmid NK15pQE-8, welches aus den unter Kapitel 4.1 beschriebenen Experimenten hervorging, wurde aus 100 ml über Nacht in LB gewachsenen *E. coli* XL1-Blue Zellen mittels HiSpeed™ Plasmid Midi Kit isoliert. Das in der „supercoiled“-Form vorliegende Plasmid wurde mit *Nde*I linearisiert, aus einem Kristallviolettagarosegel von 0.7% ohne Einsatz von UV-Licht ausgeschnitten und mittels MinElute™ Gel Extraction Kit gereinigt. Die Linearisierung diente der besseren Zugänglichkeit der DNA für die Primer, welche vor der PCR mittels ESI-MS auf die richtige Masse hin überprüft wurden (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Masse der Primer mittels ESI-MS ermittelt

Primer	Masse theoretisch	Masse gemessen
pPIC3.5K for	10918.2 Da	10917.00 ± 2.67 Da
pPIC9K for	10604.0 Da	10604.50 ± 1.35 Da
N289A	7219.8 Da	7221.13 ± 1.02 Da
N289A tail	9088.0 Da	9088.13 ± 1.46 Da
T346A	7144.6 Da	7145.13 ± 0.62 Da
T346A tail	8991.8 Da	8993.00 ± 1.17 Da
HC back	10780.0 Da	10779.75 ± 1.45 Da

Die verschiedenen Schritte der vierstufigen PCR sind in Figur 5.2 schematisch dargestellt.

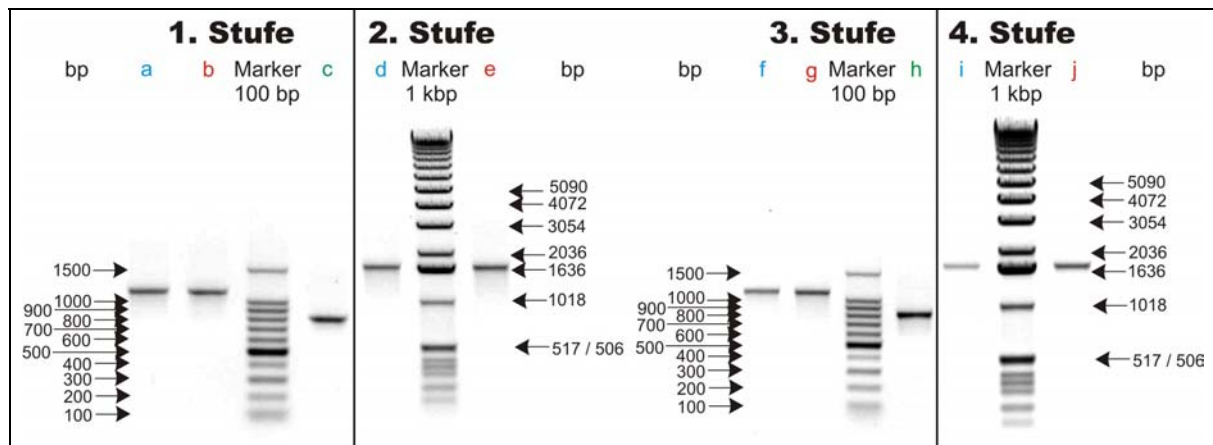


Figur 5.2: Schematische Darstellung der vierstufigen PCR zur Synthese von InNK15 und ExNK15. Als Templat wurde das Plasmid NK15pQE-8 verwendet. Daraus wurden in 4 Schritten die „Inserts“ InNK15 und ExNK15 für die Ligation in die Vektoren pPIC3.5K und pPIC9K konstruiert. Beide „Inserts“ trugen zwei Mutationen, entsprechend für die beiden hauptsächlichen Glykosylierungsstellen N289A und T346A.

Im ersten Schritt wurden drei PCR angesetzt, die jeweils zwei sich überlappende Fragmente generierten. Im zweiten Schritt wurden die Amplifikate **a** und **c** sowie **b** und **d** zusammengegeben. Da jeweils einer der beiden Stränge sich am 3'-Ende nicht mit den gegenüberliegenden Basen paaren konnte, wurde nur jeweils ein Strang komplettiert. Diese konnten mit den beiden äusseren Primern zu den

Produkten **d** und **e** amplifiziert werden, die beide die Mutation N289A, entsprechend der Basensubstitution AAC → GCC, trugen. Im dritten Schritt wurde von diesen beiden Amplifikaten ausgegangen, die bereits eine der beiden gewünschten Mutationen enthielten. Sie wurden wiederum als Template für drei PCR verwendet. Auch in diesem Fall überlappten sich jeweils zwei Fragmente, nämlich die Produkte **f** und **h** sowie **g** und **h**. Diese Paare wurden im vierten Schritt zusammengegeben, wobei wiederum jeweils nur einer der beiden Stränge komplettiert werden konnte und mit Hilfe der beiden äusseren Primer zu den gewünschten „Inserts“ InNK15 (**i**) und ExNK15 (**j**) führte. Beide trugen nun nebst der N289A Substitution zusätzlich noch die Mutation T346A, entsprechend der Basensubstitution ACA → GCA.

Alle PCR wurden mit *Pfu* Polymerase während 30 Zyklen und einer Hybridisierungstemperatur von 60°C vollzogen. Die Amplifikate aus jeder PCR (Figur 5.3) wurden jeweils aus Kristallviolettagarosegelen von 0.7% ohne Einsatz von UV-Licht ausgeschnitten und mittels MinElute™ Gel Extraction Kit gereinigt, bevor sie für die nächste Reaktion weiterverwendet wurden.



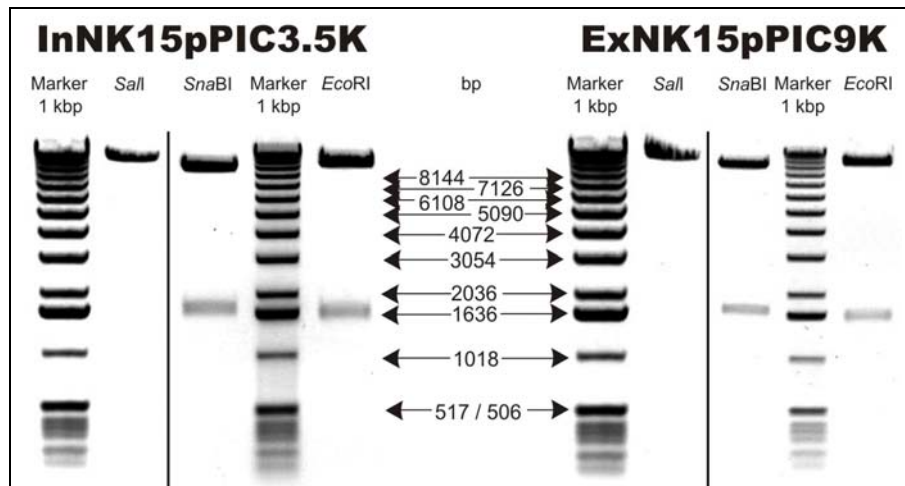
Figur 5.3: **PCR-Amplifikate**. Marker 1kbp: 1 kbp DNA Grössenstandard. Marker 100 bp: 100 bp Grössenstandard. **a**: Primer pPIC3.5K for / T346A tail, 1108 bp. **b**: Primer pPIC9K for / T346A tail, 1099 bp. **c**: Primer N289A / HC back, 792 bp. **d**: Primer pPIC3.5K for / HC back, 1698 bp. **e**: Primer pPIC9K for / HC back, 1689 bp. **f**: Primer pPIC3.5K for / T346A, 1102 bp. **g**: Primer pPIC9K for / T346A, 1093 bp. **h**: Primer N289A tail / HC back, 798 bp. **i**: Primer pPIC3.5K for / HC back, 1698 bp. **j**: Primer pPIC9K for / HC back, 1689 bp.

5.1.1.2 Ligation und Transformation in *E. coli*

Aus 100 ml über Nacht in LB gewachsenen *E. coli* TOP10F' Zellen wurden mittels HiSpeed™ Plasmid Midi Kit die Vektoren pPIC3.5K und pPIC9K isoliert. Beide Plasmide, sowie die beiden PCR-Amplifikate InNK15 und ExNK15, wurden mit *Sna*BI linearisiert beziehungsweise die Enden wegverdaut und das Restriktionsenzym anschliessend während 20 Minuten bei 80°C hitzeinaktiviert. Die linearisierten Vektoren wurden mit SAP dephosphoryliert und die verdauten „Inserts“ mit T4 PNK phosphoryliert. Letzteres wurde für den Fall durchgeführt, dass die Erkennungssequenz für *Sna*BI zu nahe am Ende der linearen DNA lokalisiert wäre und demnach keine Verdauung stattfinden könnte. Nach der Hitzeinaktivierung der SAP respektive T4 PNK wurden die PCR-Amplifikate mit dem entsprechenden Plasmid in einen Ligationsansatz gegeben und zur Reaktion stehen gelassen. Das molare Verhältnis Vektor zu „Insert“ betrug im Falle von pPIC3.5K / InNK15 etwa 1:10, bei pPIC9K / ExNK15 etwa 1:2. Gekaufte chemisch-kompetente *E. coli* TOP10F' Zellen wurden mit den Ligationsansätzen transformiert und über Nacht auf LB-Agar Platten wachsen gelassen. Die Transformationen führten in jedem Fall zu Kolonien, deren Plasmide das gewünschte „Insert“ eingebaut hatten. Je eine positive Kolonie wurde zur Langzeitlagerung vorbereitet, sowie je eine 100 ml Übernachtskultur angesetzt. Die mittels HiSpeed™ Plasmid Midi Kit isolierten Plasmide InNK15pPIC3.5K und ExNK15pPIC9K wurden mit drei Restriktionsansätzen auf ihre Richtigkeit überprüft (Figur 5.4).

Mit *Sal*I wurden die Plasmide linearisiert, mit *Sna*BI konnten die „Inserts“ nachgewiesen werden und mit *Eco*RI konnte die Richtung der „Inserts“ bestätigt sowie Mehrfachinsertionen ausgeschlossen werden. Beide Plasmide wurden mit Standardprimern, auf die Promotorregionen passend, sequenziert. Im Fall von ExNK15pPIC9K konnte damit die fehlerfreie Sequenz des „Inserts“ bestätigt werden, jedoch fehlte die Mutation T346A im „Insert“ des Plasmids InNK15pPIC3.5K. Da sich beide Vektoren nur am 5'-terminalen Teil des „Inserts“ unterschieden, wurde das 3'-terminale *Eco*RI-Fragment aus

dem Plasmid ExNK15pPIC9K mit dem *EcoRI*-Vektorfragment von InNK15pPIC3.5K ligiert und erneut in *E. coli* TOP10F' Zellen transformiert. Eine erneute Restriktionsanalyse, sowie die Sequenzierung des „Inserts“ von InNK15pPIC3.5K lieferten eine korrekte Fragmentierung respektive fehlerfreie Basenabfolge, d.h. diesmal waren beide Mutationen enthalten, wie schon im Plasmid ExNK15pPIC9K nachgewiesen. Allerdings war aus den Daten der Sequenzierung beider Vektoren eindeutig zu entnehmen, dass bei beiden „Inserts“ an beiden Enden jeweils 6 Basen insertiert waren, die von einer Ligation mit unverdaulichem, jedoch 5'-phosphoryliertem PCR-Amplifikat zeugten. Für die intrazelluläre Expression hatte dies keinerlei Auswirkungen auf die Länge des rekombinanten Proteins, da die Insertionen vor der Kozak-Konsensussequenz oder nach dem Stoppsignal zu liegen kamen. Für die sekretierte Expression hatte dies am 3'-Ende nach dem Stoppsignal ebenfalls keine Auswirkungen, jedoch führte die Insertion am N-Terminus zu zwei eingeschobenen Basen, Tyr und Ala, zwischen dem Ende der α -Faktor Exportsequenz und dem eingefügten Konstrukt.



Figur 5.4: **Restriktion von InNK15pPIC3.5K und ExNK15pPIC9K.** Marker 1 kbp: 1 kbp Grössenstandard. InNK15pPIC3.5K: *SalI*: 10702 bp, *SnaBI*: 9016 / 1686 bp, *EcoRI*: 9169 / 1533 bp. ExNK15pPIC9K: *SalI*: 10965 bp, *SnaBI*: 9288 / 1677 bp, *EcoRI*: 9432 / 1533 bp.

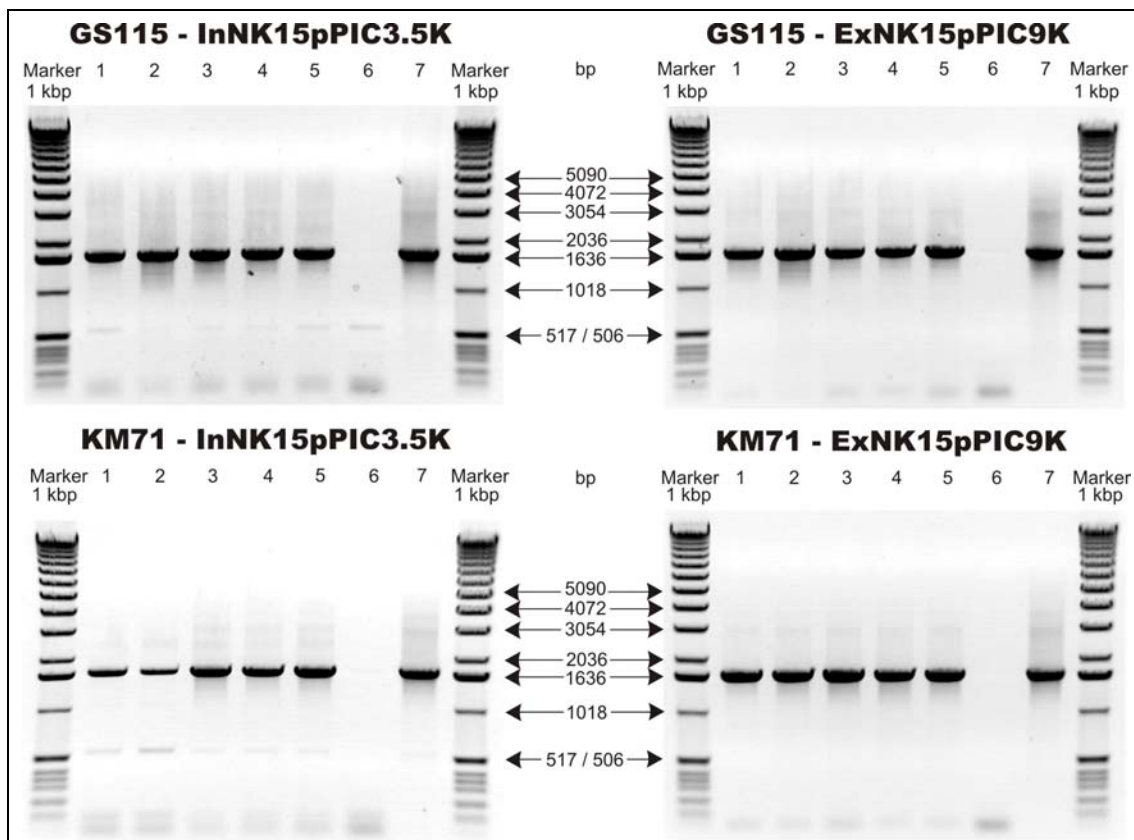
5.1.1.3 Transformation und Selektion in *P. pastoris*

Für die Transformation wurden 11 μ g Plasmid mit *SalI* linearisiert, aus Kristallviolettagarosegelen von 0.7% ohne Einsatz von UV-Licht ausgeschnitten und mittels MinElute™ Gel Extraction Kit / QIAprep® Spin Miniprep Kit gemäss Kapitel 3.1.2.2 gereinigt. Die Ausbeute lag jeweils zwischen 6 und 9 μ g linearisierter Plasmid-DNA. Durch die Linearisierung mit *SalI* im *HIS4*-Gen des Plasmids war eine Rekombination am *his4*-Locus im Genom der mutierten, nicht-funktionellen Histidinoldehydrogenase der *P. pastoris* Zellen am wahrscheinlichsten. Die *P. pastoris* Stämme GS115 und KM71 wurden zuerst auf YPD-Platten angezogen und gut gewachsene Kolonien in YPD-Medium überimpft. Von beiden Zellvarianten wurden mit der Hälfte der Zellen spektrophotometrisch Zeitkurven aufgenommen, um die Bedingungen zur optimalen Spheroplastenausbeute zu bestimmen. Die optimale Menge von 70% lag je nach Zellen und Zymolyaseröhrchen zwischen 4 und 10 Minuten. Anschliessend wurde mit der zweiten Hälfte über die vorher ermittelte Zeit das eigentliche „Spheroplasting“ durchgeführt. Für die Transformation wurden jeweils 100 μ l Spheroplastensuspension mit linearisiertem InNK15pPIC3.5K, ExNK15pPIC9K, pPIC3.5K oder pPIC9K versetzt und inkubiert, als Negativprobe wurde zudem auch ein Ansatz ohne Zugabe von DNA mitgeführt. Schliesslich wurden die transformierten Spheroplasten in Top-Agar auf Histidin-defiziente Platten gegossen und inkubiert, worin die Zellen ihre Zellwände wieder aufbauen konnten.

Die Inkubation in Histidin-freiem Agar diente als erster Selektionsschritt. Nur solche Spheroplasten konnten sich regenerieren und Kolonien bilden, die das linearisierte Plasmid mindestens einmal in das Genom rekombiniert hatten und zwar im *his4*-Locus. Eine Rekombination war zwingend, da die Vektoren nur für *E. coli* einen Replikationsursprung besaßen, jedoch keinen für *P. pastoris*. Nach 3 bis 4 Tagen konnten auf allen Platten gegen die 1000 Kolonien transformierte Zellen geerntet werden. Auf der Platte mit der Negativkontrolle, in welcher keine DNA in die Zellen transformiert wurde, konnte keine einzige Kolonie entdeckt werden. Als Positivkontrolle diente zudem das Wachstum der Plasmid-tragenden Zellen auf Histidin-supplementierten Platten, auf welchen nicht einzelne Kolonien, sondern ein ganzer Zellrasen im Top-Agar wuchs.

Um herauszufinden wieviele Kopien des „Inserts“ von den einzelnen Zellen in das Genom rekombiniert worden waren, wurden die aus dem Top-Agar gelösten Kolonien auf YPD-G418-Platten ausgestrichen, welche steigende Konzentrationen an Geneticin enthielten. Aufgrund der zunehmenden Resistenz gegenüber Geneticin konnten hyperresistente Kolonien gefunden werden, die mehrere Kopien des G418-Gens und somit auch des rekombinanten Gens beherbergten. Nach 2 bis 3 Tagen konnten auf allen Platten 100 bis gegen 1000 Kolonien beobachtet werden, wobei die Koloniedichte eindeutig mit der Zunahme der Geneticinkonzentration abnahm. Auf Platten mit 4 mg Geneticin / ml YPD konnten noch gegen die 100 Kolonien gefunden werden, was gemäss Invitrogen (2002) 7 bis 12 Kopien des Gens entspricht. Um sicher zu sein, dass es sich tatsächlich um hyperresistente Zellen handelte, wurden je 10 - 25 vielversprechende Kolonien auf neue YPD-G418-Platten ausgestrichen. Damit wurde definitiv ausgeschlossen, dass die gewachsenen Kolonien sich noch von Top-Agar-Stückchen ernährten. Die meisten Zellen bildeten auch nach diesem Schritt nach 2 Tagen schöne Kolonien. Als dritte Selektionsstufe wurde durch Ausstreichen der hyperresistenten Kolonien auf MM- und MD-Platten der Mut-Phänotyp bestimmt. Nach 2 Tagen konnte im Falle der transformierten GS115 Zellen kaum ein Unterschied im Wachstum auf beiden Plattensorten festgestellt werden, während die KM71 Zellen merklich kleinere Kolonien auf MM-Platten gebildet hatten, die nur Methanol als Kohlenstoffquelle enthielten, als in der gleichen Zeit auf MD-Platten, die Dextrose als Kohlenstoffquelle anzubieten hatten. Demnach waren alle GS115 Zellen Mut⁺ und alle KM71 Zellen Mut^S, d.h. in keiner der GS115 Zellen war der AOX1-Promotor durch Rekombination mit dem Plasmid verändert worden, was eine Änderung zum Mut^S-Typ zur Folge gehabt hätte. Das Wachstum auf den Platten entsprach zudem etwa den beiden Referenzen, d.h. GS115 β -Galactosidase für den Mut⁺-Phänotyp und GS115 Albumin für den Mut^S-Phänotyp.

Um sicher zu sein, dass die selektionierten Kolonien nebst dem Wildtyp-Histidinoldehydrogenasegen und dem G418-Resistenzgen auch tatsächlich das rekombinierte Gen mit der schweren Kette von hPg enthielten, wurde von mehreren Stämmen die genomische DNA isoliert und mittels PCR das Gen nachgewiesen (Figur 5.5). Hierzu wurde eine PCR mit den Primern pPIC3.5K for / HC back beziehungsweise pPIC9K for / HC back angesetzt und unter den selben Bedingungen, wie in Kapitel 3.1.2.3.1 unter „Ansatz 4“ beschrieben, das Gen amplifiziert.



Figur 5.5: PCR zum Nachweis vom „Insert“ in der genomischen DNA der vier verschiedenen Zell-Plasmid-Varianten. Marker 1 kbp: 1 kbp Grössenstandard. Bahnen 1 - 5: Entsprechen jeweils dem PCR-Produkt InNK15 (1698 bp) oder ExNK15 (1689 bp) im Genom verschiedener Klone. Bahn 6: Entspricht jeweils dem pPIC3.5K- oder pPIC9K-transformierten GS115 oder KM71 Stamm ohne „Insert“. Bahn 7: Entspricht dem jeweiligen Referenzvektor InNK15pPIC3.5K (1698 bp) oder ExNK15pPIC9K (1689 bp).

Vollständig charakterisiert, d.h. inklusive Nachweis des rekombinanten Gens mittels PCR, waren somit je fünf Stämme der vier Zell-Plasmid-Varianten (Tabelle 5.2). Je vier Stämme beherbergten mehrere Kopien des Gens für die schwere Kette von hPg, so dass auch eine Überexpression erwartet werden konnte. Zum Vergleich wurde auch ein Stamm selektioniert, der nur etwa eine bis zwei Kopien des Gens ins Genom rekombiniert hatte und keine Hyperresistenz gegenüber Geneticin offenbarte. Als Hintergrundreferenz dienten die beiden Stämme GS115 und KM71, welche mit den Vektoren ohne „Inserts“ komplementiert worden waren, bei denen zudem auch G418-Hyperresistenz beobachtet werden konnte. Somit konnte die Proteinexpression der transformierten *P. pastoris* Stämme im Vergleich mit der jeweiligen Hintergrundreferenz, der Überexpressionsreferenz und der Expressionsreferenz (GS115 Albumin oder GS115 β -Galactosidase), die zeigen sollte, ob die Expressionsbedingungen korrekt waren, in Angriff genommen werden.

Tabelle 5.2: Charakterisierung der rekombinanten *P. pastoris* Stämme mit NK15

GS115 - InNK15pPIC3.5K:	5 Stämme, Mut ⁺ , intrazelluläre Expression, 4x hyperresistent (mehrere Kopien), 1x ~1 Kopie (Referenz Überexpression)
GS115 - ExNK15pPIC9K:	5 Stämme, Mut ⁺ , sekretierte Expression, 4x hyperresistent (mehrere Kopien), 1x ~1 Kopie (Referenz Überexpression)
KM71 - InNK15pPIC3.5K:	5 Stämme, Mut ^S , intrazelluläre Expression 4x hyperresistent (mehrere Kopien), 1x ~1 Kopie (Referenz Überexpression)
KM71 - ExNK15pPIC9K:	5 Stämme, Mut ^S , sekretierte Expression 4x hyperresistent (mehrere Kopien), 1x ~1 Kopie (Referenz Überexpression)
GS115 - pPIC3.5K:	1 Stamm, Mut ⁺ , hyperresistent, kein „Insert“ (Hintergrundreferenz)
GS115 - pPIC9K:	1 Stamm, Mut ⁺ , hyperresistent, kein „Insert“ (Hintergrundreferenz)
KM71 - pPIC3.5K:	1 Stamm, Mut ^S , hyperresistent, kein „Insert“ (Hintergrundreferenz)
KM71 - pPIC9K:	1 Stamm, Mut ^S , hyperresistent, kein „Insert“ (Hintergrundreferenz)

5.1.2 Proteinchemie

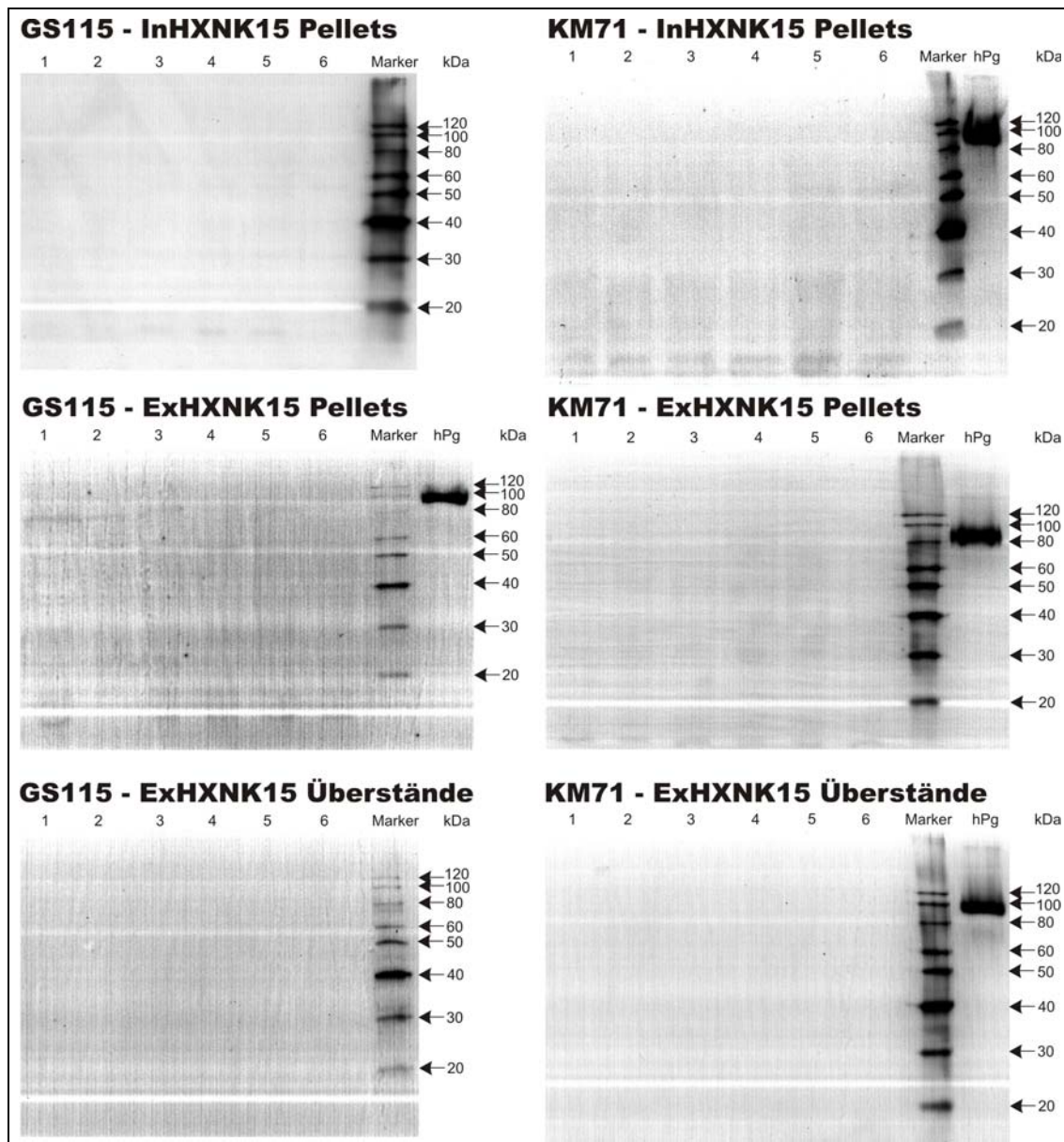
5.1.2.1 Expression im Kleinansatz

Alle charakterisierten Stämme, d.h. vier jeder Zell-Plasmid-Variante, aus Tabelle 5.2 wurden entsprechend ihrem Mut-Phänotyp wie in Kapitel 3.1.2.9 beschrieben auf YPD-Platten, dann in Glycerinhaltigem BMGY-Medium angezogen und schliesslich in Methanol-haltigem BMMY-Medium induziert, sowie täglich mit 0.5% Methanol supplementiert. Da die Mut⁺-Stämme in Methanol-haltigem Medium schneller wuchsen als die Mut^S-Stämme, wurden die 1 ml Proben zur Analyse der Überexpression jeweils alle 12 statt alle 24 Stunden entnommen.

Da die Analyse der Zeitreihen mittels SDS-PAGE in keinem Fall eine Überexpression erkennen liess, wurde versucht auf immunologischem Weg einen Nachweis zu erhalten. Dazu wurden von den intrazellulär exprimierenden Stämmen jeweils das Pellet aufgeschlossen und mittels SDS-PAGE und „Immunoblotting“ versucht eine Überexpression der schweren Kette von Plasminogen nachzuweisen (siehe Kapitel 3.2.2.1.1). Von den sekretierenden Stämmen wurden die Überstände auf ein SDS-PAGE geladen, auf PVDF-Membran gebロットet und immunologisch detektiert (siehe Kapitel 3.2.2.1.2). Zudem wurden auch die Pellets aufgeschlossen und analysiert, für den Fall dass die überexprimierten Proteine trotz Exportsignal nicht sekretiert würden, sondern im Exportprozess irgendwo „steckenblieben“ oder gar nicht erst die Exportmaschinerie durchliefen. Somit wurden die Pellets aller Stämme und zudem die Überstände der sekretierenden Stämme mittels SDS-PAGE aufgetrennt und jeweils von der letzten Probe, d.h. von jener die nach 96 (GS115 Stämme) beziehungsweise 144 Stunden (KM71 Stämme) geerntet worden war, eine Analyse mittels „Immunoblot“ durchgeführt (Figur 5.6). Als Referenzen wurden je eine Überexpressionsreferenz, eine Hintergrundreferenz und eine Expressionsreferenz genau gleich angezogen, induziert und analysiert. Die Überexpressionsreferenz war jeweils ein Stamm, der nur etwa eine Kopie des rekombinanten Gens enthielt. Dieser Indikator sollte bei einer allfälligen Expression aufzeigen, ob bei den Stämmen mit multiplen Genen auch tatsächlich mehr Protein produziert würde, was nicht immer der Fall sein musste [Invitrogen (2002)]. Die Hintergrundreferenz, jeweils nur den Vektor ohne „Insert“ enthaltend, diente als Indikator, ob es sich bei den vermuteten Banden tatsächlich um überexprimiertes Protein handelte. Die jeweilige Expressionsreferenz

sollte schliesslich zeigen, ob die Medien und Expressionsbedingungen gut gewählt waren und zu einer Überexpression von Protein führen konnten.

In keiner einzigen der geladenen Proben konnte eine Überexpression immunologisch nachgewiesen werden. Zwar waren teilweise einige sehr schwache Banden zu sehen, die aber weder auf der richtigen Höhe von 60 bis 70 kDa beobachtet werden konnten, noch waren sie abwesend in der Hintergrundreferenz. Nun stellte sich die Frage, ob die Expressionsbedingungen gut genug gewählt waren, um überhaupt eine Überexpression von Protein zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurden jeweils auch noch die Expressionsreferenzen GS115 β -Galactosidase und GS115 Albumin mittels SDS-PAGE analysiert (Figur 5.7). Falls dort eine Überexpression im Coomassie-gefärbten Gel sichtbar war, konnte von genügend guten Expressionsbedingungen ausgegangen werden, so dass das Problem anderer Natur sein musste.

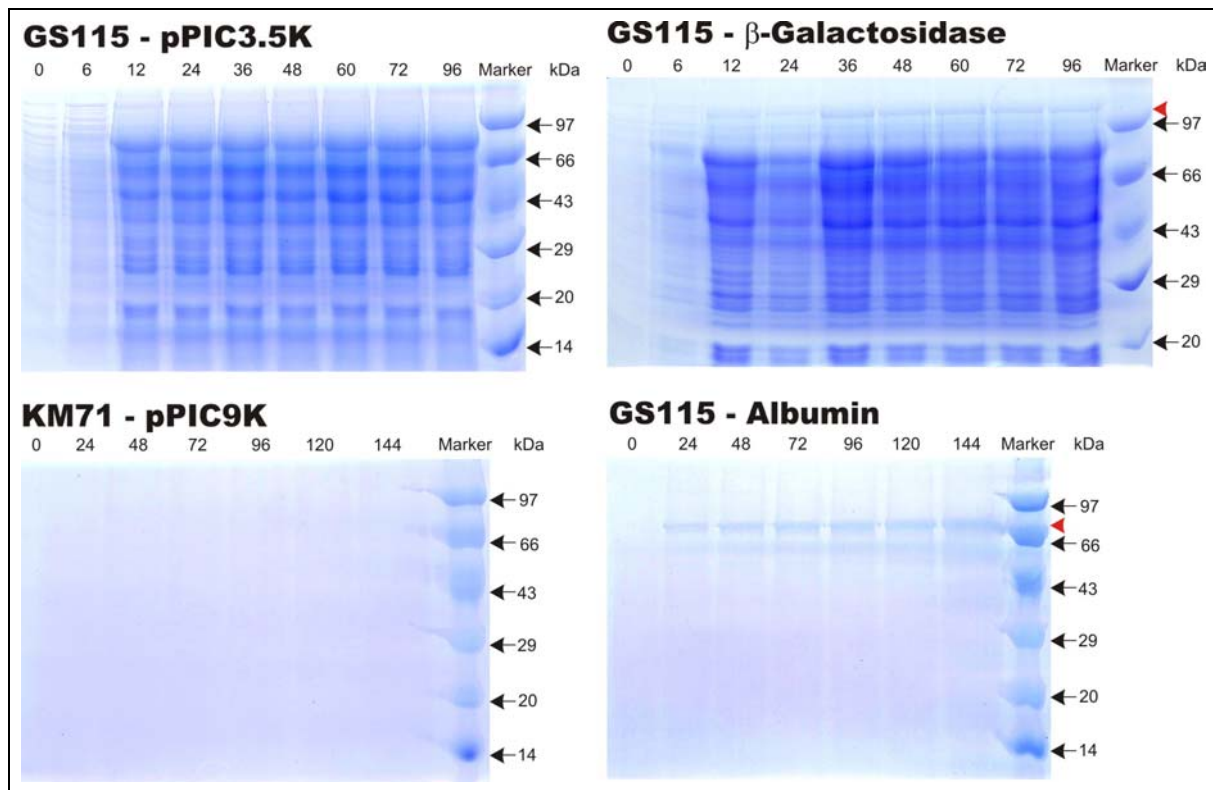


Figur 5.6: „Immunoblots“ aller Stämme zur Detektion von HXNK15. GS115: Proben nach 96 Stunden Expression. KM71: Proben nach 144 Stunden Expression. Bahnen 1 - 4: Entsprechen jeweils den vier Stämmen mit mehreren Kopien des rekombinanten Gens. Bahn 5: Überexpressionsreferenz mit nur einer Kopie des rekombinanten Gens. Bahn 6: Hintergrundreferenz mit dem rekombinierten Vektor ohne „Insert“. Marker: MagicMark™ Grössenstandard. hPg: Humanes Plasminogen aus Blutplasma isoliert als Positivkontrolle für den Antikörper.

Aufgrund der positiven Resultate der Expressionskontrollen war somit eindeutig klar, dass die Ursache der fehlenden Überexpression der schweren Kette von Plasminogen nicht in den verwendeten Lösungen, Medien oder Expressionsbedingungen zu suchen war. Im Falle der sekretierten Ansätze

wurde zudem der Überstand auf das fünf- bis zehnfache aufkonzentriert, wobei aber immer noch keine eindeutigen Banden nachzuweisen waren.

Mit den Pellets oder Überständen einiger Ansätze, die nach Ende der Expression geerntet worden waren, wurde versucht eventuell vorhandenes Protein an eine Lysin-Bio-Gel-Säule zu binden (siehe Kapitel 3.2.2.2), jedoch ohne Erfolg. Auch die Isolation von Protein mittels Ni-NTA Spin Kit von Qiagen, sowohl unter nativen (Natriumphosphatpuffer) als auch denaturierenden (Gu-HCl-Puffer) Bedingungen, schlugen fehl. Demnach musste angenommen werden, dass irgend ein Problem in der Expression des NK15-Konstrukts vorlag, vermutlich auf der Transkriptions- / Translationsebene. Um dies herauszufinden, wären zeitaufwendige Versuche wie „Northernblotting“ und strukturelle Untersuchungen über die Zugänglichkeit der mRNA nötig gewesen, die ausserhalb des zeitlichen Rahmens gewesen wären und dennoch kaum zum eigentlich gesetzten Ziel geführt hätten.



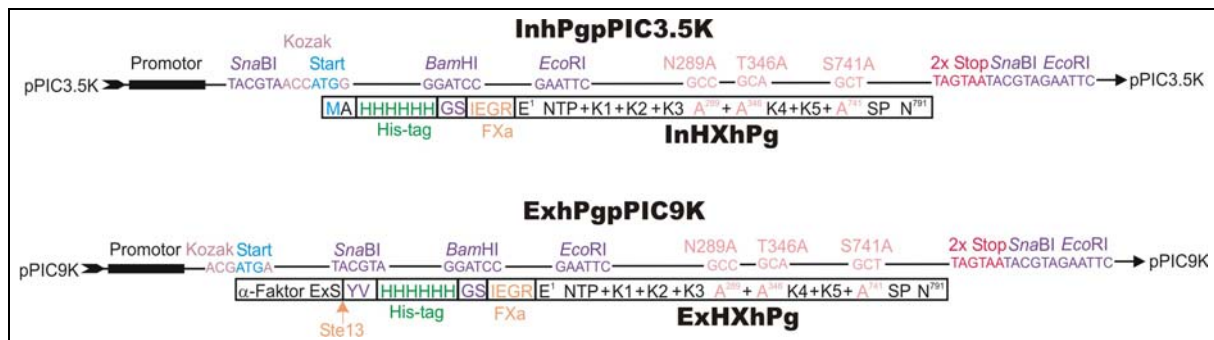
Figur 5.7: **Expressionskontrollen.** GS115 - β -Galactosidase: Überexpression intrazellulär (Mut^+ -Phänotyp) bei ca. 120 kDa (theoretisch 117 kDa) mit rotem Pfeil markiert. GS115 - Albumin: Überexpression sekretiert (Mut^S -Phänotyp) bei ca. 70 kDa (theoretisch 67 kDa) mit rotem Pfeil markiert. Zahlen der Bahnen: x Stunden nach Start der Induktion. Marker: SDS-PAGE Grössenstandard.

Aufgrund der obigen Resultate und deren Bewertung wurden die Versuche mit NK15 abgebrochen und stattdessen versucht das ganze hPg in *P. pastoris* zu klonieren, was im Gegensatz zu NK15 einem in der Natur vorkommenden Protein entsprach. Dieses wurde nämlich schon in mehreren höheren eukaryontischen Expressionssystemen erfolgreich exprimiert [Nilsen und Castellino (1999); Azuma *et al.* (1997); Whitefleet-Smith *et al.* (1989)]. Wenn dies auch für das niedere eukaryontische Expressionssystem *P. pastoris* zutreffen würde, könnte man auf einfache und billige Art und Weise zu markiertem und unglykosyliertem Material Zugang haben, welches problemlos für Kristallisationsexperimente für Röntgenstrukturanalysen, sowie strukturelle Untersuchungen mittels NMR verwendet werden könnte.

5.2 hPg in pPIC3.5K und pPIC9K

Für die Herstellung des rekombinanten hPg wurden die bereits hergestellten Konstrukte InNK15pPIC3.5K und ExNK15pPIC9K für die schwere Kette mit modifiziertem N-Terminus verwendet, für die leichte Kette wurde das Plasmid pPLGKG mit der cDNA von hPg als Vorlage benutzt. Die hPg-

Konstrukte wurden in die entsprechenden Vektoren kloniert, in *E. coli* transformiert und schliesslich in *P. pastoris* rekombiniert. Dabei sollte InhPgpPIC3.5K das rekombinante Protein intrazellulär akkumulieren, während ExhPgpPIC9K zur Sekretion des Proteins führen sollte. Da die NK15-Konstrukte als N-terminale Vorlage benutzt wurden, enthielten die beiden konstruierten Gene wiederum einen „His-tag“ und eine Faktor Xa Schnittstelle. Beide Konstrukte begannen unmittelbar nach der Erkennungssequenz für Faktor Xa mit Glu¹ und erstreckten sich über die ganze Länge von hPg bis zu Asn⁷⁹¹. Dabei waren die Mutationen Asn²⁸⁹ zu Ala²⁸⁹ und Thr³⁴⁶ zu Ala³⁴⁶ schon in der Vorlage vorhanden. Eine Mutation in der katalytischen Triade mit Ser⁷⁴¹ zu Ala⁷⁴¹ wurde zusätzlich noch eingeführt, womit das Reaktionszentrum nicht mehr funktionsfähig sein sollte und damit bei der Expression und Isolation kein autoproteolytischer Abbau des rekombinanten hPg befürchtet werden musste. Demnach waren die beiden die Glykosylierung betreffenden Mutationen schon in der Templat-DNA vorhanden, während die Mutation der katalytischen Triade mittels PCR noch eingeführt werden musste. Wie in Figur 5.8 dargestellt, werden nachfolgend die Gene immer als InhPgpPIC3.5K und ExhPgpPIC9K, die daraus resultierenden Proteine als InHXhPg und ExHXhPg bezeichnet.



Figur 5.8: **DNA-Konstrukte und ihre Proteine.** InhPgpPIC3.5K: Gen des humanen Plasminogens in pPIC3.5K mit N-terminalem „His-tag“ und Faktor Xa (FXa) Schnittstelle; das ATG-Startcodon ist in der Kozak-Konsensussequenz integriert. InHXhPg: Humanes Plasminogen mit N-terminalem „His-tag“ und Faktor Xa Schnittstelle, sowie den Mutationen N289A, T346A und S741A. ExhPgpPIC9K: Gen des humanen Plasminogens in pPIC9K mit N-terminalem α-Faktor Exportsignal (ExS), „His-tag“ und Faktor Xa Schnittstelle; das ATG-Startcodon ist in der Kozak-Konsensussequenz des α-Faktor Exportsignals integriert. ExHXhPg: Humanes Plasminogen mit N-terminalem α-Faktor Exportsignal (prozessiert), „His-tag“ und Faktor Xa Schnittstelle, sowie den Mutationen N289A, T346A und S741A.

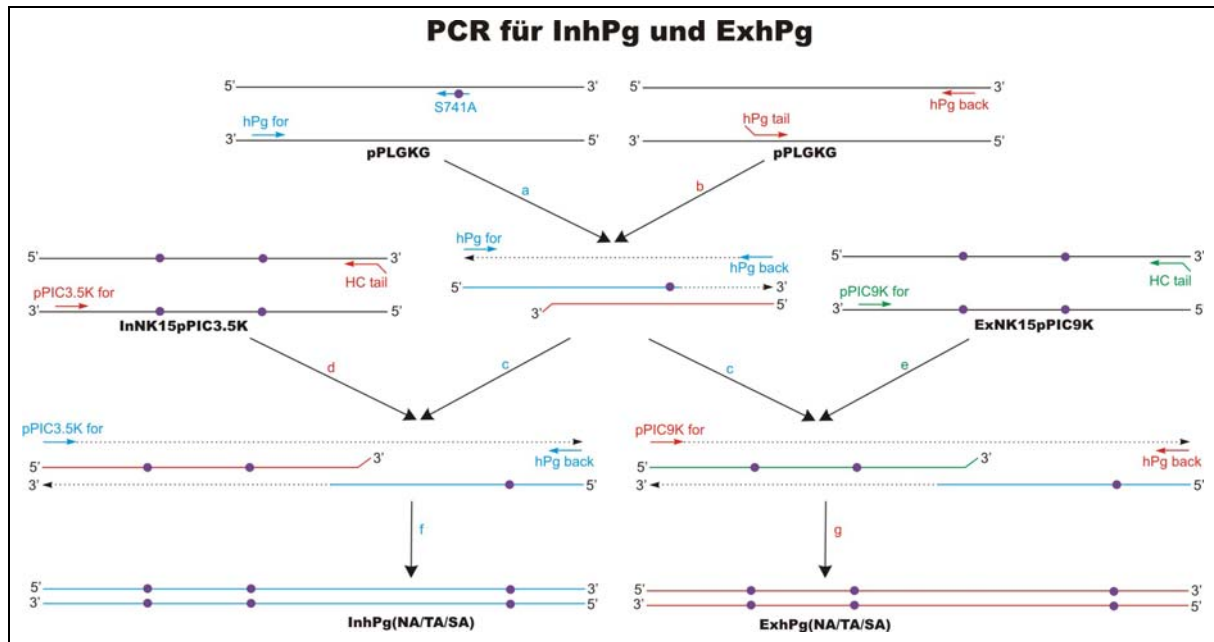
5.2.1 Molekularbiologie

5.2.1.1 PCR

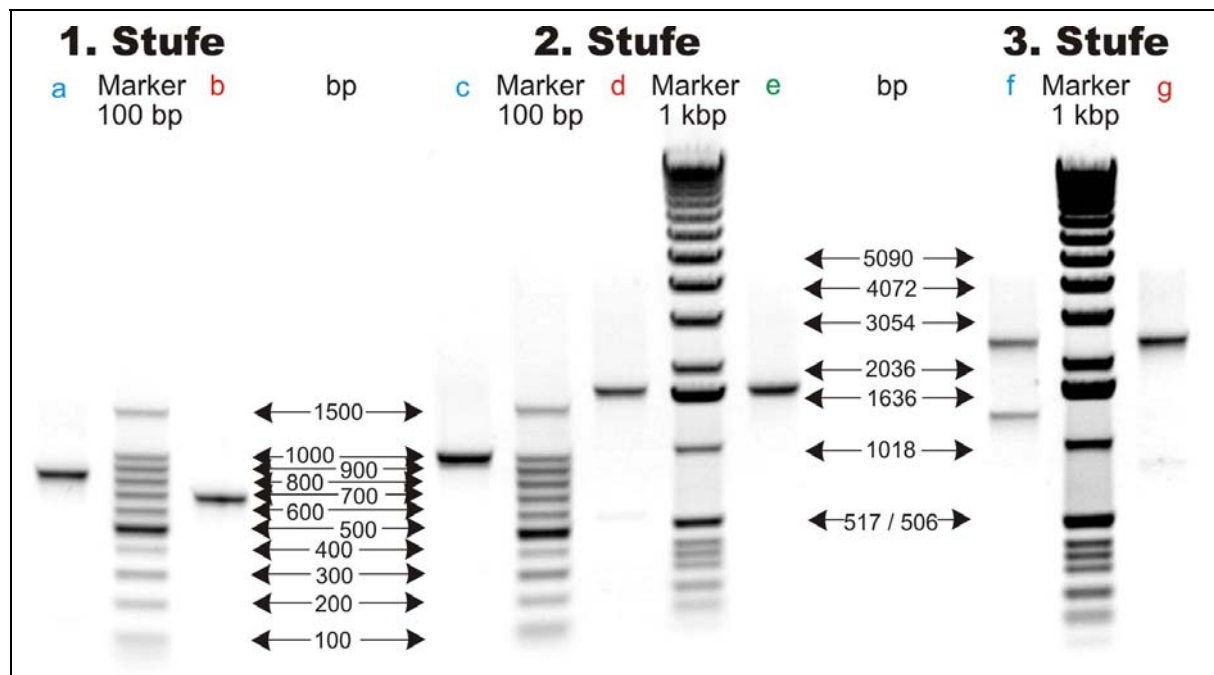
Das zur Herstellung von hPg benötigte DNA-Konstrukt wurde aus den Plasmiden InNK15pPIC3.5K und ExNK15pPIC9K sowie pPLGKG zusammengebaut, welche je die Sequenz für die schwere respektive leichte Kette beisteuerten. Die in der „supercoiled“-Form vorliegenden Plasmide wurden im Falle der NK15-Vektoren mit *NdeI*, das pPLGKG-Plasmid mit *BamHI* linearisiert und aus einem Kristallvioletttagarosegel von 0.7% ohne Einsatz von UV-Licht ausgeschnitten. Da alle Vektoren eine Grösse >4 kbp hatten, wurden sie mittels MinElute™ Gel Extraction Kit aus der Agarose extrahiert und mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit gemäss Kapitel 3.1.2.2 gereinigt. Die Primer für die nachfolgende dreistufige PCR wurden auf ihre richtige Masse mittels ESI-MS überprüft (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3: Masse der Primer mittels ESI-MS ermittelt

Primer	Masse theoretisch	Masse gemessen
HC tail	7989.2 Da	7991.13 ± 1.35 Da
hPg for	7740.0 Da	7740.50 ± 1.21 Da
hPg tail	8924.8 Da	8925.25 ± 1.81 Da
S741A	8509.6 Da	8510.75 ± 2.51 Da
hPg back	9698.4 Da	9699.38 ± 2.72 Da



Figur 5.9: Schematische Darstellung der dreistufigen PCR zur Synthese von InhPg und ExhPg. Als Template wurden die Plasmide pPLGKG, InNK15pPIC3.5K und ExNK15pPIC9K verwendet. Daraus wurden in drei Schritten die „Inserts“ InhPg und ExhPg für die Ligation in die Vektoren pPIC3.5K und pPIC9K konstruiert. Beide „Inserts“ trugen drei Mutationen, entsprechend für die beiden hauptsächlich Glykosylierungsstellen N289A und T346A, sowie zur Inaktivierung der katalytischen Triade S741A.



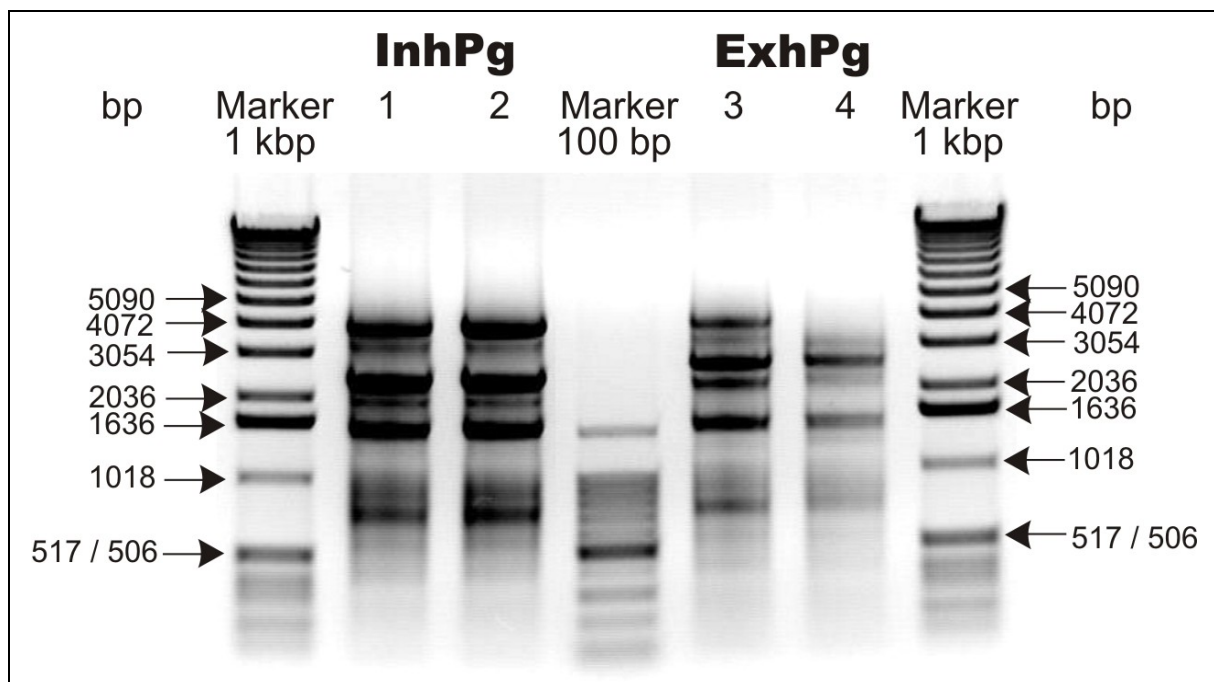
Figur 5.10: **PCR-Amplifikate.** Marker 1 kbp: 1 kbp DNA Grössenstandard. Marker 100 bp: 100 bp Grössenstandard. a: Primer hPg for / S741A, 821 bp. b: Primer hPg tail / hPg back, 674 bp. c: Primer hPg for / hPg back, 978 bp. d: Primer pPIC3.5K for / HC tail, 1689 bp. e: Primer pPIC9K for / HC tail, 1680 bp. f: Primer pPIC3.5K for / hPg back, 2442 bp + Fehlbande. g: Primer pPIC9K for / hPg back, 2433 bp.

Im ersten Schritt der dreistufigen PCR (Figur 5.9) wurden zwei Reaktionen angesetzt, wobei jeweils zwei sich überlappende Fragmente, entsprechend der leichten Kette, entstanden. Die Amplifikate a und b wurden zusammengegeben und einer zweiten PCR unterworfen. Da sich einer der beiden Stränge am 3'-Ende nicht mit den gegenüberliegenden Basen paaren konnte, wurde nur der Strang, der die Mutation der katalytischen Triade enthielt, komplettiert. Somit wurde mit den beiden äusseren Primern lediglich Produkt c, mit der Mutation S741A, entsprechend der Basensubstitution AAC →

GCC, amplifiziert. Parallel dazu wurden in zwei weiteren Reaktionen die schwere Kette mit den beiden mutierten Glykosylierungsstellen, entsprechend den Amplifikaten **d** und **e**, hergestellt. Im dritten Schritt wurden wiederum zwei PCR angesetzt, wobei jeweils zwei sich überlappende Fragmente, d.h. die Amplikate **c** und **d** sowie **c** und **e**, entsprechend der schweren und der leichten Kette, zusammengegeben wurden. Wiederum konnte mit Hilfe der beiden äusseren Primer jeweils nur einer der beiden Stränge komplettiert werden, was zu den gewünschten „Inserts“ InhPg (**f**) und ExhPg (**g**) führte. Alle PCR wurden mit *Pfu* Polymerase während 35 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 55 - 60°C, je nach verwendeten Primern, vollzogen. Vor der weiteren Verwendung wurden die Amplikate aus der jeweiligen PCR (Figur 5.10) aus Kristallviolettagarosegelen von 0.7% ohne Einsatz von UV-Licht ausgeschnitten und mittels MinElute™ Gel Extraction Kit gereinigt.

5.2.1.2 Ligation und Transformation in *E. coli*

Die ganze Ligations- und Transformationsprozedur lief sehr ähnlich ab wie in Kapitel 5.1.1.2 für die Konstrukte der schweren Kette von hPg beschrieben. Die gereinigten PCR-Amplifikate InhPg und ExhPg, sowie die Vektoren pPIC3.5K und pPIC9K wurden mit *Sna*BI an den Enden verdaut beziehungsweise linearisiert und das Enzym anschliessend hitzeinaktiviert. Die Vektoren wurden mit SAP dephosphoryliert, während die „Inserts“ mit T4 PNK phosphoryliert wurden. Die Ligation wurde angesetzt, wobei das molare Verhältnis Vektor zu „Insert“ etwa 1:10 betrug. Kompetente *E. coli* TOP10F' Zellen wurden mit den Ligationsansätzen transformiert und über Nacht auf LB-Agar Platten wachsen gelassen. Insgesamt wuchsen etwa 20 Kolonien pro Transformationsansatz, wovon vier das „Insert“ eingebaut hatten. Mit der Einführung der Mutation S741A wurde zugleich eine neue Schnittstelle für *Hga*I eingeführt. Diese bewirkt, dass das grösste *Hga*I-Fragment des nicht mutierten Plasmids (3670 bp) geschnitten wird (2892 / 778 bp). Daher wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *Hga*I im Plasmid nach der mit der Mutation S741A neu eingeführten Schnittstelle gesucht (Figur 5.11).



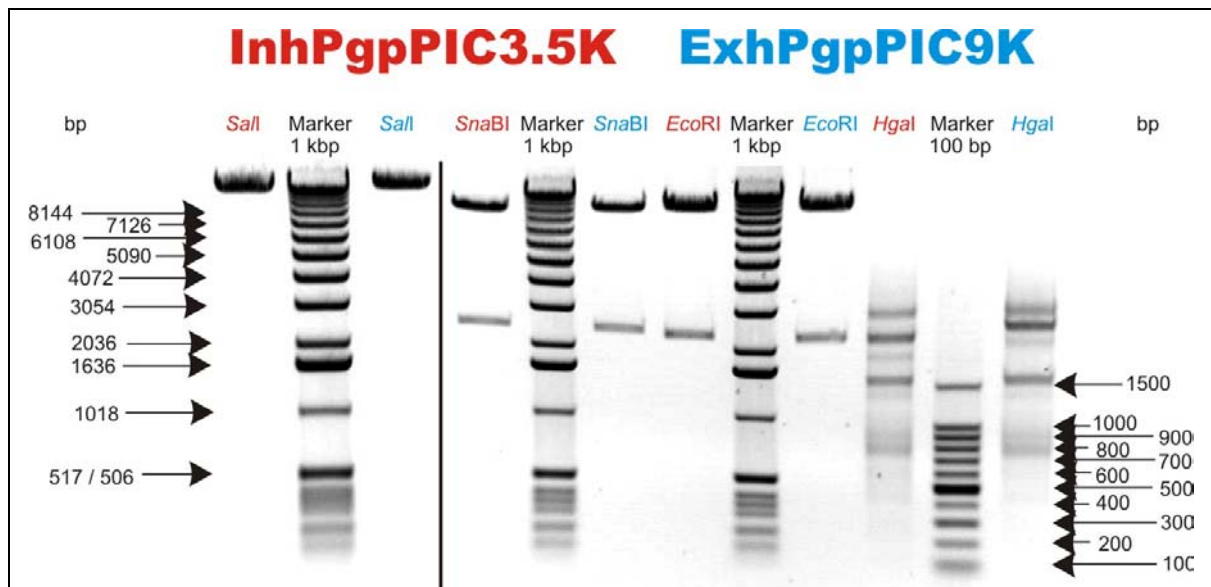
Figur 5.11: **Restriktion von InhPgPIC3.5K und ExhPgPIC9K mit *Hga*I.** Marker 1 kbp: 1 kbp Grössenstandard, 100 bp Grössenstandard. InhPg: Kolonien 1 und 2 zeigen eine Bande bei 3670 bp als grösstes Fragment. ExhPg: Bei Kolonie 3 liegt die höchste Bande ebenfalls bei 3670 bp, jedoch ist diese bei Kolonie 4 nicht zu sehen, was auf eine weitere Restriktionsstelle für *Hga*I hindeutet, entsprechend der gewünschten Mutation.

In einer der vier Kolonien konnte die gewünschte Mutation, d.h. eine neue Schnittstelle nachgewiesen werden. Die Plasmide aller vier Kolonien, d.h. zwei InhPgPIC3.5K und zwei ExhPgPIC9K, wurden vom 3'-Ende her sequenziert. Dabei bestätigte sich das Resultat der Restriktionsanalyse, dass nur eine Kolonie des Typs ExhPgPIC9K die Mutation S741A beherbergte.

Um dennoch ein korrektes InhPgPIC3.5K-Konstrukt zu erhalten, wurde wie im Falle des Vektors InNK15pPIC3.5K (siehe Kapitel 5.1.1.2) vorgegangen. Dabei wurde das die Mutation-enhaltende

EcoRI-Fragment aus dem Vektor ExhPgpPIC9K mit dem *EcoRI*-Plasmidfragment von InNK15pPIC3.5K, welches schon vom früheren Experiment vorhanden und identisch mit dem *EcoRI*-Plasmidfragment von InhPgpPIC3.5K war, ligiert und erneut in *E. coli* TOP10F' Zellen transformiert. Das neue Konstrukt InhPgpPIC3.5K, sowie der Vektor ExhPgpPIC9K wurden schliesslich in vier Restriktionsansätzen auf ihre Richtigkeit überprüft (Figur 5.12).

Mit *Sall* wurden die Plasmide linearisiert, mit *SnaBI* konnten die „Inserts“ nachgewiesen werden, mit *EcoRI* konnte die Richtung der „Inserts“ bestätigt sowie Mehrfachinsertionen ausgeschlossen werden und mit *HgaI* konnte die neu eingeführte Mutation nachgewiesen werden. Von beiden Plasmiden wurden diesmal die „Inserts“ mit Standardprimern, auf die Promotorregionen passend, ganz durchsequenziert. Sowohl im Vektor InhPgpPIC3.5K als auch im Plasmid ExhPgpPIC9K konnte die fehlerfreie Sequenz der „Inserts“ bestätigt werden. Zudem konnten die 6 insertierten Basen nur am 5'-Ende des Vektors InhPgpPIC3.5K nachgewiesen werden, die vom Vektor InNK15pPIC3.5K herrührten. Demnach hatte diesmal die Ligation mit *SnaBI*-verdautem PCR-Amplifikat stattgefunden.



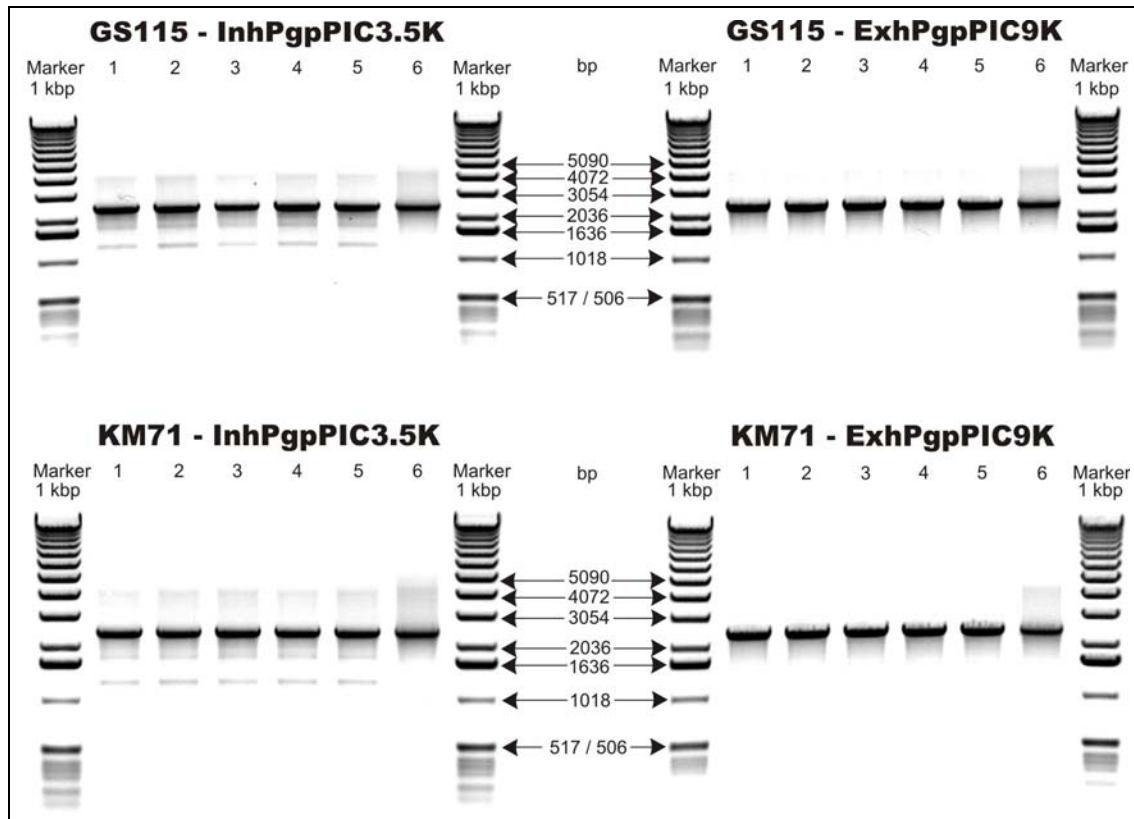
Figur 5.12: **Restriktion von InhPgpPIC3.5K und ExhPgpPIC9K.** Marker 1 kbp: 1 kbp Grössenstandard. Marker 100 bp: 100 bp Grössenstandard. **InhPgpPIC3.5K:** *Sall*: 11440 bp, *SnaBI*: 9010 / 2430 bp, *EcoRI*: 9169 / 2271 bp, *HgaI*: 2892 / 2285 / 1492 / 873 / 778 bp + kleinere Fragmente. **ExhPgpPIC9K:** *Sall*: 11697 bp, *SnaBI*: 9276 / 2421 bp, *EcoRI*: 9426 / 2271 bp, *HgaI*: 2892 / 2548 / 1492 / 873 / 778 bp + kleinere Fragmente.

5.2.1.3 Transformation und Selektion in *P. pastoris*

Die Transformation in *P. pastoris* wurde analog zu den Experimenten mit der schweren Kette (siehe Kapitel 5.1.1.3) durchgeführt, indem jeweils 5 bis 7 µg mit *Sall* linearisiertes Plasmid in Spheroplasten der *P. pastoris* Stämme GS115 und KM71 transformiert und in Top-Agar auf Histidin-defiziente Platten gegossen wurden.

Die Selektion wurde ebenfalls wie für die schwere Kette in Kapitel 5.1.1.3 bereits beschrieben in vier Schritten durchgeführt. Als erstes wurden wiederum nach etwa 4 bis 5 Tagen die mehreren 100 Kolonien auf den RDB-Platten aus dem Top-Agar herausgelöst und auf Geneticin-enthaltende G418-YPD-Platten verschiedener Konzentrationen ausgestrichen. Im Vergleich dazu war auf Histidin-haltigen Platten wiederum ein Zellrasen statt einzelner Kolonien zu beobachten, während auf keiner Negativkontrolle Kolonien wuchsen. Die nach zwei Tagen auf Geneticin gut gewachsenen Kolonien wurden erneut auf frische Platten ausgestrichen, um die Hyperresistenz eindeutig nachzuweisen. Die hyperresistenten Kolonien wurden schliesslich noch auf ihren Mut^S-Phänotyp hin überprüft, indem jede Kolonie auf MM- und MD-Platten ausgestrichen wurde. Dabei zeigte sich, dass wiederum alle GS115 Stämme Mut⁺ waren, während bei allen KM71 Stämmen der Mut^S-Phänotyp zu beobachten war.

Um sicher zu sein, dass in den selektionierten Kolonien nebst dem Wildtyp-Histidinoldehydrogenasegen und dem G418-Resistenzgen zusätzlich das rekombinierte Gen des hPg im Genom zu finden war, wurde von mehreren Zellen die genomische DNA isoliert und mittels PCR das Gen nachgewiesen (Figur 5.13). Hierzu wurde eine PCR mit den Primern pPIC3.5K for / hPg back beziehungsweise pPIC9K for / hPg back angesetzt und unter den selben Bedingungen wie in Kapitel 3.1.2.3.2 unter „Ansatz 3“ beschrieben das Gen amplifiziert.



Figur 5.13: PCR zum Nachweis vom „Insert“ in der genomischen DNA der vier verschiedenen Zell-Plasmid-Varianten. Marker 1 kbp: 1 kbp Grössenstandard. Bahnen 1 - 5: Entsprechen jeweils dem PCR-Produkt InhPg (2442 bp) oder ExhPg (2433 bp) im Genom verschiedener Klone. Bahn 6: Entspricht dem jeweiligen Referenzvektor InhPgpPIC3.5K (2442 bp) oder ExhPgpPIC9K (2433 bp).

Vollständig charakterisiert waren somit je fünf Stämme der vier Zell-Plasmid-Varianten (Tabelle 5.4). Je vier Stämme beherbergten mehrere Kopien des Gens für hPg, während je ein Stamm nur etwa eine Kopie ins Genom rekombiniert hatte. Somit konnten die Expressionen mit jeweiliger Hintergrundreferenz, Überexpressionsreferenz und Expressionsreferenz (GS115 Albumin oder GS115 β -Galactosidase) begonnen werden.

Tabelle 5.4: Charakterisierung der rekombinanten <i>P. pastoris</i> Stämme mit hPg	
GS115 - InhPgpPIC3.5K:	5 Stämme, Mut ⁺ , intrazelluläre Expression, 4x hyperresistent (mehrere Kopien), 1x ~1 Kopie (Referenz Überexpression)
GS115 - ExhPgpPIC9K:	5 Stämme, Mut ⁺ , sekretierte Expression, 4x hyperresistent (mehrere Kopien), 1x ~1 Kopie (Referenz Überexpression)
KM71 - InhPgpPIC3.5K:	5 Stämme, Mut ^S , intrazelluläre Expression 4x hyperresistent (mehrere Kopien), 1x ~1 Kopie (Referenz Überexpression)
KM71 - ExhPgpPIC9K:	5 Stämme, Mut ^S , sekretierte Expression 4x hyperresistent (mehrere Kopien), 1x ~1 Kopie (Referenz Überexpression)
Hintergrundreferenzen:	Es konnten die gleichen verwendet werden wie für NK15

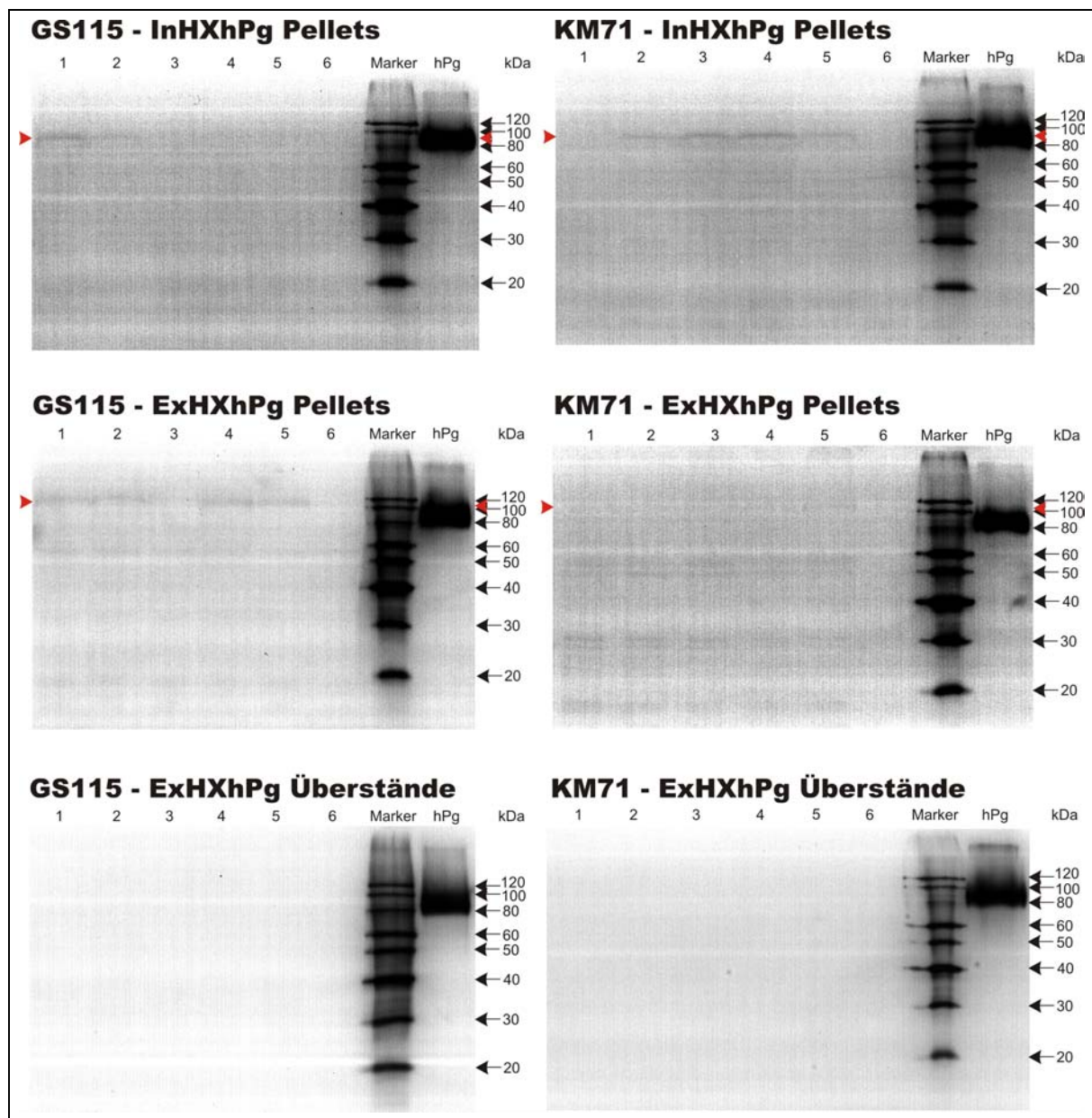
5.2.2 Proteinchemie

5.2.2.1 Expression im Kleinansatz

Alle charakterisierten Stämme wurden analog zu den Konstrukten der schweren Kette NK15 (siehe Kapitel 5.1.2.1) angesetzt, induziert und geerntet. Von den letzten Proben, d.h. nach 96 Stunden für die Mut⁺-Stämme und 144 Stunden für die Mut^S-Stämme, wurden „Immunoblots“ gemacht, um eine

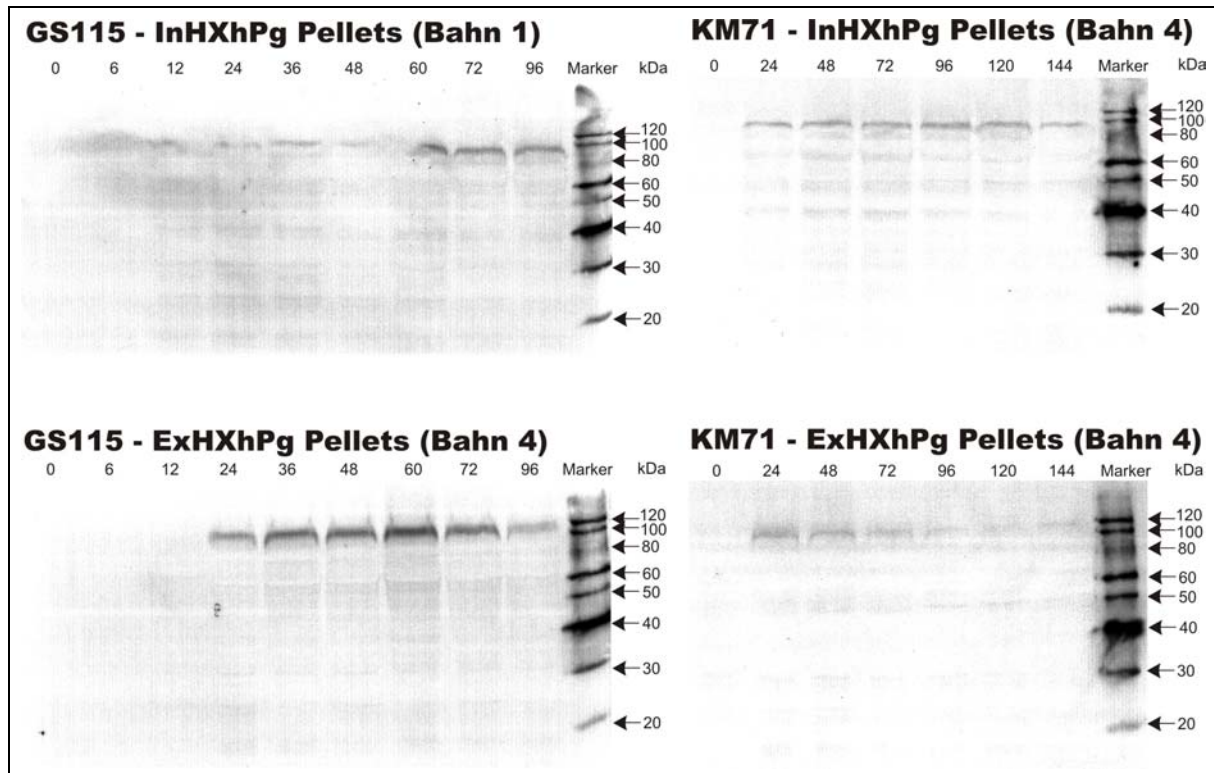
allfällige Überexpression zu erkennen (Figur 5.14). Zudem wurden immer auch die drei Referenzen für die Überexpression, den Hintergrund und die Expressionsbedingungen analysiert.

Im Gegensatz zu den Expressionen von HXNK15 konnten hier mindestens einige Stämme jeder Variante gefunden werden, die hPg schwach exprimierten. Bei der intrazellulären Expression konnten sowohl Mut⁺- als auch Mut^S-Stämme gefunden werden, die eine Bande bei ca. 90 kDa zeigten. Die theoretische Masse vom rekombinanten, intrazellulär exprimierten hPg mit den drei Mutationen in unglykosylierter Form betrug 89'920 Da, was sehr gut der Grösse der Bande auf dem „Immunoblot“ entsprach. Bei der sekretierten Expression konnte kein Protein im Medium nachgewiesen werden, auch nicht nach Aufkonzentrierung um das fünf- bis zehnfache. Jedoch waren in den Pelletfraktionen Banden zumindest bei den Mut⁺-Stämmen zu beobachten, in schwächerer Intensität auch bei einigen Mut^S-Stämmen, allesamt bei einer Höhe knapp über 100 kDa. Die theoretische Masse vom rekombinanten, sekretierten hPg mit den drei Mutationen in unglykosylierter Form beträgt 90'028 Da. Da aber das Protein in der Pelletfraktion nachgewiesen werden konnte, war anzunehmen, dass das α -Faktor Exportsignal immer noch N-terminal am Protein hing. Die theoretische Masse des hPg mit dem Exportsignal betrug 99'301 Da, was der beobachteten Bande sehr nahe kam.



Figur 5.14: „Immunoblots“ aller Stämme zur Detektion von HXhPg. GS115: Proben nach 96 Stunden Expression. KM71: Proben nach 144 Stunden Expression. Bahnen 1 - 4: Entsprechen jeweils den vier Stämmen mit mehreren Kopien des rekombinanten Gens. Bahn 5: Überexpressionsreferenz mit nur einer Kopie des rekombinanten Gens. Bahn 6: Hintergrundreferenz mit dem rekombinierten Vektor ohne „Insert“. Marker: MagicMark™ Grössenstandard. hPg: Humanes Plasminogen aus Blutplasma isoliert als Positivkontrolle für den Antikörper.

Nun galt es einerseits die beste Expressionsdauer für eine optimale Ausbeute zu eruieren und andererseits die Beobachtungen bezüglich des Grössenunterschieds zwischen InHXhPg und ExHXhPg zu bestätigen. Als erstes wurden von vier vielversprechenden Stämmen die 1 ml Zeitreihen erneut mittels SDS-PAGE aufgetrennt und diesmal zusätzlich geblottet und immunologisch detektiert (Figur 5.15).



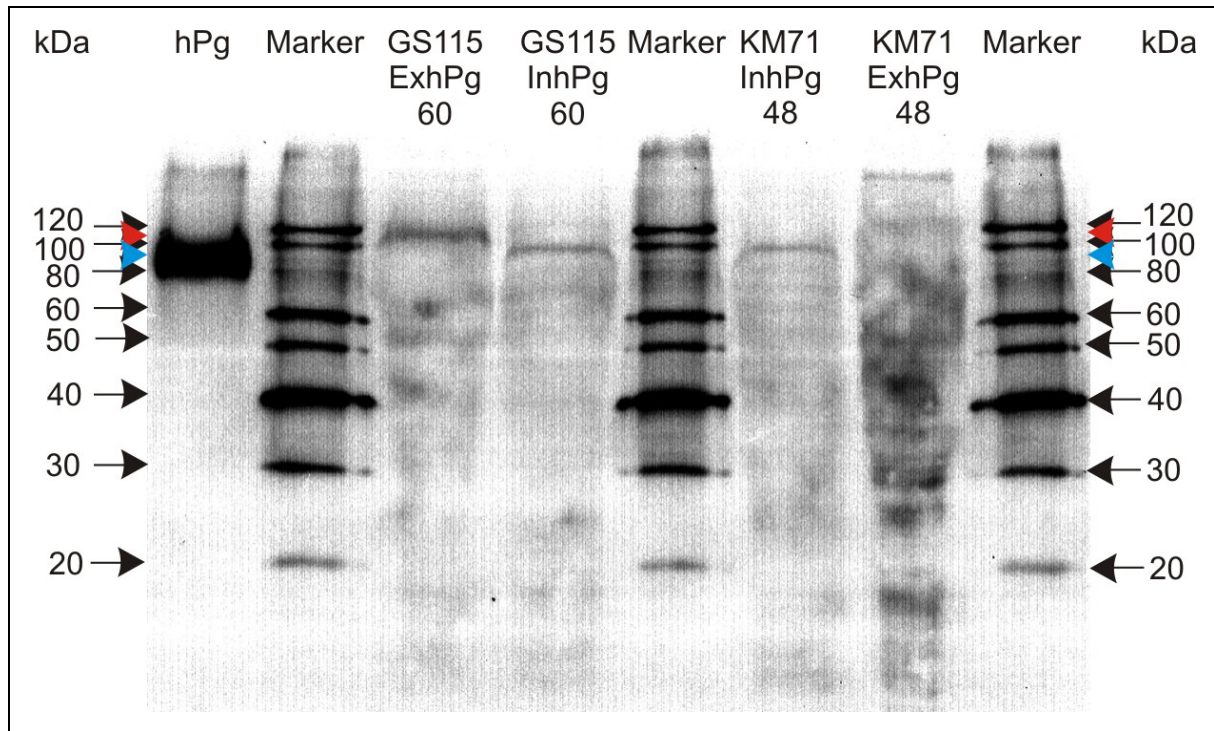
Figur 5.15: „Immunoblots“ der Zeitreihen von 4 Stämmen zur Ermittlung der optimalen Expressionsdauer. Die Bezeichnungen in Klammern beziehen sich auf Figur 5.14; von den Stämmen jener Bahnen wurden die Zeitreihen analysiert. Zahlen der Bahnen: x Stunden nach Start der Induktion. Marker: MagicMark™ Grössenstandard.

Aus der Analyse der Zeitreihen konnte die optimale Expressionsdauer ziemlich eindeutig auf 60 Stunden nach dem Beginn der Induktion festgelegt werden, unabhängig von intrazellulärem oder sekretiertem Konstrukt, sowie Mut⁺- oder Mut^S-Phänotyp. Nun wurde mit den Proben nach 60 Stunden (beide Mut⁺-Stämme) und 48 Stunden (beide Mut^S-Stämme) versucht den Grössenunterschied zwischen InHXhPg und ExHXhPg, der sich aus den vorangehenden „Immunoblots“ abzuzeichnen schien, zu untermauern (Figur 5.16). Aus einem solchen „Immunoblot“ konnte zumindest bei den Mut⁺-Stämmen eindeutig gesehen werden, dass es sich um zwei verschieden grosse Proteine handelte. Das Kleinere schien dem InHXhPg zu entsprechen, während das Grössere ExHXhPg mit N-terminalem Exportsignal sein musste.

Mehrere am Ende der Induktion gesammelte Pellets wurden aufgeschlossen und auf verschiedene Arten weiterverarbeitet, um eventuell intaktes Protein für die Analytik zu erhalten. Wenn das Zelllysats direkt auf eine Lysin-Bio-Gel-Säule geladen wurde, konnte kein Protein eluiert werden. Demnach war das Protein entweder in zu geringen Mengen vorhanden oder nicht zugänglich. Zudem war auch denkbar, dass es falsch gefaltet sein könnte und es somit nicht mit den Lysinbindungsstellen (LBS) an Lysin binden konnte. Wenn das denaturierend mit Gu-HCl-Puffer aufgeschlossene Zelllysats auf eine Ni-NTA-Säule geladen und pH-abhängig eluiert wurde, konnte ein Peak einer Höhe von etwa 0.4 AU in 20 ml gesammelt werden. Die Analyse des Eluats mittels RP-HPLC ergab im Chromatogramm aber nur mehrere kleine Peaks. Trotzdem wurde versucht das Eluat zurückzufalten, wie schon ausführlich für die diversen *E. coli* Konstrukte beschrieben, um schliesslich auf einer Lysin-Bio-Gel-Säule zu beobachten, ob irgend eine Affinität bestand. Aber auch auf diesem Weg konnte kein Protein von der Säule eluiert werden. Es war anzunehmen, dass entweder die Rückfaltung nicht geklappt hatte oder zu wenig Material für eine adäquate Detektion vorhanden war.

Wie von von Haller (nicht publiziert) schon einmal durchgeführt, wurden als letzte Möglichkeit mit Natriumphosphatpuffer aufgeschlossene Zellen zunächst mehrere Male dialysiert und erst dann auf eine Lysin-Bio-Gel-Säule geladen, wie in Kapitel 3.2.2.2.1 beschrieben. Von Haller konnte mit dieser Methode die Proteine ExNK1 und ExK45 aus Kleinansätzen in analytischen Mengen isolieren, was zuvor

ohne die Dialyse fehlgeschlagen war. Bei den exprimierten Proteinen InHXhPg und ExHXhPg konnten jedoch keine Elutionspeaks im Chromatogramm beobachtet werden, selbst nicht als die standardmässige Einstellung der Absorptionsempfindlichkeit von 1.0 AU auf zehnfach empfindlichere 100 mAU umgestellt wurde.



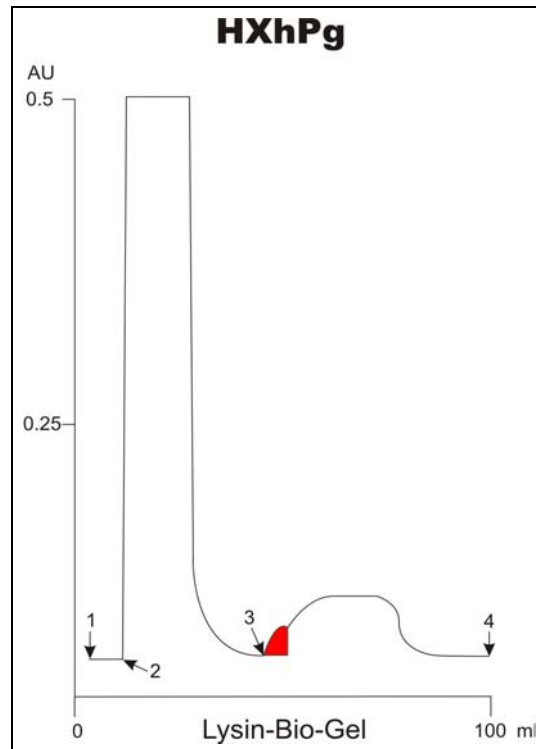
Figur 5.16: „Immunoblot“ von vier Stämmen nach der optimalen Expressionsdauer zum Nachweis des Grössenunterschieds. InhPg: InHXhPg auf der Höhe der blauen Pfeile. ExhPg: ExHXhPg auf der Höhe der roten Pfeile. Marker: MagicMark™ Grössenstandard. hPg: Humanes Plasminogen aus Blutplasma isoliert als Positivkontrolle für den Antikörper.

5.2.2.2 Expression im Grossansatz

Die vier Stämme wurden auf YPD-Platten angezogen, in 25 ml Glycerin-haltigem BMGY-Medium entsprechend Kapitel 3.1.2.9.4 überimpft und schliesslich in 500 ml BMGY überführt. Diese grossen Vor-kulturen wurden bis zu einer OD_{600} zwischen 2 bis 6 wachsen gelassen. Die pelletierten Zellen wurden schliesslich im Falle der Mut^+ -Stämme in je zweimal 500 ml Methanol-haltigem BMMY-Medium zu einer OD_{600} von 1 aufgenommen, während die Mut^S -Stämme in 100 ml BMMY-Medium induziert wurden. Alle wurden nach jeweils 24 Stunden mit 0.5% Methanol supplementiert und nach 60 Stunden geerntet.

Die Pellets wurden in Natriumphosphatpuffer resuspendiert und mittels „French press“, Ultraschall und Glasperlen aufgebrochen. Nach vier Dialyseschritten in Natriumphosphatpuffer wurden die Lysate auf Lysin-Bio-Gel-Säulen geladen und versucht möglichst viel Protein zu eluieren. Bei der Elution konnte in den Chromatogrammen jeweils ein relativ rascher Anstieg der Absorptionsintensität beobachtet werden. Dieser war jedoch so klein, dass das anschliessende Plateau der Absorption durch 6-AHA höher war (Figur 5.17). Demnach müsste versucht werden mit weniger, d.h. mit etwa 50 mM 6-AHA zu eluieren, womit dann wahrscheinlich ein kleiner Peak beobachtet werden könnte, weil das Plateau der Absorption entsprechend tiefer wäre.

Während der folgenden Dialyse der etwa 5 ml Eluat gegen 5 l mQH_2O -pH3.5 wurden jeweils 50 μ l entnommen und auf dem RP-HPLC analysiert. Das Chromatogramm bestand statt aus einem einzigen, aus mehr als 10 sehr schwachen Peaks, die möglicherweise auf eine Fragmentierung des Proteins hindeuteten und dies trotz Einsatz einer Mischung von Proteaseinhibitoren. Es könnte auch sein, dass sich dieser sehr kleine Elutionspeak hauptsächlich aus unspezifisch bindenden Komponenten zusammensetzte. Nach der Lyophilisation war praktisch kein Material in den Kolben vorzufinden. Somit war auch den Experimenten mit Grosskulturen kein Erfolg bezüglich der Isolation von rekombinantem hPg beschieden.

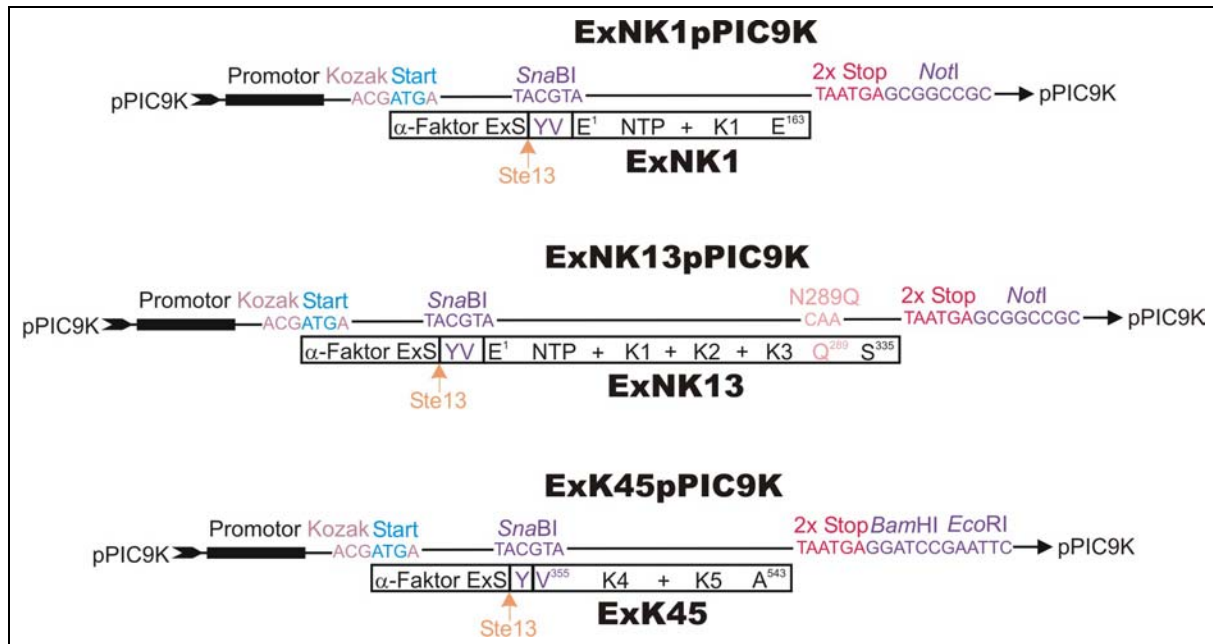


Figur 5.17: Affinitätschromatogramm von HXhPg auf Lysin-Bio-Gel. Punkt 1: Säule äquilibriert mit Natriumphosphatpuffer pH 8.5. Punkt 2: Dialysat laden und Säule waschen mit Natriumphosphatpuffer pH 8.5. Punkt 3: Eluieren mit 200 mM 6-AHA in Natriumphosphatpuffer pH 8.5. Punkt 4: Ende des Chromatogramms. Der rote Bereich entspricht der gesammelten und weiterverarbeiteten Fraktion.

5.3 Expression von NK1, NK13 und K45

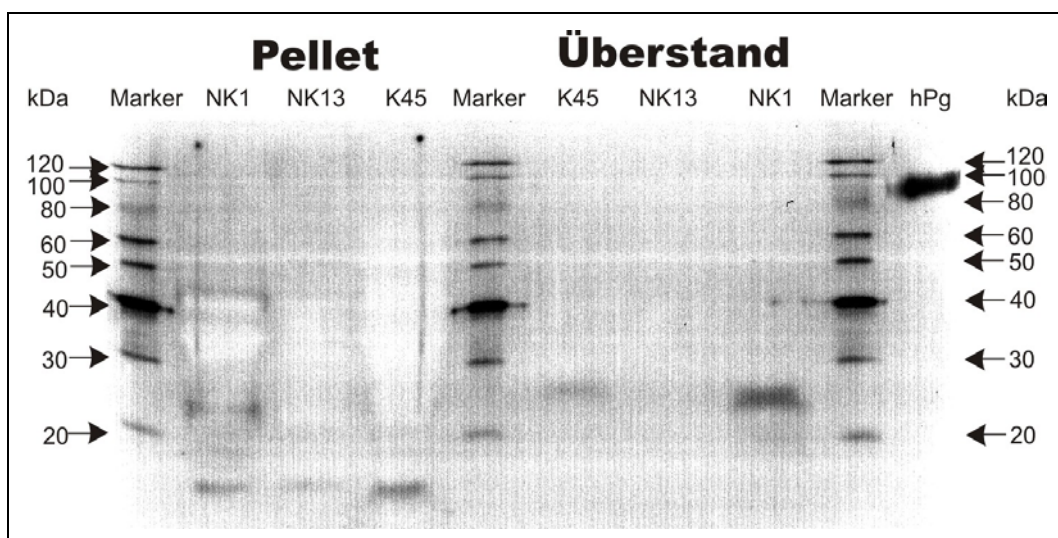
Die drei Konstrukte NK1, NK13 und K45 wurden vorgängig von von Haller (1999) in den pPIC3.5K-Vektor kloniert und in *P. pastoris* transformiert. Allerdings konnte in kleinen Expressionsansätzen kein Protein auf den „Immunoblots“ nachgewiesen werden. Da die intrazelluläre Expressionsvariante nicht zum gewünschten Ziel führte, wurden die drei Konstrukte ebenfalls von von Haller (nicht publiziert) in den pPIC9K-Vektor ligiert und in den *P. pastoris* Stamm KM71 transformiert. In kleinen Expressionsansätzen konnte für die beiden kleineren Konstrukte NK1 und K45 je eine Bande immunologisch nachgewiesen werden, während für NK13 kaum Expression beobachtet werden konnte. Aufgrund dieser Vorexperimente sollte nun überprüft werden, ob auch grössere Mengen an Protein isoliert werden konnten, insbesondere ob die Ausbeute an NK1 aus *P. pastoris* grösser war als jene aus *E. coli*. Damit hätte man einen Vergleich zwischen den beiden Expressionssystemen bezüglich der Expression von Fragmenten des hPg und deren Eigenschaften und Reinheit.

Wie in Figur 5.18 dargestellt begannen die Konstrukte ExNK1pPIC9K und ExNK13pPIC9K nach dem α -Faktor Exportsignal mit den zwei Aminosäuren Tyr und Val, entsprechend der 5'-terminalen Klonierungsstelle mit *Sna*BI, gefolgt von Glu¹ des N-terminalen Peptids (NTP) des hPg bis zu Glu¹⁶³ am Ende des Kringels 1 im Falle von NK1, während sich das rekombinante Gen von NK13 bis hin zu Ser³³⁵ erstreckte. Zudem war die Glykosylierungsstelle an Asn²⁸⁹ zu Gln²⁸⁹ mutiert worden. Am 3'-Ende waren die rekombinanten Gene nach den zwei eingeführten Stopcodons mit *Not*I in den Vektor kloniert worden. Das Konstrukt ExK45pPIC9K startete nach dem α -Faktor Exportsignal ebenfalls mit den zwei Aminosäuren Tyr und Val, entsprechend der 5'-terminalen Klonierungsstelle mit *Sna*BI, wobei aber das Val schon der ersten Aminosäure des rekombinanten Gens entsprach, nämlich Val³⁵⁵ am Anfang des Kringels 4. Es erstreckte sich weiter bis zu Ala⁵⁴³ am Ende des Kringels 5, gefolgt von zwei Stopcodons und der 3'-terminalen Klonierungsstelle *Eco*RI. Demnach sollten die drei Konstrukte in das Medium sekretiert werden und auf einer Lysin-Bio-Gel-Säule affinitätschromatographisch in reiner Form isoliert werden können. Nachfolgend werden die Gene immer als ExNK1pPIC9K, ExNK13pPIC9K beziehungsweise ExK45pPIC9K, die daraus resultierenden Proteine als ExNK1, ExNK13 respektive ExK45 bezeichnet.



Figur 5.18: **DNA-Konstrukte und ihre Proteine.** ExNK1pPIC9K: Gen von NTP bis K1 in pPIC9K; das ATG-Startcodon ist in der Kozak-Konsensussequenz des α-Faktor Exportsignals (ExS) integriert. ExNK1: Protein von NTP bis K1 mit N-terminalem α-Faktor Exportsignal. ExNK13pPIC9K: Gen von NTP bis K3 in pPIC9K; das ATG-Startcodon ist in der Kozak-Konsensussequenz des α-Faktor Exportsignals integriert. ExNK13: Protein von NTP bis K3 mit N-terminalem α-Faktor Exportsignal, sowie der Mutation N289Q. ExK45pPIC9K: Gen von K4 bis K5 in pPIC9K; das ATG-Startcodon ist in der Kozak-Konsensussequenz des α-Faktor Exportsignals integriert. ExK45: Protein von K4 bis K5 mit N-terminalem α-Faktor Exportsignal.

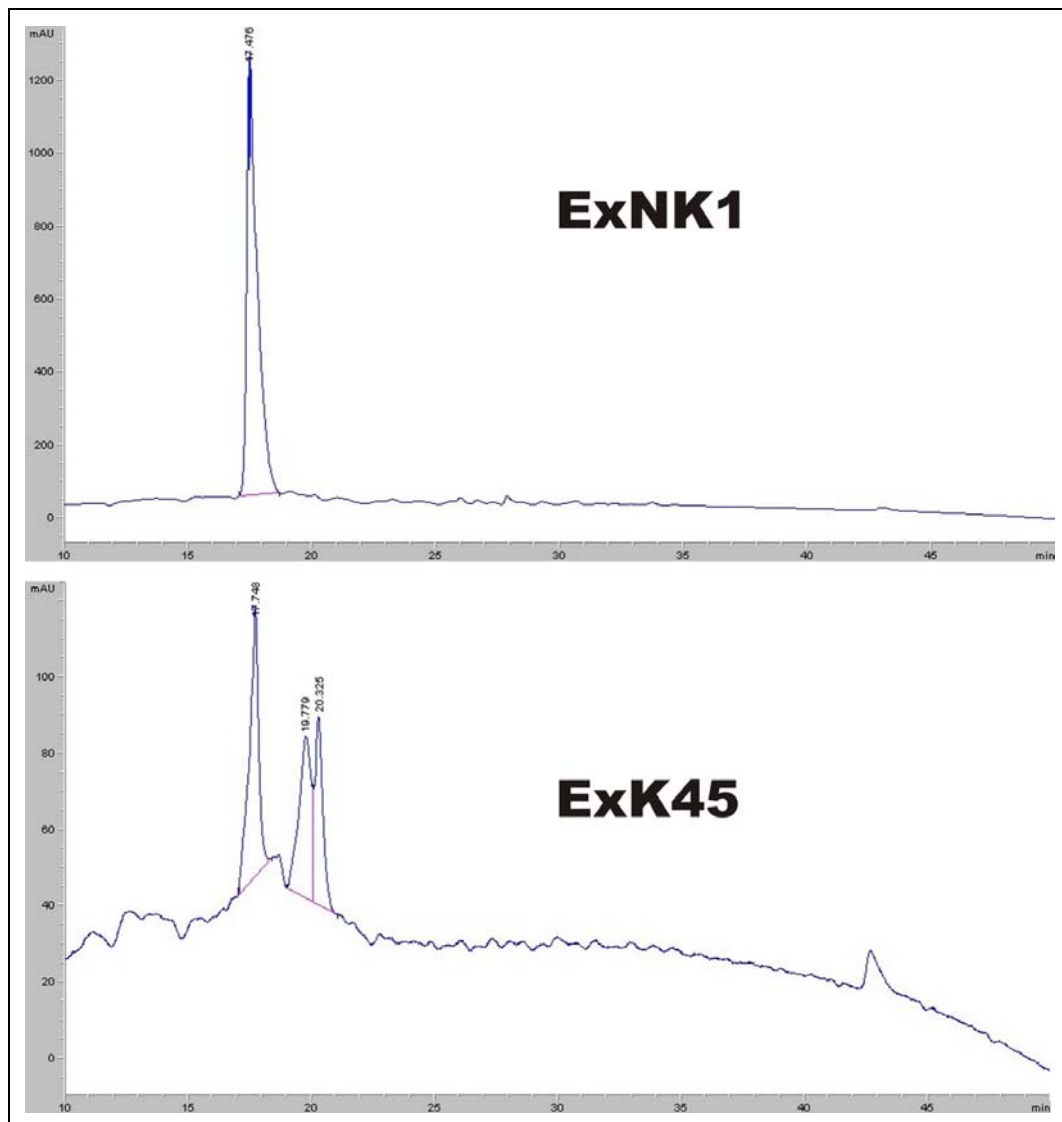
Die drei Stämme wurden auf YPD-Platten angezogen und in 25 ml Glycerin-haltigem BMGY-Medium überimpft (siehe Kapitel 3.1.2.9.4). Von diesen kleinen Vorkulturen wurden 500 ml BMGY inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 2 bis 6 wachsen gelassen. Die pelletierten Zellen wurden schliesslich in 100 ml Methanol-haltigem BMMY-Medium aufgenommen und während 60 Stunden induziert sowie alle 24 Stunden mit 0.5% Methanol supplementiert. Nach der Expression wurde je 1 ml entnommen und für eine Analyse mittels „Immunoblotting“ vorbereitet. Dazu wurden sowohl die aufbereiteten Pellets, als auch die Überstände mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und immunologisch nachgewiesen (Figur 5.19).



Figur 5.19: „Immunoblot“ der Proteine ExNK1, ExNK13 und ExK45. Marker: MagicMark™ Grössenstandard. hPg: Humanes Plasminogen aus Blutplasma isoliert als Positivkontrolle für den Antikörper.

Auf dem „Immunoblot“ war deutlich eine Überexpression von ExNK1 und weniger stark von ExK45 im Medium zu sehen, hingegen wies keine Bande auf die Anwesenheit von ExNK13 hin. Die Bande von

ExNK1 lag ziemlich genau bei 25 kDa, während jene von ExK45 leicht darüber lag. Diese Beobachtung stimmt relativ gut mit den theoretischen Massen von 18'941 Da beziehungsweise 21'147 Da überein, unter Berücksichtigung, dass schon des öfters eine Verschiebung nach höheren Massen bei einzelnen rekombinanten Kringel beschrieben wurde [von Haller (1999)]. Der Masseunterschied konnte zudem nicht von der allfällig noch vorhandenen α -Faktor Exportsequenz stammen, da dies eine Verschiebung um ziemlich genau 10 kDa zur Folge gehabt hätte, wie schon im Fall von in *P. pastoris* exprimiertem rekombinantem hPg gezeigt (siehe Kapitel 5.2.2.1). Demnach schien bei diesen kleineren Konstrukten die Sekretion und Prozessierung des Exportsignals offensichtlich zu funktionieren, während beim ganzen Plasminogen auch die für den Export bestimmten Proteine aus dem Zellpellet isoliert werden mussten. Die Bande bei 25 kDa in der Pelletfraktion von ExNK1 rührte höchstwahrscheinlich von wenig noch nicht exportiertem Protein her. Die übrigen in den Pelletfraktionen sichtbaren Banden konnten auf unspezifische Bindungen des eingesetzten Antikörpers zurückgeführt werden, weil allgemein sehr viel Material auf das Gel geladen worden war.

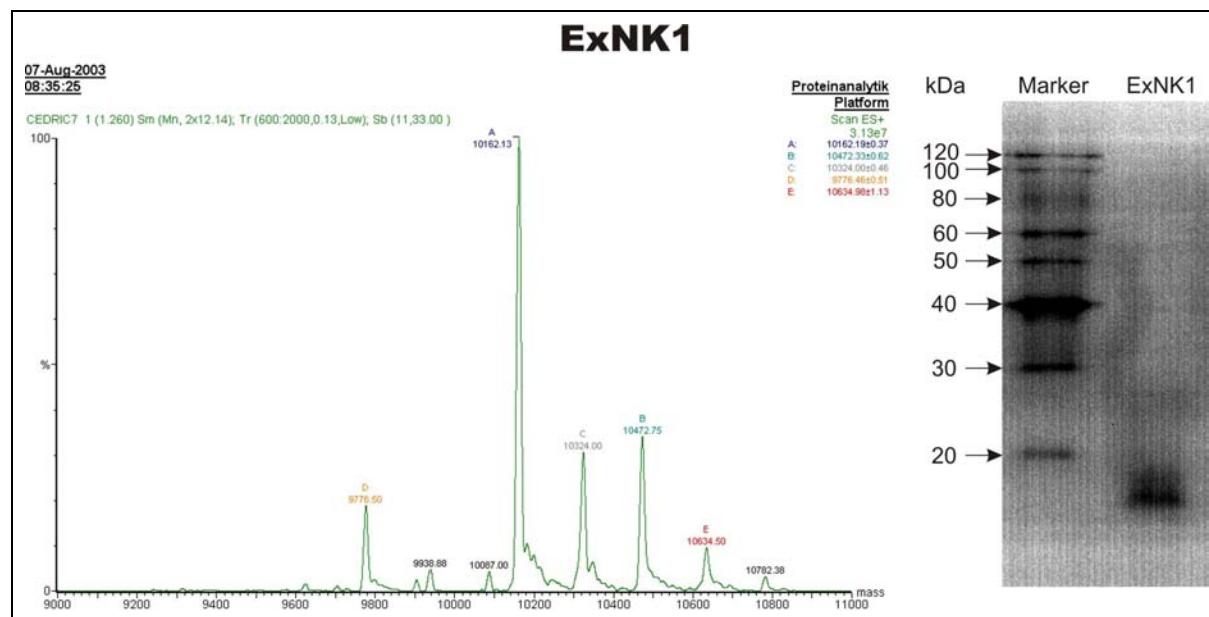


Figur 5.20: **Präparative Aufarbeitung von ExNK1 und ExK45 mittels RP-HPLC in Gegenwart von 0.1% TFA bei 210 nm.** Bedingungen: RP-HPLC-Laufmittel B in A von 0 - 100% in 50 Minuten. Chromatogramm ExNK1: ¼ der Ausbeute von ExNK1; Retentionszeit 17.5 min. Chromatogramm ExK45: ¼ der Ausbeute von ExK45; Retentionszeiten 17.8, 19.8 und 20.3 min.

Die 100 ml Medium jedes Ansatzes wurden viermal gegen Natriumphosphatpuffer dialysiert und anschliessend auf eine Lysin-Bio-Gel-Säule geladen. Dabei konnten im Fall von ExNK1 etwa 20 ml einer Peakhöhe von 0.2 AU eluiert werden, während ExK45 etwa 20 ml einer Absorption von 0.1 AU lieferte. Bei ExNK13 konnte erwartungsgemäss kein Peak beobachtet und demnach auch nichts weiterverarbeitet werden. Die beiden Proteine ExNK1 und ExK45 wurden fünfmal gegen je 5 l mQH₂O-pH3.5 dialysiert und schliesslich lyophilisiert.

Die Ausbeute war sehr gering und betrug um die 100 µg. Da beide Lyophilisate bräunlich waren, wurden sie in je 100 µl sH₂O resuspendiert und während 2 Minuten mit 20'000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, wobei unlösliche Bestandteile pelletiert werden konnten. 25 µl der Überstände wurden mittels RP-HPLC gereinigt und die Proteinfractionen gesammelt (Figur 5.20).

Bei ExNK1 konnte ein einziger Peak im Chromatogramm beobachtet werden. Die Höhe des Peaks liess auf relativ viel Protein schliessen und war als weisses Lyophilisat nach dem Trocken in der Speed-Vac zu sehen. Im Falle von ExK45 wurden drei Peaks im Chromatogramm entdeckt. Die Höhe der einzelnen Peaks war 10 bis 20 mal geringer als bei ExNK1. Nach der Lyophilisation konnten zudem auch keine weissen Rückstände gesehen werden, wie dies bei ExNK1 der Fall gewesen war. Das Lyophilisat von ExNK1 konnte schliesslich mittels „Immunoblotting“, Edman-Abbau, Aminosäureanalyse und ESI-MS charakterisiert werden (Figur 5.21), während die drei gesammelten lyophilisierten Fraktionen von ExK45 keine schlüssigen Resultate, aufgrund zu geringer Proteinmengen, lieferten.



Figur 5.21: **Analyse von ExNK1.** Links: Massenspektrum gemessen mittels ESI-MS, Hauptmassepeaks: 10162.13 ± 0.37 Da, 10472.75 ± 0.62 Da, 10324.00 ± 0.46 Da und 9776.50 ± 0.51 Da. Rechts: „Immunoblot“.

In Tabelle 5.5 sind die Resultate der Analyse von ExNK1 zusammengefasst. Keine der gemessenen Massen des ESI-MS Spektrums entsprachen dem intakten Protein. Alle gefundenen Peaks waren kleiner als die theoretische Masse von 21'147.41 Da, wovon zwei Peaks Fragmenten von ExNK1 zugeordnet werden konnten. Die Masse von $10'162.13 \pm 0.37$ Da entsprach dem Kringel 1 von Glu⁷⁶ bis Glu¹⁶³ und jene von $9'776.50 \pm 0.51$ Da stimmte mit einem leicht kürzeren Fragment von Kringel 1 von Val⁷⁹ bis Glu¹⁶³ überein. Die weiteren im Spektrum auftretenden Massen mussten irgendwelche Adukte sein, da sie keinen weiteren Fragmenten zugeordnet werden konnten. Die Massen um 10 kDa konnten ebenfalls im „Immunoblot“ als breite Bande nachgewiesen werden, die wie für rekombinante Kringel üblich nach etwas höherer Masse verschoben war. Die Sequenzierung nach Edman lieferte die N-terminale Sequenz der zwei obengenannten Fragmente, wobei jenes mit Glu⁷⁶ startend ein Signal lieferte, welches etwa fünfmal intensiver war als jenes vom anderen Fragment herrührend. Demnach musste das Lyophilisat hauptsächlich aus dem Fragment Glu⁷⁶ - Glu¹⁶³ bestehen, was mittels der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung bestätigt werden konnte.

Tabelle 5.5: Charakterisierung von ExNK1

ESI-MS:	<i>gemessen</i>	<i>theoretisch</i>
	9776.50 ± 0.51 Da	9778.74 Da V ⁷⁹ - E ¹⁶³ (K1)
	10162.13 ± 0.37 Da	10164.20 Da E ⁷⁶ - E ¹⁶³ (K1)
	10324.00 ± 0.46 Da	-
	10472.75 ± 0.62 Da	-
N-terminale Sequenzierung:	EKKVY (Intensität 5x) VYLSE (Intensität 1x)	
Ausbeute:	ca. 100 µg	

6 Diskussion

6.1 *E. coli*

Die Klonierung der Konstrukte der schweren Kette von humanem Plasminogen (hPg) in die beiden Vektoren pQE-8 und pET-9a verlief relativ problemlos und führte rasch zum Ziel. Einzig die Ligationen erwiesen sich als schwierig. Deshalb wurden einige der Ligationsansätze, statt in chemisch-kompetente, mittels Elektroporation in elektrokompente Zellen transformiert. Die Effizienz der Transformationen steigerte sich dadurch um etwa drei Zehnerpotenzen, womit auch Ligationsansätze mit tiefen Ausbeuten zu einigen Kolonien mit dem richtigen Konstrukt führten. Statistisch gesehen reichte somit eine einzige Transformation mit elektrokompenten Zellen, um mehrere Kolonien ernten zu können, während etwa hundert Transformationsansätze mit chemisch-kompetenten Zellen nötig gewesen wären, um eine einzige Kolonie zu erhalten.

Die zwei Konstrukte der schweren Kette von hPg mit und ohne N-terminales Peptid (NTP) im pQE-8 Vektor waren so konzipiert, dass sie eine Isolation über zwei Affinitätschromatographien ermöglichen sollten. Einerseits konnte mit Hilfe des „His-tags“ das Protein an eine Ni^{2+} -Matrix binden, andererseits konnten die Kringel mit ihren Lysinbindungsstellen (LBS) mit einer Lysinmatrix in Wechselwirkung treten. Durch Anwendung beider Isolationsmethoden in Serie konnte schon verschiedentlich reines Protein erhalten werden, wie dies auch für diverse kleinere Fragmente von hPg beschrieben worden war [Douglas *et al.* (2002); Marti *et al.* (1994)]. Die Konstrukte im pET-9a Vektor hatten weder N- noch C-terminal einen coexprimierten „His-tag“, womit diese Proteine nur mittels Lysin-Bio-Gel als einziger Affinitätschromatographie gereinigt werden konnten.

Als erste Experimente wurden „native Isolationen“, d.h. Aufschluss der Zellen in Natriumphosphatpuffer ohne Zugabe von denaturierenden Agentien, durchgeführt, um die Proteine in bereits gefalteter Form isolieren zu können. Allerdings konnte nach dem Laden der Lysate auf eine Lysin-Bio-Gel-Säule kein Protein eluiert werden. Dafür gab es zwei mögliche Gründe: Erstens könnte das Protein „falsch“ gefaltet gewesen sein, d.h. die Konformation der LBS der Kringel hätte nicht der natürlichen dreidimensionalen Struktur entsprochen, womit auch keine Affinität zu Lysin hätte zustande kommen können. Da das Cytoplasma eine reduzierende Umgebung darstellt, war zudem auch denkbar, dass durch den Aufschluss der Zellen, wenn der Zellinhalt augenblicklich in die oxidierende Umgebung gelangt, das Protein in der jeweiligen Konformation durch Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen zwei Cysteinresten zu einem Cystin kovalent zusammengehalten wurde. Zweitens bestand die Möglichkeit, dass das Protein in aggregierter Form in sogenannten „inclusion bodies“ nach dem Aufschluss der Zellen in den Pellets zurückblieben. Aus diesen Gründen wurden die Zellen denaturierend mit Gu-HCl-Puffer aufgebrochen, womit die allfälligen „inclusion bodies“ solubilisiert wurden und das Protein in offener Konformation vorlag. Da die Proteine nun in denaturierter Form vorlagen, konnte logischerweise auch keine Isolation mittels Affinitätschromatographie an Lysin-Bio-Gel mehr ins Auge gefasst werden, weil die LBS der Kringel sicherlich nicht in nativer Form vorlagen. Deshalb wurden die pET-9a Konstrukte, die keinen „His-tag“ enthalten, nicht mehr weiterverfolgt und fortan wurde mit den beiden pQE-8 Konstrukten experimentiert. In Kleinansätzen konnten dank der Affinität des „His-tags“ an Ni^{2+} -Ionen schliesslich im Eluat einer solchen Chromatographie mehrere Peaks beobachtet werden. Da mehrere Peaks nahe beieinander vorhanden waren, musste auf mehrere Faltungszustände, d.h. verschiedene, durch den Aufschluss der Zellen verursachte Disulfidverknüpfungsmuster, geschlossen werden. Diese Annahme kann mit der Beobachtung untermauert werden, dass bei der Isolation von rekombinanten Kringeln aus *E. coli* vor der Zugabe von Reduktionsmitteln mehrere Peaks im RP-HPLC-Chromatogramm zu sehen sind, hingegen nach der Zugabe von DTT nur noch ein Peak vorhanden ist. Demnach führen verschiedene Verknüpfungen der Disulfidbrücken beim Aufschluss der Zellen zu unterschiedlichen Retentionszeiten im RP-HPLC-Chromatogramm.

Von den beiden rekombinanten schweren Ketten mit und ohne NTP in pQE-8 wurden Grossansätze in Angriff genommen, um mit mehr Material arbeiten zu können, was die Affinitätschromatographien wesentlich erleichterte. Die Zellysate wurden demnach über eine Ni^{2+} -Säule gereinigt, *in vitro* zurückgefaltet, über Lysin-Bio-Gel chromatographiert und nach der sauren Dialyse lyophilisiert. Dabei war der zweite Chromatographieschritt zugleich auch eine Art „physiologischer“ Funktionstest, der zeigte, ob das Protein intakte LBS in den Kringeldomänen enthält. Die Analyse der schweren Kette mit NTP mittels RP-HPLC zeigte einen einzelnen Peak im Chromatogramm, während im Chromatogramm des Konstrukts ohne NTP mehrere Peaks beobachtet werden konnten. Demnach schien das Protein mit

NTP in einer einzigen Konformation vorzuliegen, während sich bei jenem ohne NTP mehrere Faltungszustände zeigten. Allerdings mussten all diese Konformationen mindestens eine intakte LBS aufweisen, da sie sonst nicht an die Lysinmatrix gebunden hätten. Aufgrund dieses Unterschieds wurde die wichtige Rolle des NTP in der Stabilisierung der ganzen Struktur der schweren Kette deutlich, indem es die Rückfaltung *in vitro* in eine einzige Konformation begünstigte. Von Cockell *et al.* (1998) wurde ja gezeigt, dass das NTP mit der LBS des Kringels 5 interagiert und höchstwahrscheinlich durch diese Wechselwirkung die kompakte Struktur von Plasminogen in der inaktiven α -Konformation zustande kommt. Das Projekt der rekombinanten Expression der schweren Kette war demnach von grosser Wichtigkeit, weil dieses Postulat mit reinem markiertem Protein mittels NMR in Lösung eindeutig bewiesen oder widerlegt hätte werden können.

Aus diesen Ansätzen konnte allerdings nicht genügend reines Protein für eine Massenbestimmung mittels ESI-MS isoliert werden. Eine allfällige Toxizität des exprimierten Proteins konnte für die geringe Ausbeute als Grund eindeutig ausgeschlossen werden, weil dies zum Tod der Zellen geführt hätte. In diesen Experimenten konnte allerdings auch nach mehreren Stunden Expression noch eine Zunahme der Zelldichte beobachtet werden, wonach das akkumulierte Protein für den Wirt nicht toxisch sein konnte.

Die Sequenzierung des Proteins nach Edman zeigte zwar eine einzige Sequenz, die mit jener der schweren Kette mit und ohne NTP genau übereinstimmte, jedoch mahnten der Gehalt und die Analyse mittels „Immunoblotting“ zur Vorsicht. Der berechnete Gehalt war viel zu tief und zudem waren auf dem „Immunoblot“ mehrere Banden unterhalb der gesuchten Grösse zu beobachten. Demnach schien das Protein zwar vorhanden zu sein, jedoch in fragmentierter Form. Für eine Fragmentierung konnten mehrere Gründe verantwortlich sein: Erstens hätte sie durch die mehrere Tage dauernde Aufarbeitung zustande kommen können. Demnach wären proteolytische Prozesse während der Isolation, Chromatographie und Dialyse für die Fragmentierung verantwortlich gewesen. Zweitens hätte sie aber auch schon in den Zellen entstanden sein können. Hierfür kamen einerseits proteolytische Prozesse in der Zelle in Frage, andererseits aber auch der Umgang der prokaryontischen Translationsmaschinerie mit dem eukaryontischen Gen. Dabei könnte der „codon usage“ von *E. coli* eine Rolle gespielt haben wie auch die Sekundärstruktur der mRNA, die sich eventuell mit den prokaryontischen Translationsfaktoren und Ribosomen schlecht vertrug. Beides hätte zu einer frühzeitigen Termination der Translation geführt und demnach kürzere Fragmente produziert, wie sie im „Immunoblot“ nachgewiesen werden konnten. Je nach Sekundärstruktur der mRNA wäre auch eine reduzierte Initiation der Translation denkbar gewesen, die eine stark verminderte Ausbeute an rekombinantem Protein zur Folge gehabt hätte.

Zwar waren die proteolytischen Prozesse während der Aufarbeitung als Grund für die Fragmentierung eher unwahrscheinlich, da die Sequenzanalyse mittels Edman-Abbau auf Fragmente verschiedener Länge hindeutete, die alle mit dem N-Terminus begannen. Trotzdem wurde durch diverse Optimierungen versucht die Isolationsdauer auf ein Minimum zu beschränken, wobei die ganze Isolationsmethode schliesslich auf einen einzigen Tag verkürzt werden konnte und immer mit Proteaseinhibitoren gearbeitet wurde. Da die Resultate der Analyse von solchen „Eintagesisolationen“ mittels „Immunoblotting“, Gehaltsbestimmung und Edman-Abbau immer noch auf eine klare Fragmentierung hindeuteten, schien das Problem eher im Wirt lokalisiert und translatorischer Art oder durch die Struktur der mRNA bedingt zu sein.

In einem letzten Versuch beschränkte ich mich auf die Synthese der schweren Kette mit NTP, weil dabei aufgrund der obigen Erläuterungen die Chancen für ein in homogener Konformation vorliegendes Protein grösser schienen, als mit dem Konstrukt ohne NTP. Mit dem neuen Zellstamm SG13009[pREP4] konnte schliesslich genügend reines Protein isoliert werden, um ein interpretierbares Massenspektrum zu erhalten. Wiederum war die vorgängig bestimmte N-terminale Sequenz korrekt und eindeutig, die Gehaltsbestimmung und der „Immunoblot“ deuteten aber nach wie vor auf eine Fragmentierung hin. Im Massenspektrum konnte schliesslich ein sehr breiter Peak bei der gesuchten Grösse von 63 kDa gefunden werden. Allerdings waren zudem mehrere Peaks kleinerer Massen zwischen 10 und 30 kDa anwesend, wovon die zwei intensivsten Fragmente der rekombinanten schweren Kette von Plasminogen zugeordnet werden konnten. Das kleinere entsprach einem NTP-Fragment von Met⁻¹⁶ bis Leu⁷⁴, das grössere dem NTP mit dem ersten Kringel bis genau vor dem ersten Cystein des zweiten Kringels, entsprechend dem Fragment von Met⁻¹⁶ bis Glu¹⁶⁵. Die C-terminalen Aminosäuren waren demnach ein Leucin beziehungsweise eine Glutaminsäure, während die darauffolgenden Aminosäuren jeweils ein Phenylalanin respektive ein Cystein gewesen wären. Wenn man für die vier entsprechenden Codons UUA (Leu), UUU (Phe), GAA (Glu) und UGU (Cys) den „codon usage“ des Menschen mit jenem von *E. coli* verglich, handelte es sich hier keineswegs um sogenannte kritische Codons, die selten in *E. coli* benutzt werden und demnach zu einer frühzeitigen Termination führen konnten. Die Häufigkeit der vier Codons in *E. coli* K12 beträgt für UUA 13.9%, für UUU 22.4%,

für GAA 39.5% und für UGU 5.2%, während sie im *H. sapiens* 7.5%, 17.1%, 29.0% und 10.0% ausmachen. Einzig das Cysteinocodon mit einer auftretenden Häufigkeit von 5.2% könnte allenfalls kritisch gewesen sein, allerdings bleibt hier festzuhalten, dass vorgängig dieses Codon schon fünfmal erkannt wurde und zu keinem frühzeitigen Abbruch geführt hatte. Demnach scheint, dass die Expression der rekombinanten schweren Kette des hPg aufgrund der mRNA Sekundärstruktur problematisch gewesen sein könnte und zum frühzeitigen Abbruch der Translation an genau definierten Loci führte. Diese Annahme wird ferner durch die Resultate von Christen (2002) unterstützt. In seinen durchgeführten Experimenten wurde die Expression von rekombinantem K13 in *E. coli* angestrebt. Dabei konnte zwar das ganze Protein nachgewiesen werden, jedoch bestand das Material zu einem Drittel aus K1. Da auch in diesem Fall nur eine einzige N-terminale Sequenz nachgewiesen wurde, konnte die Fragmentierung keine Folge einer proteolytischen Degradation des Proteins während der Isolation sein. Vielmehr scheint auch hier der Grund in der 3-dimensionalen Struktur der mRNA zu liegen, die zu einer frühzeitigen Termination der Translation führt.

Da es sich bei Plasminogen um ein eukaryontisches Gen handelt, ist zu beachten, dass es im menschlichen Genom durch 18 Introns unterbrochen wird. Für diverse eukaryontische Proteine scheinen Introns die Expression deutlich zu beeinflussen und zu regulieren und sind keineswegs irgendwelche „Non-sense-Insertionen“ ohne jegliche Funktion [Le Hir *et al.* (2003)]. Die Introns können einen wichtigen Einfluss auf die Sekundärstruktur der mRNA haben und können sie durch assoziierte Proteine zugänglich machen oder für die Translation sperren. Interessant wäre nun zu wissen, was für eine Sekundärstruktur die in *E. coli* synthetisierte mRNA einnimmt, welche nicht aus einem Intron-enthaltenden Gen transkribiert wurde. Eine Möglichkeit wäre eine starke Sekundärstruktur, die in Eukaryonten durch die Introns und deren assoziierter Proteine gar nicht erst zustande käme und demnach in *E. coli* zu einer frühzeitigen Termination der Proteinsynthese führen würde. Dies bleiben allerdings nur Spekulationen und müssten im Detail auf der RNA-Ebene weitergehend analysiert werden.

Die Expression und Isolation von ^{15}N -markiertem NK1 erzielte beinahe 6 mg an reinem Protein aus einem l Kultur. Dabei war die Ausbeute an markiertem NK1 aus den in Minimalmedium gewachsenen Zellen sogar höher als jene an vorgängig hergestelltem, unmarkiertem Protein unter Verwendung von Vollmedium [vergleiche mit Douglas *et al.* (2002)]. Die höhere Ausbeute konnte vor allem auf die Verwendung von Ameisensäure statt Salzsäure während der sauren Dialyse nach der Reinigung mittels Lysin-Bio-Gel zurückgeführt werden. Von de Vos *et al.* (1992) konnte nämlich durch Zugabe von schon geringen Mengen an Chloridionen eine drastische Verminderung der Löslichkeit von einzelnen Kringeln nachgewiesen werden.

Das markierte NK1 wurde zur strukturellen Aufklärung und für weiterführende Bindungsstudien mittels NMR an die Gruppe M. Llinás in Pittsburgh, USA gesandt, während mit unmarkiertem Protein Bindungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt wurden. Dazu wurden Fluoreszenztitrationen mit dem Liganden 6-AHA in Wechselwirkung mit NK1 durchgeführt und mit Titrationskurven von K1 und NTP verglichen. Wie erwartet konnten für NK1 und K1 Sättigungskurven gemessen werden, die in einer normierten Darstellung nahe beieinander lagen. Die Messung mit NTP erreichte keine Sättigung, da auch mit grösseren Mengen an 6-AHA eher eine Gerade statt einer Sättigungskurve dargestellt werden konnte. Dies liess den Schluss zu, dass es sich um eine sehr schwache Wechselwirkung mit dem Liganden handelte, falls überhaupt eine vorhanden war. Um die Bindungskonstanten zu berechnen, wurden die Kurven nach Scatchard (1948) linearisiert. Das Bestimmtheitsmass R^2 der Trendlinien war im Falle von NK1 und K1 sehr nahe bei 1, womit es sich um sehr genaue Resultate handeln musste, während jenes von NTP viel schlechter abschnitt. Die Werte der jeweiligen Assoziationskonstanten K_a und Dissoziationskonstanten K_d konnten aus der Steigung der Trendlinien berechnet werden. Die K_a -Werte vom Liganden 6-AHA mit K1 und NK1 betrugen 56 beziehungsweise 40 mM^{-1} . Diese Werte sind zwar etwas kleiner als 74 respektive 64 mM^{-1} wie von von Haller (1999) bestimmt, jedoch sind sie in der gleichen Grössenordnung und liegen vergleichbar auseinander. Aus den Resultaten geht hervor, dass sich die Bindungskonstanten von K1 und NK1 nur unwesentlich unterscheiden. Im Gegensatz dazu konnte keine Wechselwirkung von 6-AHA mit NTP nachgewiesen werden, da der relativ ungenaue K_a -Wert $\sim 1 \text{ mM}^{-1}$ betrug. Aus den Messungen wird ersichtlich, dass das NTP nicht in die LBS des Kringels 1 bindet. Falls dies der Fall wäre, müsste sich die Bindungskonstante von NK1 in Wechselwirkung mit 6-AHA wesentlich von jener des Kringels 1 unterscheiden. Das NTP würde nämlich durch die Bindung in die LBS des Kringels 1 die Wechselwirkungseigenschaften mit dem Liganden 6-AHA verändern. Der daraus resultierende K_a -Wert müsste einiges kleiner sein als der experimentell bestimmte Wert. Aus diesem Grund ist nicht anzunehmen, dass Kringel 1 der hauptsächliche Wechselwirkungspartner des NTP in der α -Konformation von Plasminogen ist [Cockell *et al.* (1998); Ponting *et al.* (1992)].

6.2 *P. pastoris*

Verschiedene rekombinante Proteine wurden mit schon fast sensationellen Ausbeuten von mehreren g/l aus *P. pastoris* isoliert und charakterisiert. Sogar Kringeldomänen des t-PA, dem gewebsspezifischen Plasminogenaktivator, konnten in 100 mg-Mengen exprimiert und in reiner Form dargestellt werden [Nilsen *et al.* (1997)]. Damit schien *P. pastoris* auch ein geeignetes Expressionssystem für die Überexpression von Plasminogen zu sein.

Der molekularbiologische Teil in *E. coli* sowohl der schweren Kette als auch des ganzen Plasminogens verlief relativ problemlos. Einzig die Einführung der Mutationen mittels PCR war etwas schwierig, da teilweise mehrere Klone sequenziert werden mussten bis einer gefunden werden konnte, der die entsprechenden Mutationen trug. Dies scheint ein recht verbreitetes Problem zu sein, denn offenbar ist es immer lohnenswert mehrere Klone auf eine eingeführte Mutation zu überprüfen, bevor die Reaktion wiederholt wird. Diese Beobachtung wurde zudem vom Leiter der Microsynth GmbH Herrn T. Schmidheini (persönliche Mitteilung) bestätigt.

Die Selektion nach der Transformation in *P. pastoris* war langwierig und nicht sehr einfach. Denn vor allem bei der Selektion auf Geneticin-haltigen Platten musste besonders darauf geachtet werden, dass keine Agarstückchen vom Top-Agar mitgenommen wurden und man schliesslich falsch-positive Kolonien selektionierte. Die einzige Möglichkeit, um wirklich sicher zu gehen, dass die Kolonien auch tatsächlich das gesuchte Gen ins Genom rekombiniert hatten, war eine PCR von isolierter genomischer DNA. Allerdings ist dies eine materialintensive Methode und konnte daher leider längst nicht auf alle selektierten Klone angewendet werden.

Im Kleinansatz wurde versucht eine Überexpression der schweren Kette nachzuweisen, jedoch ohne Erfolg. Dank der Backgroundreferenz konnten jeweils gewisse vielversprechende Banden, die als rekombinant exprimiertes Protein in Frage gekommen wären, ausgeschlossen werden. Zudem konnte mit der Expressionsreferenz immer gezeigt werden, dass die Expressionsbedingungen gut waren und dies nicht der Grund für eine fehlende Expression sein konnte.

Es ist anzunehmen, dass durch diverse Optimierungsversuche eine minime Expression hätte erzielt werden können, wie dies schon bei *E. coli* der Fall gewesen war. Jedoch wurde aus zeitlichen Gründen darauf verzichtet, denn dies hätte keinen wesentlichen Fortschritt gegenüber der Expression in *E. coli* bedeutet. Zudem wäre wohl auch hier die strukturelle Untersuchung der mRNA von grossem Interesse, denn bei *P. pastoris* handelte es sich immerhin um ein eukaryontisches Expressionssystem. Zwar ist dieses lange nicht so ausgeklügelt wie jene aus höheren Eukaryonten, jedoch sind in verschiedenen Hefestämmen Gene mit Introns beschrieben worden, wonach auch in diesen Organismen eine Art „Intronmaschinerie“ vorhanden zu sein scheint.

Die Kleinansätze des ganzen rekombinanten hPg waren im Vergleich zur schweren Kette schon viel ergiebiger. In den meisten Pelletfraktionen wurde eine Bande auf der gesuchten Höhe gefunden. Die Grösse der intrazellulär exprimierten Proteine stimmte sehr gut mit den Erwartungen überein, und zwar mit der unglykosylierten Form. Allerdings waren die für die Sekretion bestimmten Proteine nicht im Medium zu finden, sondern waren ebenfalls in der Pelletfraktion akkumuliert. Für den Verbleib der Proteine in der Pelletfraktion kamen verschiedene Gründe in Frage: Erstens war es denkbar, dass die Proteine zwar in das ER exportiert worden waren, jedoch dort oder im Golgi-Apparat steckenblieben. Zweitens war es aufgrund struktureller Gegebenheiten während der Translation möglich, dass das synthetisierte Protein gar nicht erst exportiert wurde, sondern als intrazelluläres Protein akkumulierte. Die Grösse der exprimierten Proteine entsprach überdies nicht den ursprünglichen Erwartungen, sie waren nämlich etwa 10 kDa zu gross. Dies entsprach allerdings ziemlich genau der Grösse der N-terminalen Exportsequenz, die offenbar immer noch am Protein hing und nicht prozessiert worden war. Damit liess sich auf einfache Art und Weise die beobachtete Verschiebung zu grösserer Masse erklären.

Interessanterweise betrug in allen Fällen die optimale Expressionsdauer 60 Stunden, egal ob es sich um intrazelluläres oder für die Sekretion bestimmtes Protein handelte, sowie unabhängig vom Mut-Phänotyp. Allgemein blieb nach 60 Stunden das nachweisbare Protein mengenmässig nicht etwa gleich, sondern nahm eher ab, was auf einen eventuellen Abbau des Proteins hätte hindeuten können. Zwei Gründe kamen dafür in Frage: Erstens handelte es sich bei dem exprimierten hPg um ein vom Wirt nicht verwendetes Protein, welches möglicherweise im normalen „turnover“ der Zelle abgebaut würde. Zweitens war das Protein eventuell „falsch“ gefaltet oder wurde zumindest als nicht-

korrekt gefaltetes Protein vom Wirt erkannt, was ebenfalls zu einer sukzessiven Degradation des Produkts durch die Zelle geführt hätte.

Die Theorie des „falsch“ gefalteten Proteins, das in einer nicht dem nativen Plasminogen entsprechenden Konformation vorlag, könnte der wahrscheinliche Grund sein. Aus den Kleinansätzen sowie aus einem Grossansatz konnte nämlich nie rekombinantes hPg mittels Lysinaffinität isoliert werden oder zumindest nicht in nachweisbaren Mengen. Dies bedeutete, dass entweder zu wenig Protein vorhanden war oder aber die LBS der Kringel kein Lysin binden konnten, weil sie nicht in der richtigen Konformation vorlagen. Falls in Zukunft die Proteinexpression wohl gesteigert werden könnte, aber das Protein tatsächlich falsch gefaltet wäre und eine Rückfaltung nötig würde, fielen die ganzen Vorteile von *P. pastoris* gegenüber *E. coli* dahin. Einer der wichtigsten Vorteile von *P. pastoris* ist nämlich die Expression sehr vieler Proteine in ihrer nativen Konformation, weshalb auch in unserem Labor Versuche mit diesem Organismus begonnen wurden.

Die ersten Versuche zur Expression von grösseren Mengen ExNK1, ExNK13 und ExK45 aus *P. pastoris* verliefen zunächst vielversprechend. Sowohl für ExNK1 als auch in geringeren Mengen für ExK45 konnte das gewünschte Protein in sekretierter Form im Medium mittels „Immunoblotting“ nachgewiesen werden, während keine Expression von ExNK13 beobachtet wurde. Dies stimmte mit bereits getätigten Vorversuchen im kleinen Massstab überein. Nach der Reinigung konnte allerdings im Falle von ExK45 nicht genügend Protein isoliert werden, um eine genauere Analyse durchführen zu können. Zudem schien das isolierte Material aufgrund des RP-HPLC Chromatogramms inhomogen, d.h. möglicherweise fragmentiert zu sein. Diese Beobachtung war in voller Übereinstimmung mit schon früher durchgeführten Experimenten zur Expression von rekombinantem K45 aus *E. coli* [Moshfegh (1993)]. Auch hier konnten im RP-HPLC-Chromatogramm verschiedene Peaks beobachtet werden, die allerdings genauer analysiert werden konnten. Während Kringel 4 richtig gefaltet war und demnach die an Lysin-Bio-Gel bindende Einheit darstellte, bestand Kringel 5 aus mehreren Fragmenten, die am C-Terminus verschieden lang waren. Ähnliche Resultate wurden auch von P. Lachat (unpubliziert) erhalten, in welchen zwar eindeutig das ganze K45 Protein vorhanden war, jedoch zwei weitere am C-Terminus verkürzte Fragmente mitisoliert wurden. Weder die Verwendung von Proteaseinhibitoren noch der Einsatz von sogenannten „codon plus“ Expressionszellen lieferten bessere Resultate. Diese Zellen enthalten höhere Mengen an selten verwendeten tRNA, womit eine frühzeitige Termination der Translation durch den „codon usage“ von *E. coli* verhindert wird und somit auch menschliche Gene besser exprimiert werden sollten. Demnach scheint auch hier die dreidimensionale Struktur der mRNA wiederum die entscheidende Rolle in der Expression von K45 zu spielen, wie dies auch für die schwere Kette gezeigt werden konnte.

Im Falle von ExNK1 konnte hingegen ein einziger Peak im RP-HPLC beobachtet und etwa 100 µg Protein isoliert werden. Jedoch konnten hauptsächlich zwei Massen aus dem Massenspektrum identifiziert sowie zwei N-terminale Sequenzen bestimmt werden, so dass das lyophilisierte Material aus zwei leicht verschieden langen K1-Fragmenten bestand. Der Immunnachweis des Lyophilisats zeigte eine breite Bande etwas oberhalb von 10 kDa entsprechend den beiden K1-Fragmenten aus dem Massenspektrum. Da auf dem „Immunoblot“ unmittelbar nach der 60-stündigen Expression eine Bande bei 25 kDa nachgewiesen werden konnte, musste zu diesem Zeitpunkt das Protein NK1 noch völlig intakt gewesen sein. Demnach musste die Fragmentierung des intakt exprimierten NK1 während der Isolation geschehen sein. Da im Massenspektrum zudem keine Masse einem NTP-Fragment zugeordnet werden konnte, musste die Fragmentierung vor der Affinitätschromatographischen Reinigung mittels Lysin-Bio-Gel erfolgt sein, weil auf einer solchen Säule nur das K1- jedoch nicht das NTP-Fragment bindet. Aus diesem Grund musste die Fragmentierung während der Dialyse in Natriumphosphatpuffer mit einem pH von 8.5 aufgetreten sein; der einzige Aufarbeitungsschritt zwischen Expression und Affinitätschromatographie. Aufgrund dieser Erkenntnis müsste das Experiment nochmals unter Einsatz von Proteaseinhibitoren während der Dialyse des Mediums wiederholt werden.

Solche Fragmentierungsprobleme während der Isolation von NK1 konnten in *E. coli* nie beobachtet werden. Im *E. coli* Protokoll wurden sogar zwei Affinitätschromatographien durchgeführt, während im Falle von *P. pastoris* nur eine angewandt wurde und somit das Protein in weniger Zeit isoliert werden konnte. Allerdings gab es einen wichtigen Unterschied am Anfang der ganzen Isolationsprozedur: NK1 wurde mittels starkem Denaturierungspuffer aus den *E. coli* Zellen über Nacht isoliert, während im Falle von *P. pastoris* das Protein schon im Medium vorhanden war und demnach nur noch mit Natriumphosphatpuffer während 3 Tagen dialysiert werden musste. Da die Isolation aus *E. coli* mit denaturierendem Puffer und während kurzer Zeit durchgeführt wurde, war eine proteolytische Aktivität praktisch ausgeschlossen. Hingegen wurde NK1 aus *P. pastoris* während relativ langer Zeit mit einem Puffer dialysiert, in welchem proteolytische Aktivität durchaus möglich war, trotz der Durchführung der Dialyse bei 4°C. Demnach sollte die Dialyse von NK1 aus *P. pastoris* unbedingt unter Zusatz von Proteaseinhibitoren erfolgen.

6.3 Vergleich zwischen *E. coli* und *P. pastoris*

Die Vorteile von *E. coli* sind die einfache Handhabung der Bakterien, die wenig Zeit, Material, sowie Geld erfordert und trotzdem zu sehr guten Resultaten bezüglich der Expression von Proteinen führen kann. Allerdings stiess man mit etlichen Proteinen an die Grenzen des Machbaren in diesem Organismus. Ein Beispiel ist die versuchte Expression von Plasminogen durch Gonzalez-Gronow *et al.* (1990), die zwar Material isolieren konnten, das jedoch keinerlei vergleichbare physiologische Aktivität mit hPg aus Blutplasma zeigte, obwohl eine Bindung an Lysin-Sepharose nachweisbar gewesen war. Die Analyse des isolierten Produkts hatte allerdings mehrere Banden auf einem SDS-PAGE gezeigt, was mit meinen Beobachtungen der durchgeführten Experimente mit der schweren Kette, die in *E. coli* exprimiert worden waren, im Einklang stand.

Das *in vitro* Experiment, in welchem versucht wurde die schwere Kette in *E. coli* Lysat und Reticulocytenslysate zu exprimieren, zeigte sehr deutlich den Vorteil des höheren eukaryontischen Expressionssystems gegenüber dem prokaryontischen auf. In *E. coli* waren einmal mehr etliche relativ intensive Banden zu sehen, was sehr gut mit den sonst gemachten Erfahrungen bezüglich der Expression in *E. coli* übereinstimmte, bei welchen auch immer mehrere Banden immunologisch nachgewiesen werden konnten. Hingegen zeigte die Expression im Reticulocytensystem eine einzige intensive Bande auf der gesuchten Höhe. Dies stimmt sehr gut mit publizierten Erfahrungen überein, denn Plasminogen wurde schon in mehreren höheren eukaryontischen Systemen erfolgreich exprimiert [Whitefleet-Smith *et al.* (1989); Gonzalez-Gronow *et al.* (1990); Azuma *et al.* (1997); Nilsen und Castellino (1999)]. Diese umfassen COS Zellen aus Säugern, *Drosophila Schneider* S2 Zellen und Baculoviren-infizierte *Spodoptera frugiperda* Insektenzellen. In *Drosophila* Zellen ist es nun gelungen ein stabil exprimierendes System zu konstruieren, in welchem aus 1 l Medium etwa 10 mg physiologisch aktives Protein isoliert werden können [Nilsen und Castellino (1999)].

Mit *P. pastoris* hat man ein eukaryontisches System mit vielen Vorteilen eines prokaryontischen Systems. Die Handhabung ist nicht viel schwieriger als jene von *E. coli*, allerdings dauern aufgrund des langsameren Wachstums viele Prozeduren meistens einiges länger. Zudem ist die Klonierung materialintensiver sowie umständlicher und demnach auch etwas teurer. Allerdings hat *P. pastoris* auch viele Vorteile der höheren eukaryontischen Systeme. Die Proteine können normalerweise ohne weiteres in korrekter Konformation ins Medium sekretiert werden. Für physiologische Experimente ist es zudem auch wichtig, dass eine Glykosylierung stattfindet, die von *P. pastoris* auch häufig bewerkstelligt wird. In meinen Experimenten war dies allerdings nicht erwünscht und die hauptsächlich Glykosylierungsstellen mussten mutiert werden. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber den höheren eukaryontischen Systemen ist zudem die sehr einfache Markierung von Proteinen, indem die methylotrophe Hefe *P. pastoris* mit markiertem Methanol als einziger Kohlenstoffquelle auskommt. Dies wäre sogar ein wesentlicher Vorteil gegenüber *E. coli*, da diese Prokaryonten mit markierter Glucose supplementiert werden müssen, die ihrerseits einiges teurer als markiertes Methanol ist. Ein weiterer Vorteil des Hefesystems ist, dass es in höheren eukaryontischen Expressionssystemen sehr oft nicht einfach ist, eine stabil exprimierende Zelllinie zu selektionieren, was bei *P. pastoris* jedoch praktisch immer der Fall ist.

Aus den durchgeführten Experimenten, vor allem aber mit NK1 geht hervor, dass bis anhin für die Expression von kleinen rekombinanten Konstrukten aus hPg *E. coli* im Vergleich zu *P. pastoris* den eindeutig ergiebigeren Organismus darstellt. Wenn man nämlich die eingesetzte Menge an Material und Medien in Betracht zieht, kann nach dem in dieser Arbeit dargestellten Stand der Dinge aus *P. pastoris* viel weniger Protein als aus *E. coli* isoliert werden. Dies obwohl man bei *P. pastoris* keine Rückfaltung durchführen muss, bei welcher immer recht viel Protein verloren geht. Während die markierte Expression von NK1 in *E. coli* sehr erfolgreich verlief, müssten noch weitere Experimente in *P. pastoris* durchgeführt werden, insbesondere die oben erwähnte Anwendung von Proteaseinhibitoren ausprobiert werden, bevor eine Expression in ^{15}N und ^{13}C markiertem Minimalmedium ins Auge gefasst werden könnte.

Die gemachten Erfahrungen lassen aber den Schluss zu, dass die Überexpression von Fragmenten von hPg desto schwieriger wird, je grösser die Konstrukte sind. Während einzelne Kringel sowie das NTP relativ problemlos in *E. coli* exprimiert werden können, gerät man mit rekombinanten Multidomänen von hPg bald an die Grenzen dieses Organismus. Der Grund scheint eindeutig in der Sekundärstruktur der mRNA zu liegen, die in *E. coli* offensichtlich zur frühzeitigen Termination der Translation führt, wie dies für K13 [Christen (2002)], K45 [Moshfegh (1993)] und NK15 der Fall ist. Im Fall von NK1 sowie allgemein mit Fragmenten, die das NTP enthalten, ist der Grund der Fragmentierung nicht etwa in der Sekundärstruktur der mRNA zu suchen, sondern geschieht viel mehr durch proteolytische

oder säureinduzierte Degradation, wie mit ExNK1 aus *P. pastoris* gezeigt. Da es sich mit der Scharnierregion des NTP um eine „Sollbruchstelle“ handelt, ist es nicht verwunderlich, dass diese Region allgemein zu den labilsten des hPg gehört und demnach dort Spaltungen auftreten können. Aus den Experimenten mit rekombinantem hPg in *P. pastoris* geht hervor, dass in diesem Organismus eine Expression immerhin möglich ist, wenn auch in geringen Mengen. Das exprimierte hPg ist keinesfalls fragmentiert und könnte wahrscheinlich nach verschiedenen Optimierungen als intaktes Protein isoliert werden. Demnach scheint die Sekundärstruktur der mRNA in *P. pastoris* kein unüberwindbares Hindernis darzustellen, während sie bei der schweren Kette, hPg [Gonzalez-Gronow *et al.* (1990)], K13 [Christen (2002)] sowie K45 [Moshfegh (1993)] *E. coli* vor unlösbare Probleme stellt und zur frühzeitigen Termination der Translation führt.

6.4 Ausblick

Aufgrund der gemachten Erfahrungen und den publizierten Daten von Gonzalez-Gronow *et al.* (1990) wird es kaum möglich sein, dass in *E. coli* das Ziel von grösseren Mengen an rekombinantem hPg in reiner, unfragmentierter Form je erreicht werden kann. In *P. pastoris* hingegen ist das Potential sicherlich noch nicht ausgeschöpft. Wichtig wäre allerdings zunächst einmal eine genauere Analyse der Struktur der mRNA. Je nachdem wie die Sekundärstruktur aussieht, müssten dann stille Mutationen eingeführt werden, um die Struktur der mRNA zu verändern, ohne jedoch die Proteinsequenz zu tangieren. Als weiteren Versuch könnte man sich durchaus vorstellen, einen Intron-enthaltenden Vektor zur Expression zu benutzen [Melcher *et al.* (2002); Marklund *et al.* (2002)]. Beispielsweise konnte von Melcher *et al.* (2002) in CHO Zellen gezeigt werden, dass verschiedene rekombinante Proteine mit einer direkt dem eigentlichen rekombinanten Gen vorgeschalteten 5'-Intronsequenz eine bis zu 30-mal höhere Expression zeigten, als in Abwesenheit des Introns. Zudem konnten Lumberras *et al.* (1998) in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, ein niederer Eukaryont, der auch als „grüne Hefe“ bezeichnet wird, ebenfalls eine fünf bis zwanzigfache Steigerung der Expression eines rekombinanten Gens nachweisen, falls die erste 5'-Intronsequenz des in der Alge vorkommenden *RBCS2*-Gens an das 5'-Ende fusioniert wurde. Ob ein derart dramatischer Effekt auch bei *P. pastoris* eintreten könnte, ist durchaus nicht auszuschliessen. Allerdings konnte ich bis heute keine Intron-enthaltenden Vektoren für Hefesysteme finden, geschweige denn auf *P. pastoris* zugeschnittene. Demnach müsste ein massgeschneiderter Vektor zuerst kloniert und mit den nötigen Sequenzen ausgestattet werden. Als drittes weiterführendes Experiment wäre sicherlich eine Expression des natürlich vorkommenden Gens für hPg auszuprobieren, welches 18 Introns enthält. Allerdings ist das Gen mit den Introns 51'055 Basenpaare lang und ist mit den hier verwendeten Vektoren sicherlich nicht in *P. pastoris* klonierbar. Dazu müsste man auf andere Vektorsysteme zurückgreifen, die ebenfalls nicht für diesen Hefestamm optimiert sind. Aufgrund der Beobachtung, dass 5'-vorgelagerte Introns sowie auch das erste Intron eines natürlich vorkommenden Gens sehr häufig die Translationseffizienz beträchtlich beeinflussen können [Le Hir *et al.* (2003)], wäre es vielleicht ratsam, eine Expression der cDNA von hPg auszuprobieren, die das erste Intron enthält. Von der Grösse her wäre das durchaus mit den hier verwendeten Vektoren machbar. Falls es dann gelingen würde einige mg Protein zu gewinnen, müsste sicherlich ein „Up-scaling“ in Fermentern stattfinden, wobei dies entsprechend viel neues „know-how“ erfordert.

Eine Expression in einem höheren eukaryontischen System, am besten in *Drosophila* Zellen, wäre durchaus auch ein Versuch wert. Immerhin wurde die cDNA erfolgreich in diesem System exprimiert. Mit der konstruierten DNA, die zwei mutierten Glykosylierungsstellen und die inaktivierte katalytische Triade enthaltend, sollte im Idealfall reines, unglykosyliertes, rekombinantes hPg exprimiert werden können. Allenfalls könnte man die dritte Glykosylierungsstelle der Vollständigkeit halber auch noch zu Alanin mutieren, damit ganz sicher keine Glykosylierung auftreten kann. Allerdings wäre dieses Material in reiner Form nur für Kristallisationsexperimente mit anschliessender Strukturaufklärung mittels Röntgendiffraktion geeignet, weil das Material nicht markiert wäre. Demnach wären keinerlei Resultate zu erwarten, wenn das Protein nicht kristallisierbar ist. Für strukturelle Studien mittels NMR in Lösung bedarf es aber grössere Mengen Protein in markierter Form. Im Anbetracht der Grösse von Plasminogen müsste sicherlich mit ^{15}N und ^{13}C markiert werden, um strukturelle Daten zu erhalten. Zudem könnten mit NMR die verschiedenen postulierten Konformationen von hPg genauer bestimmt werden, was mittels Röntgendiffraktion kaum möglich ist. Wie jedoch das Problem der Markierung in *Drosophila* oder allgemein in höheren eukaryontischen Expressionssystemen bewerkstelligt werden kann, ist eine schwierige und kaum lösbare Aufgabe. Zur Zeit sind keine zur Markierung geeigneten Minimalmedien für Insektenzellen oder höhere Zelllinien erhältlich. Jedenfalls wäre dies sicherlich eine teure Angelegenheit, viel teurer als in *E. coli* und *P. pastoris*.

7 Zusammenfassung

Plasminogen ist die Hauptkomponente der Fibrinolyse und ist in aktivierter Form für die Auflösung von Fibrin verantwortlich. Damit keine Überreaktion stattfindet, sind die Blutkoagulation und die Fibrinolyse durch ein vernetztes System von Aktivatoren und Inhibitoren reguliert, welche die beiden Reaktionsabläufe im Gleichgewicht halten. Seit der Entdeckung des Plasminogens als fibrinolytische Serinprotease konnte zudem dessen Beteiligung an verschiedenen weiteren Prozessen wie der Zellmigration und der Angiogenese im Körper nachgewiesen werden, sowie eventuell sogar ein Mitwirken am Krankheitsbild der übertragbaren spongiformen Enzephalopathien.

Durch die Bindung von Plasminogen an Fibrin, Zelloberflächen oder Liganden, mit Hilfe der Lysinbindungsstellen, findet eine Konformationsänderung von der kompakten α -Konformation zur offenen β -Konformation statt. Dadurch wird die Plasminogenaktivierungsstelle, die Bindung zwischen Arg⁵⁶¹ und Val⁵⁶², für verschiedene Enzyme zugänglich, welche diese Peptidbindung hydrolytisch spalten und aktives Plasmin freisetzen. Nebst dieser Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin können aus den sogenannten Glu-Formen durch Autoproteolyse zwischen Lys⁷⁷ und Lys⁷⁸ die Lys-Formen entstehen, wobei das sogenannte N-terminale Peptid freigesetzt wird. Bei der Generierung von Plasmin bleiben die leichte und die schwere Kette miteinander über zwei der insgesamt 24 Disulfidbrücken kovalent verbunden. Die schwere Kette umfasst demnach die fünf Kringeldomänen (K1 - K5), die für die Bindung an das Substrat verantwortlich sind. Die Bindung kommt durch eine Wechselwirkung der Lysinbindungsstellen mit Lysinresten des Substrats zustande, wobei nicht alle eine gleich starke Affinität zeigen. Die Reihenfolge ist K1 > K4 > K5 > K2, während bei K3, aufgrund einer nicht funktionellen Lysinbindungsstelle, keine Affinität nachzuweisen ist. Die leichte Kette besteht aus der Serinproteasedomäne, die mit einer katalytischen Triade, in ähnlichem Muster wie bei Chymotrypsin, ausgestattet ist.

Um strukturelle Untersuchungen mit Plasminogen durchführen und dessen Eigenschaften genauer untersuchen zu können, wurden schon mehrere Fragmente hergestellt, entweder rekombinant oder durch limitierte Proteolyse. Zu den rekombinanten Fragmenten gehören unter anderem das N-terminale Peptid sowie die fünf Kringeldomänen, die alle als einzelne Kringel oder als Multikringeldomänen exprimiert werden konnten. Hingegen Miniplasminogen bestehend aus Kringel 5 und der Serinproteasedomäne sowie Mikroplasminogen, welches der Serinproteasedomäne entspricht, konnten proteolytisch generiert werden. Durch Mutationsstudien der Lysinbindungsstellen der Kringel konnten wesentliche Erkenntnisse betreffend der Anordnung der Aminosäuren in der Bindungstasche gewonnen werden.

Die dreidimensionale Struktur vom ganzen humanen Plasminogen ist allerdings weiterhin unbekannt. Bisher konnten nur physiologische Daten von rekombinantem Plasminogen gewonnen werden sowie durch Elektronenmikroskopie und Bindungsstudien eine dreidimensionale Anordnung der α -Konformation postuliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die schwere Kette, sowie das ganze humane Plasminogen rekombinant in unglykosylierter Form zu exprimieren, damit die Struktur mittels NMR und Röntgendiffraktion gelöst werden könnte. Mit beiden Konstrukten könnte zudem durch Bindungsstudien eindeutig ermittelt werden, welche Lysinbindungsstelle mit welchem Lysin interagiert und für die kompakte α -Konformation des Plasminogens verantwortlich ist.

Zunächst wurde versucht die schwere Kette mit und ohne N-terminales Peptid in zwei verschiedenen *E. coli* Expressionssystemen mit den pQE-8 und pET-9a Vektoren zu exprimieren. Mit dem pQE-8 Vektor war eine Isolation mittels Ni²⁺-Affinität eines coexprimierten „His-tags“, sowie mittels Lysinaffinität der Lysinbindungsstellen möglich, während pET-9a Konstrukte nur über Lysinaffinität isoliert werden konnten. Aus einer pQE-8 Expression der schweren Kette mit N-terminalem Peptid konnte schliesslich genügend reines Material hergestellt werden, um zumindest eine analytische Charakterisierung des exprimierten Proteins durchführen zu können. Dabei wurde eine Fragmentierung des Proteins festgestellt, wobei aber alle Fragmente mit dem gleichen N-Terminus begannen. Demnach erschien es am wahrscheinlichsten, dass die Fragmentierung durch eine für *E. coli* inkompatible Sekundärstruktur der mRNA verursacht wurde, die zu einer frühzeitigen Termination der Proteinsynthese führte. Diese Theorie konnte durch in unserer Gruppe bereits gemachte Beobachtungen mit den Konstrukten K13 und K45 eindeutig untermauert werden. Mit den pET-9a Vektoren wurden zudem *in vitro* Expressionen mit *E. coli* Lysat und Reticulocytenlysate entsprechend prokaryontischer und eukaryontischer Transkriptions- / Translationsmaschinerie durchgeführt. Das *E. coli* System führte zwar zu einer Bande auf der richtigen Höhe, jedoch auch zu weiteren intensiven Banden mit tieferem Molekulargewicht, so dass von einer Fragmentierung ausgegangen werden musste. Im eukaryontischen System war

hingegen eine einzige Bande auf der richtigen Höhe vorzufinden. Diese Beobachtungen korrelierten sehr gut mit publizierten Daten von rekombinant exprimiertem humanem Plasminogen.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde versucht, die schwere Kette des humanen Plasminogens mit dem N-terminalen Peptid im *P. pastoris* Expressionssystem herzustellen, da dieser Organismus ein Eukaryont ist und demnach vielleicht besser mit der mRNA-Struktur umgehen kann. Allerdings war aus Kleinansätzen keine Expression des rekombinanten Proteins festzustellen, weder aus schnell und langsam Methanol-metabolisierenden Zellen, noch in intrazellulärer oder sekretierter Form.

Parallel dazu wurde auch das ganze humane Plasminogen in die pPIC3.5K- und pPIC9K-Vektoren für intrazelluläre oder sekretorische Expression kloniert. Die konstruierten Gene wurden schliesslich in GS115 und KM71 *P. pastoris* Zellen rekombiniert, entsprechend schnellem und langsamem Wachstum in Methanol-Minimalmedien. In allen vier Varianten konnte, im Gegensatz zu Versuchen mit der schweren Kette, in Kleinansätzen eine Expression nachgewiesen werden. Bei den intrazellulär exprimierten Proteinen konnte aus den Pellets eine Bande auf der richtigen Höhe immunologisch nachgewiesen werden, während im Überstand der sekretorisch exprimierten Proteine nichts zu finden war. Trotz Exportsequenz hatte keine Sekretion stattgefunden. Diese Zellen hatten die Proteine jedoch intrazellulär akkumuliert und konnten immunologisch als etwa 10 kDa höhere Banden, als dies bei den intrazellulären Expressionen der Fall war, nachgewiesen werden. Der Masseunterschied rührte von der N-terminal immer noch vorhandenen Exportsequenz her. Demnach schien *P. pastoris* zumindest im Fall des ganzen Plasminogens keine Probleme bezüglich frühzeitiger Termination der Translation durch die Sekundärstruktur der mRNA gehabt zu haben, wie dies bei verschiedenen Konstrukten in *E. coli* beobachtet worden war.

Als weiteres Projekt wurde das Konstrukt NK1, entsprechend dem N-terminalen Peptid mit dem ersten Kringel von humanem Plasminogen, in *E. coli* und *P. pastoris* exprimiert, isoliert und charakterisiert. Aus dem prokaryontischen System liess sich reines und intaktes Protein isolieren, während das Hefesystem zwar das Protein exprimierte, jedoch die Reinigung zu einer Fragmentierung durch Spaltung in der Scharnierregion führte. Aufgrund der hohen Ausbeute in *E. coli* wurde eine markierte Expression in diesem Expressionssystem angesetzt. Im Vergleich zu früheren in unserer Gruppe durchgeführten Expressionen in Vollmedien konnte die Ausbeute an markiertem Protein in Minimalmedium durch Optimierungen weiter gesteigert werden. Damit zeigte sich die Überlegenheit von *E. coli* im Vergleich zu *P. pastoris* für die Expression von NK1 sehr deutlich, obwohl das Potential der methylotrophen Hefe sicherlich noch nicht ausgeschöpft ist und die Anwendung weiterer isolationstechnischer Methoden zu reinem sowie intaktem Protein führen könnten.

Die Fluoreszenztitration von NK1 mit dem Ligand 6-AHA wurde mit jener von K1 verglichen. Die berechneten Assoziationskonstanten waren durchaus vergleichbar, jedoch lagen sie etwas tiefer als in vorgängigen Experimenten. Aus den Messungen konnte kein Einfluss des NTP auf die Wechselwirkung des Kringels 1 mit dem Liganden 6-AHA festgestellt werden, womit auch eine wichtige Rolle einer solchen Wechselwirkung in der kompakten α -Konformation des Plasminogens ausgeschlossen werden konnte.

Auch das Konstrukt K45, entsprechend den Kringeln 4 und 5, wurde in *P. pastoris* exprimiert und isoliert, jedoch mit weniger Erfolg als mit NK1. Zwar konnte die Expression von K45 nachgewiesen werden, jedoch war die Ausbeute nach der Reinigung zu gering, um eine detaillierte Analyse des Proteins durchführen zu können. Das erhaltene RP-HPLC-Chromatogramm liess allerdings auf eine Fragmentierung schliessen, wie sie schon für in *E. coli* exprimierten K45 aus früheren Experimenten in unserer Gruppe beobachtet worden war.

Eine Expression von NK13 in *P. pastoris*, entsprechend dem N-terminalen Peptid mit den ersten drei Kringeln, blieb ohne Erfolg.

Demnach scheint *E. coli* ein ideales System für die Expression von kleinen Konstrukten von humanem Plasminogen zu sein, jedoch ist das Potential für die Expression von Multidomänen des Plasminogens aufgrund der Probleme mit der Sekundärstruktur der mRNA offensichtlich ausgeschöpft. Bei *P. pastoris* ist es jedoch nicht sicher, ob in diesem System wirklich keine grösseren Mengen von Plasminogen und verschiedener Domänen hergestellt werden können als hier gezeigt. Da das Hefesystem aber noch längst nicht ausgeschöpft ist, müssten weiterreichende Untersuchungen über das Expressionsverhalten von *P. pastoris* durchgeführt werden.

8 Referenzen

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S. (1997). Cellular and molecular immunology. **W. B. Saunders Co. Third Edition.**
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1994). Molecular biology of the cell. **Garland Publishing Inc. Third Edition.**
3. An, S.S., Carreno, C., Marti, D.N., Schaller, J., Albericio, F., and Llinás, M. (1998a). Lysine-50 is a likely site for anchoring the plasminogen N-terminal peptide to lysine-binding kringle. **Protein Sci.** 7, 1960-1969.
4. An, S.S., Marti, D.N., Carreño, C., Albericio, F., Schaller, J., and Llinás, M. (1998b). Structural/functional properties of the Glu¹-HSer⁵⁷ N-terminal fragment of human plasminogen: conformational characterization and interaction with kringle domains. **Protein Sci.** 7, 1947-1959.
5. Azuma, H., Mima, N., Shirakawa, M., Miyamoto, K., Yamaguchi, H., Mitsui, T., Shigekiyo, T., and Saito, S. (1997). Molecular pathogenesis of type I congenital plasminogen deficiency: expression of recombinant human mutant plasminogens in mammalian cells. **Blood** 89, 183-190.
6. Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10, 411-421.
7. Bangert, K., Johnsen, A.H., Christensen, U., and Thorsen, S. (1993). Different N-terminal forms of α_2 -plasmin inhibitor in human plasma. **Biochem. J.** 291 (Pt 2), 623-625.
8. Basham, M.E. and Seeds, N.W. (2001). Plasminogen expression in the neonatal and adult mouse brain. **J. Neurochem.** 77, 318-325.
9. Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., and Tarvin, T.L. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. **J. Chromatogr.** 336, 93-104.
10. Blomback, B. and Blomback, M. (1972). The molecular structure of fibrinogen. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 202, 77-97.
11. Bretthauer, R.K. and Castellino, F.J. (1999). Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 30 (Pt 3), 193-200.
12. Brown, D.R., Clive, C., and Haswell, S.J. (2001). Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. **J. Neurochem.** 76, 69-76.
13. Brown, D.R., Hafiz, F., Glasssmith, L.L., Wong, B.S., Jones, I.M., Clive, C., and Haswell, S.J. (2000). Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance. **EMBO J.** 19, 1180-1186.
14. Broze, G.J., Jr., Girard, T.J., and Novotny, W.F. (1990). Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. **Biochemistry** 29, 7539-7546.
15. Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. **BioTechniques** 5, 376-379.
16. Bürgin, J. and Schaller, J. (1999). Expression, isolation and characterization of a mutated human plasminogen kringle 3 with a functional lysine binding site. **Cell Mol. Life Sci.** 55, 135-141.
17. Cao, Y., Chen, A., An, S.S., Ji, R.W., Davidson, D., and Llinás, M. (1997). Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. **J. Biol. Chem.** 272, 22924-22928.
18. Cao, Y., Ji, R.W., Davidson, D., Schaller, J., Marti, D., Söndel, S., McCance, S.G., O'Reilly, M.S., Llinás, M., and Folkman, J. (1996). Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. **J. Biol. Chem.** 271, 29461-29467.
19. Castellino, F.J. and Powell, J.R. (1981). Human plasminogen. **Methods Enzymol.** 80 (Pt C), 365-378.
20. Chang, Y., Mochalkin, I., McCance, S.G., Cheng, B., Tulinsky, A., and Castellino, F.J. (1998). Structure and ligand binding determinants of the recombinant kringle 5 domain of human plasminogen. **Biochemistry** 37, 3258-3271.
21. Christen, M.T. (2002). The kringle 1-3 multidomain of various plasminogen species: isolation from plasma, expression in *E. coli* and mutagenesis. **Diplomarbeit, Universität Bern.**
22. Christensen, S., Valnickova, Z., Thøgersen, I.B., Olsen, E.H., and Enghild, J.J. (1997). Assignment of a single disulphide bridge in human α_2 -antiplasmin: implications for the structural and functional properties. **Biochem. J.** 323 (Pt 3), 847-852.

23. Cockell, C.S., Marshall, J.M., Dawson, K.M., Cederholm-Williams, S.A., and Ponting, C.P. (1998). Evidence that the conformation of unliganded human plasminogen is maintained via an intramolecular interaction between the lysine-binding site of kringle 5 and the N-terminal peptide. **Biochem. J.** 333 (Pt 1), 99-105.
24. Cohen, F.E. and Prusiner, S.B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. **Annu. Rev. Biochem.** 67, 793-819.
25. Collen, D. (2001). Ham-Wasserman lecture: role of the plasminogen system in fibrin-homeostasis and tissue remodeling. **Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.)** 1-9.
26. Cregg, J.M., Barringer, K.J., Hessler, A.Y., and Madden, K.R. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Mol. Cell Biol.** 5, 3376-3385.
27. Davanloo, P., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1984). Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 81, 2035-2039.
28. Davie, E.W., Fujikawa, K., and Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry** 30, 10363-10370.
29. Davie, E.W., Fujikawa, K., Kurachi, K., and Kisiel, W. (1979). The role of serine proteases in the blood coagulation cascade. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** 48, 277-318.
30. de Vos, A.M., Ultsch, M.H., Kelley, R.F., Padmanabhan, K., Tulinsky, A., Westbrook, M.L., and Kossiakoff, A.A. (1992). Crystal structure of the kringle 2 domain of tissue plasminogen activator at 2.4-Å resolution. **Biochemistry** 31, 270-279.
31. Di Scipio, R.G., Kurachi, K., and Davie, E.W. (1978). Activation of human factor IX (Christmas factor). **J. Clin. Invest.** 61, 1528-1538.
32. Dickinson, J.L., Bates, E.J., Ferrante, A., and Antalis, T.M. (1995). Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. Evidence for an alternate biological function. **J. Biol. Chem.** 270, 27894-27904.
33. Douglas, J.T., von Haller, P.D., Gehrmann, M., Llinás, M., and Schaller, J. (2002). The two-domain NK1 fragment of plasminogen: folding, ligand binding, and thermal stability profile. **Biochemistry** 41, 3302-3310.
34. Eaton, D., Rodriguez, H., and Vehar, G.A. (1986). Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. **Biochemistry** 25, 505-512.
35. Edman, P. (1950). A method for the determination of the amino acid sequence in peptides. **Acta Chem. Scand.** 4, 283-293.
36. Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M., and Gingeras, T.R. (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Mol. Cell Biol.** 5, 1111-1121.
37. Ellis, V., Behrendt, N., and Dano, K. (1991). Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. **J. Biol. Chem.** 266, 12752-12758.
38. Ellis, V., Daniels, M., Misra, R., and Brown, D.R. (2002). Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. **Biochemistry** 41, 6891-6896.
39. Esmon, C.T. (1987). The regulation of natural anticoagulant pathways. **Science** 235, 1348-1352.
40. Farabaugh, P.J. (1978). Sequence of the *lacI* gene. **Nature** 274, 765-769.
41. Favier, R., Aoki, N., and de Moerloose, P. (2001). Congenital α_2 -plasmin inhibitor deficiencies: a review. **Br. J. Haematol.** 114, 4-10.
42. Fischer, M.B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H.P., and Aguzzi, A. (2000). Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. **Nature** 408, 479-483.
43. Folk, J.E. and Finlayson, J.S. (1977). The ϵ -(γ -glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. **Adv. Protein Chem.** 31, 1-133.
44. Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat. Med.** 1, 27-31.
45. Forsgren, M., Råden, B., Israelsson, M., Larsson, K., and Hedén, L.O. (1987). Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plasminogen. **FEBS Lett.** 213, 254-260.
46. Frank, P.S. (2002). Der humane α_2 -Plasmininhibitor: Expression, Charakterisierung und Bindungsstudien. **Inauguraldissertation, Universität Bern.**
47. Frank, P.S., Douglas, J.T., Locher, M., Llinás, M., and Schaller, J. (2003). Structural/functional characterization of the α_2 -plasmin inhibitor C-terminal peptide. **Biochemistry** 42, 1078-1085.

48. Gonzalez-Gronow, M., Grenett, H.E., Fuller, G.M., and Pizzo, S.V. (1990). The role of carbohydrate in the function of human plasminogen: comparison of the protein obtained from molecular cloning and expression in *Escherichia coli* and COS cells. **Biochim. Biophys. Acta** 1039, 269-276.
49. Gottesman, S., Halpern, E., and Trisler, P. (1981). Role of *suIA* and *suIB* in filamentation by *lon* mutants of *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** 148, 265-273.
50. Grinna, L.S. and Tschopp, J.F. (1989). Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Yeast** 5, 107-115.
51. He, Z.Y., Yang, G.Z., Zhang, W.J., and Wu, X.F. (1999). Cloning and expression of a novel mutated osteoprogenin/osteoclastogenesis inhibitory factor gene. **Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)** 31, 680-684.
52. Holmes, W.E., Nelles, L., Lijnen, H.R., and Collen, D. (1987). Primary structure of human α_2 -antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). **J. Biol. Chem.** 262, 1659-1664.
53. Horrevoets, A.J., Smilde, A.E., Fredenburgh, J.C., Pannekoek, H., and Nesheim, M.E. (1995). The activation-resistant conformation of recombinant human plasminogen is stabilized by basic residues in the amino-terminal hinge region. **J. Biol. Chem.** 270, 15770-15776.
54. Hoylaerts, M., Rijken, D.C., Lijnen, H.R., and Collen, D. (1982). Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. **J. Biol. Chem.** 257, 2912-2919.
55. Ichinose, A. (1992). Multiple members of the plasminogen-apolipoprotein(a) gene family associated with thrombosis. **Biochemistry** 31, 3113-3118.
56. Invitrogen (2002). Multi-Copy *Pichia* Expression Kit. **Invitrogen Version F**.
57. Ji, W.R., Barrientos, L.G., Llinás, M., Gray, H., Villarreal, X., Deford, M.E., Castellino, F.J., Kramer, R.A., and Trail, P.A. (1998a). Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. **Biochem Biophys. Res. Commun.** 247, 414-419.
58. Ji, W.R., Castellino, F.J., Chang, Y., Deford, M.E., Gray, H., Villarreal, X., Kondri, M.E., Marti, D.N., Llinás, M., Schaller, J., Kramer, R.A., and Trail, P.A. (1998b). Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. **FASEB J.** 12, 1731-1738.
59. Kassam, G., Kwon, M., Yoon, C.S., Graham, K.S., Young, M.K., Gluck, S., and Waisman, D.M. (2001). Purification and characterization of A61. An angiostatin-like plasminogen fragment produced by plasmin autodigestion in the absence of sulfhydryl donors. **J. Biol. Chem.** 276, 8924-8933.
60. Kawano, S., Kakuta, Y., and Kimura, M. (2002). Guanine binding site of the *Nicotiana glutinosa* ribonuclease NW revealed by X-ray crystallography. **Biochemistry** 41, 15195-15202.
61. Kluft, C. and Los, N. (1981). Demonstration of two forms of α_2 -antiplasmin in plasma by modified crossed immunoelectrophoresis. **Thromb. Res.** 21, 65-71.
62. Komiyama, Y., Pedersen, A.H., and Kisiel, W. (1990). Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. **Biochemistry** 29, 9418-9425.
63. Koyama, T., Koike, Y., Toyota, S., Miyagi, F., Suzuki, N., and Aoki, N. (1994). Different NH₂-terminal form with 12 additional residues of α_2 -plasmin inhibitor from human plasma and culture media of Hep G2 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 200, 417-422.
64. Kurachi, K. and Davie, E.W. (1977). Activation of human factor XI (plasma thromboplastin antecedent) by factor XIIa (activated Hageman factor). **Biochemistry** 16, 5831-5839.
65. Kurachi, K., Fujikawa, K., Schmer, G., and Davie, E.W. (1976). Inhibition of bovine factor IXa and factor Xa β by antithrombin III. **Biochemistry** 15, 373-377.
66. Lacks, S. and Greenberg, B. (1977). Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. **J. Mol. Biol.** 114, 153-168.
67. Laudano, A.P. and Doolittle, R.F. (1980). Studies on synthetic peptides that bind to fibrinogen and prevent fibrin polymerization. Structural requirements, number of binding sites, and species differences. **Biochemistry** 19, 1013-1019.
68. Le Hir, H., Nott, A., and Moore, M.J. (2003). How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. **Trends Biochem. Sci.** 28, 215-220.
69. Lewis, V.O., Gehrmann, M., Weissbach, L., Hyman, J.E., Rielly, A., Jones, D.G., Llinás, M., and Schaller, J. (1999). Homologous plasminogen N-terminal and plasminogen-related gene A and B peptides. Characterization of cDNAs and recombinant fusion proteins. **Eur. J. Biochem.** 259, 618-625.
70. Lewis, V.O., O'Reilly, M.S., Gehrmann, M., Llinás, M., Schaller, J., and Weissbach, L. (2001). Inhibition of tumor growth by plasminogen-related protein-B. **Anticancer Res.** 21, 2287-2291.

71. Loscalzo, J. and Schafer, A.I. (1994). Thrombosis and hemorrhage. **Blackwell Scientific Pub. First Edition**, 3-12.
72. Lumbreras, V., Stevens, D.R., and Purton, S. (1998). Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. **The Plant J.** 14, 441-447.
73. Makrides, S.C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.** 60, 512-538.
74. Marklund, U., Byström, M., Gedda, K., Larefalk, A., Juneblåd, K., Nyström, S., and Ekstrand, A.J. (2002). Intron-mediated expression of the human neuropeptide Y Y1 receptor. **Mol. Cell Endocrinol.** 188, 85-97.
75. Marti, D., Schaller, J., Ochensberger, B., and Rickli, E.E. (1994). Expression, purification and characterization of the recombinant kringle 2 and kringle 3 domains of human plasminogen and analysis of their binding affinity for ω -aminocarboxylic acids. **Eur. J. Biochem.** 219, 455-462.
76. Marti, D.N., Hu, C.K., An, S.S., von Haller, P., Schaller, J., and Llinás, M. (1997). Ligand preferences of kringle 2 and homologous domains of human plasminogen: canvassing weak, intermediate, and high-affinity binding sites by ^1H -NMR. **Biochemistry** 36, 11591-11604.
77. Marti, D.N., Schaller, J., and Llinás, M. (1999). Solution structure and dynamics of the plasminogen kringle 2-AMCHA complex: 3(1)-helix in homologous domains. **Biochemistry** 38, 15741-15755.
78. Marti, T., Schaller, J., Rickli, E.E., Schmid, K., Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., van Halbeek, H., and Vliegthart, J.F. (1988). The N- and O-linked carbohydrate chains of human, bovine and porcine plasminogen. Species specificity in relation to sialylation and fucosylation patterns. **Eur. J. Biochem.** 173, 57-63.
79. Mathews, I.I., Vanderhoff-Hanaver, P., Castellino, F.J., and Tulinsky, A. (1996). Crystal structures of the recombinant kringle 1 domain of human plasminogen in complexes with the ligands ϵ -aminocaproic acid and trans-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic acid. **Biochemistry** 35, 2567-2576.
80. McCance, S.G. and Castellino, F.J. (1995). Contributions of individual kringle domains toward maintenance of the chloride-induced tight conformation of human glutamic acid-1 plasminogen. **Biochemistry** 34, 9581-9586.
81. McCance, S.G., Menhart, N., and Castellino, F.J. (1994). Amino acid residues of the kringle-4 and kringle-5 domains of human plasminogen that stabilize their interactions with ω -amino acid ligands. **J. Biol. Chem.** 269, 32405-32410.
82. Melcher, R., Grosch, H.W., and Hasilik, A. (2002). Plasmid vectors with a 5'-hybrid intron facilitate high-level glycoprotein expression in CHO-cells. **Biochim. Biophys. Acta** 1575, 49-53.
83. Menhart, N., Sehl, L.C., Kelley, R.F., and Castellino, F.J. (1991). Construction, expression, and purification of recombinant kringle 1 of human plasminogen and analysis of its interaction with ω -amino acids. **Biochemistry** 30, 1948-1957.
84. Michal, G. (1999). Biochemical pathways. **Spektrum Akad. Verlag First Edition**.
85. Miele, R.G., Prorok, M., Costa, V.A., and Castellino, F.J. (1999). Glycosylation of asparagine-28 of recombinant staphylokinase with high-mannose-type oligosaccharides results in a protein with highly attenuated plasminogen activator activity. **J Biol. Chem.** 274, 7769-7776.
86. Miles, L.A., Castellino, F.J., and Gong, Y. (2003). Critical role for conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen for optimal stimulation of plasminogen activation on cell surfaces. **Trends Cardiovasc. Med.** 13, 21-30.
87. Montuori, N., Rossi, G., and Ragno, P. (2002). Post-transcriptional regulation of gene expression in the plasminogen activation system. **Biol. Chem.** 383, 47-53.
88. Moroi, M. and Aoki, N. (1976). Isolation and characterization of α_2 -plasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. **J. Biol. Chem.** 251, 5956-5965.
89. Moscatelli, D. and Rifkin, D.B. (1988). Membrane and matrix localization of proteinases: a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis. **Biochim. Biophys. Acta** 948, 67-85.
90. Moshfegh, K. (1993). Expression, Isolierung und Charakterisierung der Kringeldomäne 5 von humanem Plasminogen. **Diplomarbeit, Universität Bern**.
91. Naito, K. and Fujikawa, K. (1991). Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. **J. Biol. Chem.** 266, 7353-7358.
92. Nakagaki, T., Foster, D.C., Berkner, K.L., and Kisiel, W. (1991). Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII. **Biochemistry** 30, 10819-10824.
93. Nilsen, S.L. and Castellino, F.J. (1999). Expression of human plasminogen in *Drosophila Schneider* S2 cells. **Protein Expr. Purif.** 16, 136-143.

94. Nilsen, S.L., Deford, M.E., Prorok, M., Chibber, B.A., Bretthauer, R.K., and Castellino, F.J. (1997). High-level secretion in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the recombinant kringle 2 domain of tissue-type plasminogen activator. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 25 (Pt 1), 63-74.
95. Nilsen, S.L., Prorok, M., and Castellino, F.J. (1999). Enhancement through mutagenesis of the binding of the isolated kringle 2 domain of human plasminogen to ω -amino acid ligands and to an internal sequence of a Streptococcal surface protein. **J Biol. Chem.** 274, 22380-22386.
96. O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H., and Folkman, J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. **Cell** 79, 315-328.
97. Patthy, L. (1985). Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. **Cell** 41, 657-663.
98. Peisach, E., Wang, J., de Los, S.T., Reich, E., and Ringe, D. (1999). Crystal structure of the proenzyme domain of plasminogen. **Biochemistry** 38, 11180-11188.
99. Pirie-Shepherd, S.R., Stevens, R.D., Andon, N.L., Enghild, J.J., and Pizzo, S.V. (1997). Evidence for a novel O-linked sialylated trisaccharide on Ser-248 of human plasminogen 2. **J. Biol. Chem.** 272, 7408-7411.
100. Ponting, C.P., Holland, S.K., Cederholm-Williams, S.A., Marshall, J.M., Brown, A.J., Spraggon, G., and Blake, C.C. (1992). The compact domain conformation of human Glu-plasminogen in solution. **Biochim. Biophys. Acta** 1159, 155-161.
101. Prusiner, S.B. (1998). Prions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 95, 13363-13383.
102. Ries, M., Easton, R.L., Longstaff, C., Zenker, M., Morris, H.R., Dell, A., and Gaffney, P.J. (2002). Differences between neonates and adults in carbohydrate sequences and reaction kinetics of plasmin and α_2 -antiplasmin. **Thromb. Res.** 105, 247-256.
103. Rijken, D.C. and Sakharov, D.V. (2001). Basic principles in thrombolysis: regulatory role of plasminogen. **Thromb. Res.** 103 Suppl 1, S41-S49.
104. Ritchie, H., Lawrie, L.C., Crombie, P.W., Mosesson, M.W., and Booth, N.A. (2000). Cross-linking of plasminogen activator inhibitor 2 and α_2 -antiplasmin to fibrin(ogen). **J. Biol. Chem.** 275, 24915-24920.
105. Rodak, B.F. (1995). Diagnostic hematology. **W.B. Saunders Co. First Edition.**
106. Rosenberg, A.H., Goldman, E., Dunn, J.J., Studier, F.W., and Zubay, G. (1993). Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. **J. Bacteriol.** 175, 716-722.
107. Rosenberg, R.D. and Damus, P.S. (1973). The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. **J. Biol. Chem.** 248, 6490-6505.
108. Sasaki, T., Morita, T., and Iwanaga, S. (1986). Identification of the plasminogen-binding site of human α_2 -plasmin inhibitor. **J. Biochem. (Tokyo)** 99, 1699-1705.
109. Scatchard, G. (1948). The attractions of proteins for small molecules and ions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 51, 660-672.
110. Scorer, C.A., Clare, J.J., McCombie, W.R., Romanos, M.A., and Sreekrishna, K. (1994). Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. **Biotechnology (N. Y.)** 12, 181-184.
111. Söndel, S., Hu, C.K., Marti, D., Affolter, M., Schaller, J., Llinás, M., and Rickli, E.E. (1996). Recombinant gene expression and ^1H NMR characteristics of the kringle (2 + 3) supermodule: spectroscopic/functional individuality of plasminogen kringle domains. **Biochemistry** 35, 2357-2364.
112. Stahl, N., Baldwin, M.A., Burlingame, A.L., and Prusiner, S.B. (1990). Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. **Biochemistry** 29, 8879-8884.
113. Stuber, D., Bannwarth, W., Pink, J.R., Meloen, R.H., and Matile, H. (1990). New B cell epitopes in the *Plasmodium falciparum* malaria circumsporozoite protein. **Eur. J. Immunol.** 20, 819-824.
114. Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J. Mol. Biol.** 189, 113-130.
115. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., and Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods Enzymol.** 185, 60-89.
116. Sumi, Y., Ichikawa, Y., Nakamura, Y., Miura, O., and Aoki, N. (1989). Expression and characterization of pro α_2 -plasmin inhibitor. **J. Biochem. (Tokyo)** 106, 703-707.
117. Takada, A. and Takada, Y. (1983). The activation of two isozymes of Glu-plasminogen (I and II) by urokinase and streptokinase. **Thromb. Res.** 30, 633-642.
118. Tamaki, T. and Aoki, N. (1982). Cross-linking of α_2 -plasmin inhibitor to fibrin catalyzed by activated fibrin-stabilizing factor. **J. Biol. Chem.** 257, 14767-14772.

119. Tracy, P.B., Nesheim, M.E., and Mann, K.G. (1981). Coordinate binding of factor Va and factor Xa to the unstimulated platelet. **J. Biol. Chem.** 256, 743-751.
120. Tranqui, L., Prandini, M.H., and Sussillon, M. (1979). Structure of fibrinogen and its derivatives: an electron microscope study. **Thromb. Haemost.** 41, 655-661.
121. Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A., and Gingeras, T.R. (1987). Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Res.** 15, 3859-3876.
122. Tsirka, S.E., Rogove, A.D., Bugge, T.H., Degen, J.L., and Strickland, S. (1997). An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. **J. Neurosci.** 17, 543-552.
123. Tsujikawa, M., Okabayashi, K., Morita, M., and Tanabe, T. (1996). Secretion of a variant of human single-chain urokinase-type plasminogen activator without an N-glycosylation site in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* and characterization of the secreted product. **Yeast** 12, 541-553.
124. Tuddenham, E.G.D. and Cooper, D.N. (1994). The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders. **Oxford Monographs on Med. Gen.** 25, 1-8.
125. Tulinsky, A., Park, C.H., and Skrzypczak-Jankun, E. (1988). Structure of prothrombin fragment 1 refined at 2.8 Å resolution. **J. Mol. Biol.** 202, 885-901.
126. Verrall, S. and Seeds, N.W. (1988). Tissue plasminogen activator binding to mouse cerebellar granule neurons. **J. Neurosci. Res.** 21, 420-425.
127. Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E., and Dyson, H.J. (1999). Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 96, 2042-2047.
128. Villarejo, M.R. and Zabin, I. (1974). β -galactosidase from termination and deletion mutant strains. **J. Bacteriol.** 120, 466-474.
129. Violand, B.N. and Castellino, F.J. (1976). Mechanism of the urokinase-catalyzed activation of human plasminogen. **J. Biol. Chem.** 251, 3906-3912.
130. Voet, D. and Voet, J.G. (1995). Biochemistry. **John Wiley & Sons Inc. Second Edition.**
131. von Haller, P.D. (1999). N-terminale Multidomänenfragmente des humanen Plasminogens: Rekombinante Expression, Charakterisierung und Bestimmung verschiedener Ligandbindungskonstanten. **Inauguraldissertation, Universität Bern.**
132. Wang, H., Prorok, M., Bretthauer, R.K., and Castellino, F.J. (1997). Serine-578 is a major phosphorylation locus in human plasma plasminogen. **Biochemistry** 36, 8100-8106.
133. Wang, H., Yu, A., Wiman, B., and Pap, S. (2003). Identification of amino acids in antiplasmin involved in its noncovalent 'lysine-binding-site'-dependent interaction with plasmin. **Eur. J. Biochem.** 270, 2023-2029.
134. Wang, J., Brdar, B., and Reich, E. (1995). Structure and function of microplasminogen: I. Methionine shuffling, chemical proteolysis, and proenzyme activation. **Protein Sci.** 4, 1758-1767.
135. Wang, X., Lin, X., Loy, J.A., Tang, J., and Zhang, X.C. (1998). Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. **Science** 281, 1662-1665.
136. Wertman, K.F., Wyman, A.R., and Botstein, D. (1986). Host/vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. **Gene** 49, 253-262.
137. Whitefleet-Smith, J., Rosen, E., McLinden, J., Ploplis, V.A., Fraser, M.J., Tomlinson, J.E., McLean, J.W., and Castellino, F.J. (1989). Expression of human plasminogen cDNA in a baculovirus vector-infected insect cell system. **Arch. Biochem. Biophys.** 271, 390-399.
138. Wiman, B. and Wallen, P. (1975). Structural relationship between „glutamic acid“ and „lysine“ forms of human plasminogen and their interaction with the NH₂-terminal activation peptide as studied by affinity chromatography. **Eur. J. Biochem.** 50, 489-494.
139. Wong, B.S., Chen, S.G., Colucci, M., Xie, Z., Pan, T., Liu, T., Li, R., Gambetti, P., Sy, M.S., and Brown, D.R. (2001). Aberrant metal binding by prion protein in human prion disease. **J. Neurochem.** 78, 1400-1408.
140. Wu, T.P., Padmanabhan, K., Tulinsky, A., and Mulichak, A.M. (1991). The refined structure of the ϵ -aminocaproic acid complex of human plasminogen kringle 4. **Biochemistry** 30, 10589-10594.
141. Yamamoto, M., Nakagaki, T., and Kisiel, W. (1992). Tissue factor-dependent autoactivation of human blood coagulation factor VII. **J. Biol. Chem.** 267, 19089-19094.
142. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene** 33, 103-119.

9 Curriculum Vitae

Zur Person

Abschluss: dipl. chem. UniBE
 Geburtsdatum: 15. Dezember 1975 in Bern
 Zivilstand: ledig, keine Kinder
 Nationalität: Schweizer

Kontakt

Cédric Invernizzi
 Mülinenstrasse 28
 CH-3006 Bern
 Schweiz
 Tel Mobile: +4179 355 08 25
 E-Mail: nanooq@bluewin.ch



Publikationen

Invernizzi C, Imhof J, Burkard G, Schmid K and Boschetti A.
 Effects of mutations at the two processing sites of the precursor for the small subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase in *Chlamydomonas reinhardtii*.
Biochem. J. **366**, 989-998 (2002)

Ausbildung

- 04.2000 - heute Doktorat in Chemie an der Universität Bern
Dissertation in Biochemie am Departement für Chemie und Biochemie unter der Leitung von PD Dr. J. Schaller
 Titel: „Expression und Charakterisierung von humanem Plasminogen und verschiedener Domänen in *E. coli* und *P. pastoris*“
 Zusatzausbildung in **Analytik mit Zertifikat**:
 Messen von Proben und Kundenbetreuung in Massenspektrometrie, Proteinsequenzierung nach Edman, Aminosäureanalytik
- 10.1995 - 01.2000 Studium in Chemie an der Universität Bern mit dem Abschluss als **dipl. chem. UniBE**
Diplomarbeit in Biochemie am Departement für Chemie und Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. A. Boschetti
 Titel: „Prozessierung des Vorläufers der Kleinen Untereinheit von RuBisCO aus *Chlamydomonas* durch Zwei Unabhängige Enzyme“
 Zusatzabschluss von zwei Lehrveranstaltungen mit Bewertung:
 Allgemeine Mikrobiologie, Immunologie
- 08.1990 - 06.1995 Gymnasium Bern Neufeld
 Matura Typus C (Real)
- 04.1986 - 07.1990 Sekundarschule Rebacker in Münsingen
- 04.1982 - 04.1986 Primarschule Sonnhalde in Münsingen

Engagement an der Universität

Assistent von Biochemiepraktika an der Universität Bern
 Einarbeitung und Betreuung von Diplomanden in Biochemie
 Vorstandsmitglied des Fachvereins Chemie und Biochemie (FCB)
 Organisation (Druck und Verkauf) von Vorlesungsskripten

