

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Chirurgische Klinik I

Direktor: Professor Dr. med. Prof. h. c. A. Thiede

**Darstellung rekombinanter Kollagenasen
zur Isolierung von Langerhansinseln des Schweins**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Susanne Reihl

aus Neustadt an der Weinstraße

Würzburg, September 2006

Referentin: Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs

Korreferentin: PD Dr. rer. hum. biol. U. Kämmerer

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	7
2.1. Materialien.....	7
2.2. Methoden.....	14
2.2.1. Bakterien.....	14
2.2.1.1. Lagerung und Aufzucht.....	14
2.2.1.2. Kompetente Bakterien.....	14
2.2.2. Klonierung.....	15
2.2.2.1. Vektor.....	15
2.2.2.1.1. Verdau.....	15
2.2.2.1.2. Trennung und Isolierung.....	15
2.2.2.1.3. Quantifizierung.....	16
2.2.2.2. Amplifizierung mit PCR.....	16
2.2.2.2.1. Aufreinigung und Verdau.....	18
2.2.2.3. Ligation und Transformation.....	18
2.2.2.4. Minipreps und Minigele.....	19
2.2.3. Induktion.....	19
2.2.3.1. Parameter.....	19
2.2.3.2. Kontrolle.....	20
2.2.3.3. Analyse.....	20
2.2.3.3.1. Lyse.....	20
2.2.3.3.2. SDS-PAGE.....	21
2.2.3.3.3. Pro-Q™ Sapphire 365 Oligohistidin-Färbung.....	23
2.2.3.3.4. Western-Blot.....	24
2.2.4. Isolierung.....	24
2.2.4.1. Aufreinigung.....	24
2.2.4.1.1. Denaturierend.....	25
2.2.4.1.2. Nicht-Denaturierend.....	25
2.2.4.2. Dialyse.....	25
2.2.5. Aktivitätsmessung.....	26

3. Ergebnisse.....	27
3.1. Klonierung.....	27
3.1.1. Strategie.....	27
3.1.2. Vektor pET38.....	29
3.1.3. Kollagenasegen baa und sein Produkt.....	29
3.1.4. Ligation und Transformation.....	30
3.1.5. Selektion der Klone.....	31
3.1.6. Transformation in exprimierende Bakterienstämme.....	32
3.2. Expressionsoptimierung.....	32
3.2.1. Induktion.....	32
3.2.1.1. Bakterienstämme.....	32
3.2.1.2. Zeit und Temperatur.....	33
3.2.1.3. Glucose.....	34
3.2.2. Lyse.....	34
3.2.2.1. Lysemethode.....	34
3.2.2.2. Lysepuffer.....	35
3.3. Isolierung des Fusionsproteins.....	38
3.4. Nachweise des Fusionsproteins.....	43
3.4.1. Aktivitätsmessung.....	43
3.4.2. Pro-Q™ Sapphire 365 Oligohistidin-Färbung.....	45
3.4.3. Western-Blot.....	46
4. Diskussion.....	50
5. Zusammenfassung.....	54
6. Literaturverzeichnis.....	55

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungen

bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C. histolyticum	Clostridium histolyticum
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FALGPA	2-Furanacryloyl-L-Leucylglycyl-L-Prolyl-L-Alanin
xg	relative Erdbeschleunigung ($1xg = 9,8m/s^2$)
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
His	Histidin, hier meist kurz für poly-His (z. B. His-Tag)
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IPTG	Isopropyl-D-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
NKT	Natürliche Killer-T-Zellen
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Unit
Zn	Zink

1. Einleitung

Der Diabetes mellitus ist eine Volkskrankheit, deren Folgen eine gravierende Belastung für den einzelnen Patienten sind und große finanzielle Anforderungen an das Gesundheitswesen stellen. Der Diabetes ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die mit Hyperglykämie einhergeht¹. Man unterscheidet in erster Linie zwischen dem Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus.

Der Typ 1 Diabetes beruht im Wesentlichen auf Autoimmunvorgängen, die gegen Antigene der insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhansinseln des Pankreas gerichtet sind und diese zerstören. Die Ursachen für das Auftreten der Krankheit sind immer noch nicht vollständig geklärt. Teilweise scheinen genetische Faktoren eine Rolle zu spielen; Träger der HLA-Allele HLA-DR3 und HLA-DR4 haben eine erhöhte Disposition für Diabetes mellitus Typ 1^{2,3}. Es gibt außerdem Hinweise, dass beim Typ 1 Diabetes wie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen eine verminderte oder auch überschießende Aktivität einer bestimmten Population von Natürlichen Killer-T-Zellen (NKT) mit einem invarianten $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ Rearrangement, sogenannten $V\alpha 24i$ NKT vorliegt⁴. Man geht davon aus, dass zur Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 eine Störung im Sekretionsmuster der durch diese NKT-Zellen sezernierten Zytokine und eine damit verbundene Veränderung der Aktivierung oder Supprimierung anderer Zellen des Immunsystems vorliegt^{5,6}.

Der Typ 2 Diabetes ist eine heterogene Erkrankung mit komplexer Ätiologie und Pathogenese⁷. Ätiologisch geht man bei dieser Erkrankung unter anderem von einer genetischen Komponente aus, die jedoch noch nicht vollständig bekannt ist⁸⁻¹⁰. Drei pathophysiologische Störungen kennzeichnen dieses Krankheitsbild: die gestörte, bzw. verminderte Insulinsekretion, eine Insulinresistenz, das heißt eine verminderte Insulinwirkung an den peripheren Zielorganen, v. a. an Leber- und Muskelzellen, sowie eine gesteigerte hepatische Glucoseproduktion^{11,12}.

Insgesamt beurteilt man die Entstehung der unterschiedlichen Formen des Diabetes als multifaktoriell, es wird ein Zusammenspiel aus genetischer Disposition, Umweltfaktoren und Lebensgewohnheiten angenommen¹. Neuesten Schätzungen zufolge beläuft sich die Zahl aller Diabetiker in Deutschland auf etwa acht Millionen Menschen. Die wichtigsten

Folgeerkrankungen entstehen im Wesentlichen auf dem Boden einer Mikro- und Makroangiopathie. So haben Diabetespatienten ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen^{13, 14}, diabetische Nephropathie bis hin zum terminalen Nierenversagen^{15, 16}, diabetische Neuropathie, eine Schädigung des gesamten Nervensystems¹⁷, die bei vielen Patienten auf Dauer eine Extremitätenamputation unumgänglich macht und die Retinopathie¹⁸, die die völlige Erblindung des Patienten zur Folge haben kann.

Therapeutische Ansätze zur Behandlung eines manifesten Diabetes mellitus schließen eine Vielzahl von Maßnahmen ein, wie Diät, körperliche Aktivität, medikamentöse Therapie mit unterschiedlichen Ansätzen sowie die Prophylaxe von Komplikationen^{1, 19-22}. Zukünftige Therapieansätze zur Behandlung der insulinabhängigen Diabetesformen sind Insulinpumpen, die mit Sonden zur kontinuierlichen Blutzuckermessung ausgestattet sind und entsprechend den gemessenen Werten adäquat Insulin abgeben können (z. B. „Ulmer Zuckeruhr“^{23, 24}). Insulinpumpen ohne implantierbaren Glucosesensor werden bereits, vor allem bei jungen Diabetikern, angewendet^{25, 26}. In klinischer Erprobung befinden sich inhalierbare Insuline^{27, 28}. Die Stammzelltherapie, bei der aus undifferenzierten somatischen Stammzellen bestimmte Gewebetypen ausdifferenziert und transplantiert werden sollen, befindet sich bezüglich der Behandlung des Diabetes mellitus noch in den Anfangsstadien der experimentellen Forschung^{29, 30}. Die Pankreastransplantation, die meist in Kombination mit einer Nierentransplantation durchgeführt wird, ist noch mit einigen Unwägbarkeiten, vor allem der lebenslangen Immunsuppression der Patienten verbunden³¹⁻³³.

Eine wichtige Option im Rahmen der Organtransplantation stellt die Xenogene Transplantation³⁴, die Transplantation von Organen zwischen verschiedenen Spezies dar. Diese Form der Transplantation ist allerdings mit Problemen aus den verschiedensten Bereichen behaftet. In erster Linie sind für die Xenotransplantation Spendertiere von Nutzen, die eine hohe anatomische, physiologische und immunologische Kompatibilität zum Menschen aufweisen. Spendertiere der ersten Wahl wären damit vor allem Schimpansen. Diese Tatsache wirft jedoch viele ethische Fragen auf. Schweine, bei denen die Organspende nicht mit solch ausgeprägten ethischen Bedenken behaftet ist, werden derzeit favorisiert. Sie implizieren als diskordante Spender jedoch unter anderem eine Reihe von immunologischen Problemen mit konsekutiver Abstoßungsreaktion.

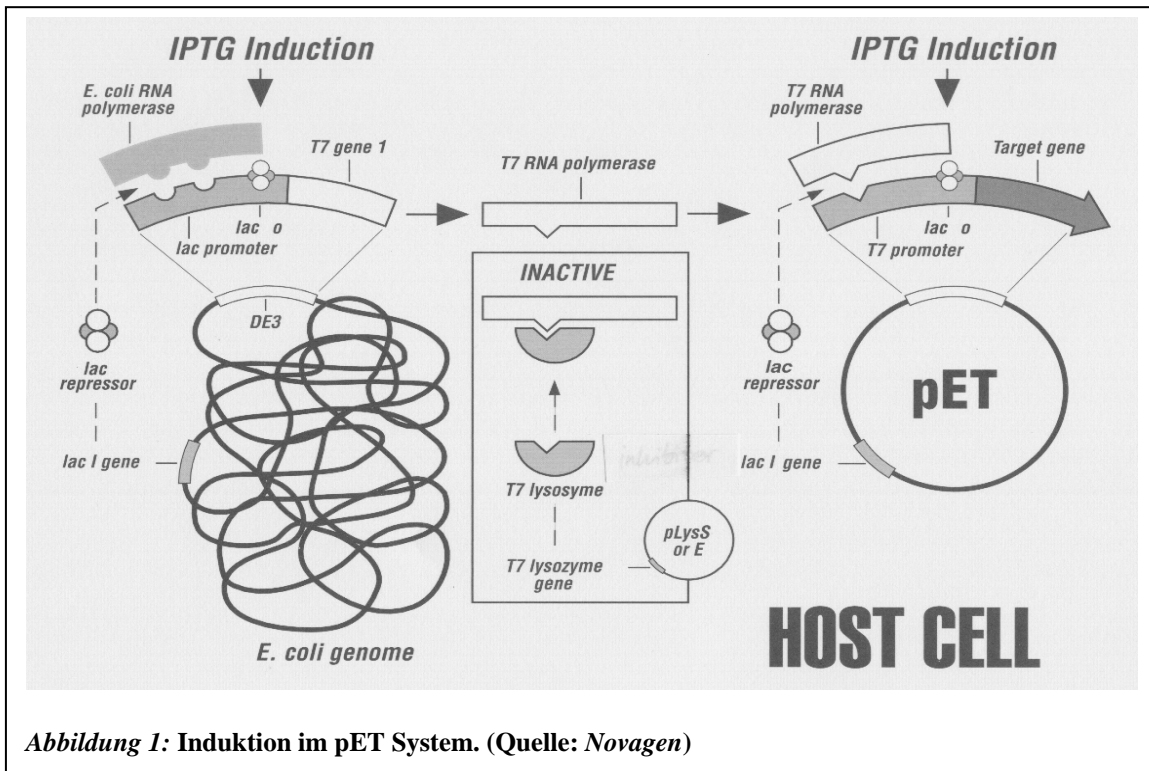
Eine weitere Form der Xenotransplantation stellt die xenogene Transplantation von Organen, bzw. von Geweben dar. Der in unserer Arbeitsgruppe verfolgte Ansatz einer weiteren Therapieoption zur Behandlung des Typ 1 Diabetes ist die xenogene Inseltransplantation³⁵⁻³⁷. Diese Methode hat den Vorteil, dass der operative Eingriff im Vergleich zur Organtransplantation in minimal invasiver chirurgischer Technik durchgeführt werden kann, und somit eine viel geringere Belastung für den Patienten darstellt. Die Abstoßungsgefahr und die damit verbundene Notwendigkeit einer lebenslangen Immunsuppression besteht prinzipiell, wenn auch in geringerem Umfang, auch bei der Transplantation von Langerhansinseln³⁸. In geringerem Umfang deshalb, da bestimmte Formen der Abstoßung (hyperakute Form) ausschließlich bei der Transplantation vaskularisierter Organe, nicht aber bei der Transplantation von (nicht vaskularisierten) Zellen auftreten³⁹. Andere Formen der Transplantatabstoßung kommen jedoch ebenso bei der Transplantation von Zellen vor⁴⁰. Daher wurden im Rahmen unseres Forschungsprojekts Alginatkapseln entwickelt, mit denen die Langerhansinseln vor Transplantation verkapselt werden. Sie werden so vom Immunsystem des Empfängers abgeschirmt und vor den Abstoßungsreaktionen geschützt⁴¹⁻⁴⁴.

Die Aufreinigung der Langerhansinseln vor Transplantation, das heißt die saubere Trennung des endokrinen vom exokrinen Gewebe, ist von entscheidender Bedeutung für die spätere Vitalität der Zellen und auch deren optimale Verkapselung⁴⁵⁻⁵⁰. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Aufreinigung von Langerhansinseln zur Verkapselung und Transplantation im Tiermodell. Für den Aufreinigungsprozess der Langerhansinseln werden in der Regel kommerzielle Kollagenasen, bzw. Kollagenasegemische verwendet, deren Anwendung mit zum Teil erheblichen Problemen behaftet ist. Diese sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Kollagenasen sind Enzyme, die das wichtigste Protein der extrazellulären Matrix, das Kollagen, abbauen. Dabei erkennen die Kollagenasen bestimmte Aminosäuresequenzen und schneiden sie sequenzspezifisch⁵¹. *C. histolyticum*, ein hochpathogenes Bakterium, das den sogenannten Gasbrand erzeugt, produziert eine Vielzahl verschiedener Kollagenasen als Pathogenitätsfaktoren⁵². Mit diesen Kollagenasen zerstört es die Bindegewebsbarrieren des Wirtsorganismus. Mikroorganismen besitzen im Gegensatz zu vielzelligen Eukaryoten kein Kollagen und sind damit gegenüber dem enzymatischen Verdau durch Kollagenasen unempfindlich⁵³.

Neben den bakteriellen Kollagenasen gibt es auch eukaryontische Kollagenasen, die das Wachstum und die Umbildung des Kollagens im Bindegewebe beeinflussen⁵⁴. Sie sind strukturell von den bakteriellen Kollagenasen verschieden und wurden bisher nicht für die Isolierung von Langerhansinseln - wohl hauptsächlich aus Kostengründen - eingesetzt. Die Aktivität dieser Gewebekollagenasen wird durch spezifische Hemmproteine gesteuert. Bisher wurden für die Isolierung der Langerhansinseln kommerziell hergestellte Kollagenasegemische verwendet⁵⁵, die aus Clostridienkulturen gewonnen werden⁵⁶⁻⁵⁸. Das Problem der kommerziell erworbenen Kollagenasegemische ist, dass sie sehr teuer sind und deutliche Qualitätsschwankungen innerhalb der Chargen aufweisen. Auch der Reinheitsgrad der kommerziellen Kollagenasegemische ist häufig unzureichend^{59, 60}. Um diese Probleme zu vermeiden, befasst sich diese Arbeit damit, eine Kollagenase rekombinant in *E. coli* zu exprimieren⁴⁶. Dabei wurde die im Folgenden dargelegte Strategie verfolgt:

Bei der Isolierung von Langerhansinseln aus dem porzinen Pankreas hat sich in unserer Arbeitsgruppe eine sogenannte „Fraktion C“ erfolgreich bewährt. „Fraktion C“ ist ein Gemisch aus hauptsächlich zwei Kollagenasen⁶¹. Eine davon wird durch das Gen *baa* (Genbank: *baa* 77453) aus *C. histolyticum* kodiert. Als Expressionsvektor wurde pET38 der Firma *Novagen* ausgewählt, der folgende Eigenschaften und Vorzüge aufweist: Der Vektor pET38 ermöglicht die kontrollierte Expression unter dem T7 lac Promotor und eine schnelle Aufreinigung des Expressionsprodukts mittels zweier „tag“ Sequenzen am C-terminalen Ende. In normalen, zur Klonierung verwendeten Bakterienstämmen kommt es zu keiner oder nur zu einer extrem geringen Expression des klonierten Gens, da sie nicht über die Phagen T7 RNA Polymerase verfügen, die an den T7 lac Promotor bindet. Zudem wird die Expression durch den lac Repressor, der an den T7 lac Promotor bindet, unterbunden. Der lac Repressor wird von den meisten Bakterienstämmen exprimiert, zudem kann der Vektor pET38 auch selbst den lac Repressor exprimieren, da er ebenfalls über das lac I Gen für den lac Repressor verfügt⁶².



Um eine Expression von pET38 zu induzieren, muss das Plasmid in Bakterienstämme eingebracht werden, die über das T7 RNA Polymerase Gen verfügen (Abb. 1). Dies wird in der Regel durch eine Infektion der Bakterien mit dem lysogenen Phagen λ DE3 erreicht, der das Gen für die T7 RNA Polymerase unter Kontrolle des lacUV5 Promotors trägt. Da es sich um einen lysogenen Phagen handelt, wird das Phagen genom stabil in das bakterielle Genom integriert⁶³.

Wie der T7 lac Promotor trägt auch der lacUV5 Promotor eine Bindungsstelle für den lac Repressor und ist daher normalerweise inaktiv. Unter physiologischen Bedingungen bindet Lactose an den lac Repressor und verhindert dadurch die Bindung an den Promotor, und es kommt zur Genexpression (Umstellung von Glucose- auf Lactosestoffwechsel). Zur Expression unter Laborbedingungen wird die Lactose durch IPTG (Isopropyl-D-Thiogalactopyranosid) ersetzt. Nach Zugabe von IPTG löst sich der lac Repressor von den Promotoren, die T7 RNA Polymerase kann von der DE3 Genkassette exprimiert werden und an den Promotor T7 lac in pET38 binden⁶⁴. Da es sich um einen Phagenpromotor handelt, kommt es zu einer sehr starken Expression, die bis zu 50% der gesamten Proteinproduktion erreichen kann. Dieses Expressionssystem vereint auf einmalige Weise eine ex-

trem stringente Expressionskontrolle (zur Vermeidung der Expression eventuell toxischer Genprodukte) mit einem sehr hohen Expressionsniveau⁶².

Um das gewünschte Gen in den Vektor pET38 klonieren zu können, besitzt er zwischen dem Promotor und den „tag“ Sequenzen eine „multiple cloning site“. Sie zeichnet sich durch eine Anreihung von singulären, nicht überlappenden Restriktionsschnittstellen aus, die eine gerichtete Klonierung erheblich vereinfachen. Zwischen Promotor und „multiple cloning site“ befindet sich weiterhin eine Signalsequenz, die zur Sekretion des exprimierten Proteins führen soll (Abb. 2). Normalerweise befindet sich das exprimierte Genprodukt in den Bakterien selbst, mit der Signalsequenz könnte aber das rekombinante Protein in das Medium abgegeben werden. Dies würde die Aufreinigung erheblich erleichtern und später eine „continuous flow“ Kultur zur Massenproduktion des Genprodukts ermöglichen. Das rekombinante Gen wird mit den Genen CBDcex•Tag und His•Tag verlängert. Das rekombinante Protein wird dann als Fusionsprotein aus der klonierten Kollagenase und den beiden „tags“ CBD („cellulose binding domain“) und Poly-Histidin (His) exprimiert. Dieses Fusionsprotein kann mittels Affinitätschromatographie über Cellulosesäulen (über die „cellulose binding domain“) oder Ni²⁺ (Poly-His bindet an Nickelionen) schnell und schonend aufgereinigt werden. Soweit nötig können die „tags“ mit Thrombin auch wieder entfernt werden⁶².

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung einer Kollagenase zur Isolierung von Langerhansinseln, die konstant eine gute Qualität aufweist, einen hohen Reinheitsgrad besitzt und dabei kostengünstig und mit möglichst geringem Aufwand produziert werden kann.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

▪ Pufferlösungen, Medien und sonstige Chemikalien

Einfrierlösung

65% Glyzerin (v/v)

0,1M MgSO₄

25mM Tris·Cl, pH 8,0

LB-Medium

Invitrogen

[vormals Life Technologies –

vormals Gibco BRL]

20g auf 1l H₂O

15min bei 121°C autoklavieren

TfbI

30mM Kaliumacetat

50mM MnCl₂

100mM KCl

10mM CaCl₂

15% Glycerol

10x Puffer 2 für Restriktionsverdau

New England Biolabs (NEB)

50mM NaCl

10mM Tris-HCl

10mM MgCl₂

1mM Dithiothreitol (pH 7,9 bei 25°C)]

TYM

2% Bacto-Trypton

0,5% Bacto Hefeextrakt

0,1M NaCl

0,01M MgCl₂

15min bei 121°C autoklavieren

TfbII

10mM Na-MOPS, pH 7,0

75mM CaCl₂

10mM KCl

15% Glycerol

Sonstige Restriktionspuffer

New England Biolabs (NEB)

TBE (Tris/Borat/EDTA)

Arbeitslösung, pH 8,0:

89mM Tris-Base

89mM Borsäure

2mM EDTA

TAE (Tris/Acetat/EDTA)

Arbeitslösung, pH 8,5:

40mM Tris-Base

40mM Essigsäure

1mM EDTA

Säulenpuffer UBT pH 8,0

20mM HEPES

0,5M NaCl

0,1mM EDTA

0,1% TritonX 100

1M Phosphatpuffer pH 8,0

18,2ml 1M KH_2PO_4

81,8ml 1M Na_2HPO_4

Diese Stammlösung wurde verwendet um die folgenden verdünnten Phosphatpuffer zu erstellen:

Lysepuffer

Harnstoff-Lysepuffer

100mM Phosphatpuffer pH 8,0

10mM Tris·Cl

8M Harnstoff

pH 8,0

GuHCl-Lysepuffer

100mM Phosphatpuffer pH 8,0

10mM Tris·Cl

6M Guanidiniumhydrochlorid

pH 8,0

Imidazol-Lysepuffer

50mM Phosphatpuffer pH 8,0

300mM NaCl

10mM Imidazol

pH 8,0

Waschpuffer

Harnstoff-Waschpuffer

8M Harnstoff
100mM Phosphatpuffer 8,0
10mM Tris·Cl
pH 6,3

Imizadol-Waschpuffer

50mM Phosphatpuffer
300mM NaCl
20mM Imidazol
pH 8,0

Elutionspuffer

Harnstoff-Elutionspuffer

8M Harnstoff
100mM Phosphatpuffer
10mM Tris·Cl
pH 4,5

Imidazol-Elutionspuffer

50mM Phosphatpuffer
300mM NaCl
250mM Imidazol
pH 8,0

10x β -Agarase-Puffer

NEB

Ligase-Puffer 10x

NEB

Master I PCR

Advanced Biotechnologies Ltd.

Extensor I Puffer

Advanced Biotechnologies Ltd.

Laemmli Puffer (5x Ladepuffer)

6,25g Tris (0,125M)
5,75ml 85% Glycerin (10%)
11,5ml 10% SDS
0,77g Dithiothreitol (DTT)
20 ml H₂O

Tricin-Puffer

50mM Tricin
10mM CaCl₂
400mM NaCl
pH 7,5

10x Laufpuffer für SDS-PAGE

0,25M Tris
1,92M Glycin
10g SDS
auf 1l H₂O (pH nicht einstellen)

Acrylamid-Lösung 40%

Amresco

Bis-Acrylamid-Lösung 2%

Amresco

Transferpuffer

25mM Tris•HCl, pH 8,3

150mM Glycin

TBS

100mM Tris•HCl, pH 7,5

150mM (0,9%) NaCl

TBS-Tween

20mM Tris•HCl, pH 7,5

500mM NaCl

0,05% (v/v) Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan monolaurate, Sigma P1379)

DAB-Lösung

100mM Tris•HCl, pH 7,4

0,8mg/ml Diaminobenzidin (DAB)

3,2mM NiSO₄

0,009% H₂O₂ (7,5µl 30% H₂O₂ auf 25ml)

▪ **Primer**

Sigma, ARK, Synthesemaßstab 10nmol, HPLC aufgereinigt, Sequenzen siehe 2.2.2.2.

▪ **Antibiotika**

Kanamycin

Ampicillin

Merck

▪ **Bakterienstämme**

Escherichia coli

- Novablue (DE3)
- Tuner (DE3)
- HMS174 (DE3)
- BL21 (DE3)
- BL21 Lys (DE3)

Novagen

- **Enzyme und andere Proteine**

- Restriktionsenzyme

- NheI, XhoI, NdeI

- NEB

- Bovines Serumalbumin

- (BSA, 10mg/ml)

- Merck

- β-Agarase I

- NEB

- T4 DNA Ligase

- NEB

- Master-Mix 2

- Enzymmix für PCR

- Advanced Biotechnologies Ltd.

- **Plasmide und sonstige DNA**

- Vektor pET38

- Novagen

- Clostridium histolyticum DNA

- Stamm DSM 2158 (100ng/μl)

- **DNA- und Protein- Längenstandards**

- Marker Gelelektrophorese

- GeneRuler® MBI Fermentas, 1kb DNA

- Ladder (Konz.: 0,1mg)

- Lambda DNA-Hind III Digest

- NEB

- BenchMark™ Protein Ladder

- Gibco/Invotrogen

- Prestained Protein Ladder 10-160kD

- MBI Fermentas

- 6xHis Protein Ladder

- Qiagen

- **Nukleotide**

- Master Mix 1

- Advanced Biotechnologies Ltd.

- **Kits**

QIAquick PCR Purification Kit

QIAprep Spin Miniprep Kit

Qiagen

- **Geräte**

Geldokumentation: ImaMaster VDS

Pharmacia Biotech

Heizblock

Biometra Thermoblock TB1

Transformator

Biometra Standard Power Pack P25

PCR-Gerät (Cycler)

MWG Biotech Primus 96 plus

Elektrophoresegerät Easycast™

Owl Separation Systems

(Gelmaße: bxl [cm] = 9x11)

Minigel/SDS-PAGE Gerät

Biometra

(Gelmaße: bxl [cm] = 8,6x7,7)

Geltrockner für Minigele

Biometra

(30x40 drying area; 30°C-110°C)

Homogenisator

Bandelin Sonopuls HD2070

Photometer

Ultrospec 2000

Pharmacia Biotech

- **Software**

FALGPA Assay

Swift Reaction Kinetics

Pharmacia Biotech

- **Sonstiges**

Agarose

NuSieve GTG

Seakem LE Agarose

FMC BioProducts

Coomassie Brilliant Blau G250 Tabletten

Merck

Sypro Orange, Red & Tangerine

Protein Gel Stains

Molecular Probes/Invitrogen

Pro-Q™ Sapphire 365 Oligohistidine Gel

Molecular Probes/Invitrogen

2.2. Methoden

2.2.1. Bakterien

2.2.1.1. Lagerung und Aufzucht

Bakterien (*Novagen*) werden in 100ml LB Medium kultiviert und 2ml Kultur aus der Wachstumsphase oder 1ml Kultur aus der stationären Phase werden mit 1ml Einfrierlösung vermischt und bei -80°C in 1,5ml Mikrozentrifugenröhrchen gelagert. Zur Aufzucht werden die Gefäße kurze Zeit auf Eis gelegt, und mit einer sterilen Öse wird etwas des gefrorenen Mediums abgekratzt. Das Medium wird mit einem 3-Ösen-Ausstrich auf einer LB-Agar-Platte verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien werden in 2ml LB Medium in 20ml Gefäßen unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Diese 2ml werden zur Beimpfung größerer Mengen Medium verwendet. Alternativ kann auch ein ganzes 1,5ml Gefäß mit eingefrorenen Bakterien aufgetaut und zur Beimpfung von 0,5-1l LB Medium verwendet werden.

2.2.1.2. Kompetente Bakterien

Bakterien werden auf einer LB-Agar-Platte mit 10mM MgCl₂ ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine Kolonie wird in 5ml TYM Medium in einem 125ml Kolben unter Schütteln bei 37°C für 2h inkubiert. Die Bakterien werden in 100ml frisches TYM transferiert und unter Schütteln für 2-3h bei 37°C inkubiert bis die optische Dichte 0,5 beträgt (Wellenlänge $\lambda = 550\text{nm}$). Die Bakterien werden in zwei 50ml Zentrifugenröhrchen für 10min bei 800xg pelletiert. Die Pellets werden in 30ml TfbI pro 100ml Startvolumen resuspendiert und für 5-120min auf Eis gestellt (30min für Novablue). Die Bakterien werden mit 800xg für 8min bei 4°C in der Zentrifuge pelletiert und in 4ml TfbII pro 100ml Startvolumen resuspendiert. Je 0,2ml Bakteriensuspension werden in 1,5ml Mikrozentrifugenröhrchen aliquotiert, im Trockeneis-Alkoholbad schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2. Klonierung

2.2.2.1. Vektor

2.2.2.1.1. Verdau

Pipettierschema: 10µl Vektor pET38 (13nM)
 1µl Restriktionsenzym NheI (25.000U/ml)
 bzw. Restriktionsenzym XhoI (20.000U/ml)
 4µl 10x Puffer 2 für Restriktionsverdau
 4µl Bovines Serum Albumin (1mg/ml)
 21µl H₂O

Es werden nach obigem Pipettierschema 2 Ansätze mit insgesamt je 40µl in je einem 1,5ml Mikrozentrifugenröhrchen vorbereitet. Dann werden je 30µl aus jedem Ansatz in ein 1,5ml Mikrozentrifugenröhrchen zusammengegeben. Alle 3 Ansätze (2x 10µl mit NheI bzw. XhoI und 1x 60µl mit NheI und XhoI) werden im Wasserbad bei 37°C für 1h inkubiert. Der Restriktionsverdau mit nur einem Restriktionsenzym wird zur Kontrolle des vollständigen Verdau verwendet und gibt gleichzeitig Hinweise über das Vorliegen des Plasmids in der erwünschten Form mit jeweils einer Schnittstelle für NheI und XhoI.

2.2.2.1.2. Trennung und Isolierung

Die Fragmente werden auf einem 0,8% Agarose-Gel in TAE Puffer und Ethidiumbromid (1:5.000.000) aufgetrennt (Seakem[®] LE Agarose, Gelgröße 9x11cm, 100V, ca 1h). Vor der gewünschten Bande wird ein Stück Gel mit einem Spatel herausgenommen, die Lücke wird mit flüssiger 0,5% NuSieve GTG Agarose in TAE Puffer gefüllt und das Gel zum Verfestigen der NuSieve Agarose in den Kühlschrank gestellt. NuSieve GTG Agarose besitzt einen sehr niedrigen Schmelzpunkt („low melt“ Agarose), kann bei der verwendeten niedrigen Konzentration abpipettiert werden und erleichtert die spätere Isolierung der DNA. Die Elektrophorese wird fortgesetzt, bis sich das Fragment vollständig in der NuSieve GTG Agarose befindet (Kontrolle unter UV Licht). Mit einer Pipette wird die Bande herausgesaugt und ihr Volumen im 1,5ml Mikrozentrifugenröhrchen bestimmt. Ein Zehntel des bestimmten Volumens wird 10x β-Agarase-Puffer zugegeben, 10min auf 65°C erhitzt (Heizblock) und 5min im Wasserbad bei 40°C gekühlt.

2µl 10x β-Agarase-Puffer
2µl β-Agarase (1U/200µl)
in 16µl H₂O

werden auf 40°C vorgeheizt und der geschmolzenen Agarose zugegeben. Die Agarose wird für 1h bei 40°C im Wasserbad verdaut. Danach werden 10% des Volumens 3M Natriumacetat zugegeben, 15min auf Eis gekühlt und 15min bei 16.000xg zentrifugiert (zum Abtrennen unverdauter Agarose). Der Überstand wird mit dem doppelten Volumen 100% Isopropanol versetzt, wodurch die DNA ausfällt. Nach Zentrifugieren (1min bei 16.000xg) wird das Pellet mit 1ml 70% Isopropanol gewaschen, gemischt, wieder zentrifugiert; der Überstand wird abgenommen, man lässt das Pellet an der Luft trocknen und löst es in 40µl 10mM Tris (pH 7,4) auf.

2.2.2.1.3. Quantifizierung

Die zu bestimmende DNA wird zusammen mit 1µl und 5µl HindIII verdauten λ-Phagen DNA (100ng/µl) mit einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Vergleich der Intensitäten der Ethidiumbromid gefärbten Banden unter UV Licht kann die Konzentration der DNA bestimmt werden.

2.2.2.2. Amplifizierung mit PCR

Primer sind Oligonukleotide mit einer Länge von meist 18-30 Basen, die zu den Anfangs- und Endsequenzen der mit PCR zu vervielfältigenden DNA komplementär sind. Die Primer wurden aufgrund der publizierten *C. histolyticum* Kollagenasesequenzen (Genbank Accession Numbers: D87215 und AB026889) entworfen.

I

5': TGGTATTAAGGGGGTGATTG 5baa

3': GGTGGTGCCTTCGGAAAGAT 3baa

Produkt: 3935bp

II

5': nnngctagcTATCGCTTATGATTAAGACT 5baanhe

3': nnnctcgagTTTATTTACCCTTAACTCAT 3baaxho

Produkt: 3042bp

Anmerkung: n steht für ein beliebiges Nukleotid, wobei bei der Synthese jedes der vier möglichen Nukleotide in gleicher Menge zugegeben wird. Diese nnn Sequenzen sind für die Restriktionsenzyme notwendig (s. u.), da sie einen gewissen Überhang von der Restriktionsschnittstelle brauchen, um schneiden zu können. Sequenzen in Großbuchstaben sind komplementär zur publizierten Kollagenasesequenz.

Für die PCR wurde das Extensor Long PCR System der Firma *Advanced Biotechnologies* verwendet.

Pipettierschema: 3,5µl Polymerase-Mix (Nukleotide; 20mM)
 1,5µl 5' Primer (15µM)
 1,5µl 3' Primer (15µM)
 5µl Master I (Puffer)
 36,5µl H₂O
 1µl DNA
 1µl Polymerasegemisch

1. PCR: Primer: 5baa, 3baa, DNA: genomische *C. histolyticum* DNA (2,5µl, ≈ 100ng/µl, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSM 2158).

2. PCR: Primer: 5baanhe, 3baaxho, DNA: 1µl der vorherigen PCR.

Für die hier durchgeführte Expressionsklonierung sind die Primer automatisch durch den Anfang und das Ende des offenen Leserasters vorgegeben (Primer 5baanhe, 3baaxho). Beide Primer zeichnen sich aber durch einen überdurchschnittlich hohen Gehalt der Basen Adenin (A) und Thymin (T) aus, der für eine PCR nicht wünschenswert ist (niedrige Schmelztemperatur, Gefahr von Schleifenbildung oder Primerhybridisierung, Gefahr von Fehlhybridisierung, da AT reiche Sequenzen häufig in Genomen auftreten). Es wurde daher eine geschachtelte („nested“) PCR durchgeführt, bei der die Primer 5baa und 3baa vor und hinter dem offenen Leseraster hybridisieren und für eine PCR optimale Eigenschaften aufweisen.

Im ersten Schritt wird das Kollagenasegen baa mit den Primern 5baa und 3baa unter optimalen PCR Bedingungen amplifiziert. Das offene Leseraster (ORF) des Gens wird in der zweiten PCR mit den Primern 5baanhe und 3baaxho und der amplifizierten DNA aus der ersten PCR als Template amplifiziert. Da als Template hauptsächlich die DNA aus der

ersten PCR vorliegt, kann eine erfolgreiche Amplifikation auch unter weniger günstigen PCR Konditionen erreicht werden.

2.2.2.2.1. Aufreinigung und Verdau

Salze, überschüssige Nukleotide, Primer und Enzyme werden mit dem PCR Purification Kit von *Qiagen* entfernt. Die amplifizierte DNA wird mit den gleichen Restriktionsenzymen (NheI und XhoI) wie der Vektor pET38 verdaut. Damit ist eine gerichtete Klonierung des Fragments in den Expressionsvektor möglich.

Nach dem Pipettierschema werden

20µl aufgereinigtes PCR Produkt
2µl Restriktionsenzym NheI (15µM)
2µl Restriktionsenzym XhoI (15µM)
5µl 10x Puffer2
5µl BSA (c = 1mg/ml)
16µl H₂O

bei 37°C (Wasserbad) inkubiert (1h). Die Identifizierung des Fragments erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese und Molekulargewichtsmarker. Die Isolierung der DNA wird wie oben beschrieben durchgeführt (siehe 2.2.2.1.2. Trennung und Isolierung).

2.2.2.3. Ligation und Transformation

Vektor und PCR Fragment werden zu etwa gleichen Mengen mit DNA T4 Ligase bei 16°C inkubiert (4-5h).

Pipettierschema: 1µl T4 DNA Ligase (400.000U/ml)
2µl 10x Ligasepuffer
2µl pET38 (abhängig von der Konzentration nach Aufreinigung)
4µl Fragment (abhängig von der Konzentration nach Aufreinigung)
11µl H₂O

Als Kontrolle wird ein Ansatz ohne das Fragment durchgeführt.

Kompetente Bakterien werden auf Eis aufgetaut und mit 1-100ng Plasmid DNA oder 2-5µl eines Ligationsansatzes (siehe oben) inkubiert (10min, 4°C). Danach erfolgt ein Hitzeschock (2min bei 42°C) und 5min Inkubation auf Eis. Die Bakterien werden in 900µl LB in einem 12ml Zentrifugenröhrchen geschüttelt (37°C, 1h).

Zur Selektion werden 100-200µl Bakteriensuspension auf Antibiotika-haltige LB-Agar-Platten (bei pET38 1mM Kanamycin) ausgestrichen und bei 37°C (Inkubator) über Nacht inkubiert. Nur Bakterien mit dem Antibiotikaresistenzgen können auf diesen Platten wachsen. Beim Ligationsansatz sollten deutlich mehr Kolonien vorhanden sein als auf Platten, die mit dem Kontrollansatz (ohne Fragment siehe oben) ausplattiert wurden. (Auf dem Kontrollansatz finden sich Kolonien von spontan resistenten Bakterien bzw. Bakterien mit selbstligiertem Plasmid oder Plasmidkontaminationen im Ansatz).

2.2.2.4. Minipreps und Minigele

6-8 Kolonien werden in je 4ml LB Medium mit Kanamycin (1mM) überführt und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Aus 3ml der Bakterienkultur wird mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (*Qiagen*) Plasmid DNA isoliert. Das in dem Kit angewandte Prinzip beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit anschließender Adsorption der DNA an Silica-Gel unter hoher Salzkonzentration. Nach Restriktionsenzymverdau wird die isolierte DNA auf einem 0,8% Agarose-Gel in TBE Puffer und Ethidiumbromid (1:5.000.000) aufgetrennt (Seakem[®] LE Agarose, Gelgröße 9x11cm, 100V, ca. 1h). Die Visualisierung des Gels und die Identifizierung der Bakterienklone mit dem korrekt klonierten Vektor erfolgt mit dem Imagemaster VDS von *Pharmacia Biotech*.

Pipettierschema: 3µl DNA
 1µl NdeI (20.000U/ml)
 2µl 10x Puffer² für Restriktionsverdau
 14µl H₂O

2.2.3. Induktion

2.2.3.1. Parameter

Bakterien werden in 50ml LB Medium ohne Antibiotikumzusatz in Polycarbonat-Kolben mit Schikanen unter Schütteln (Inkubator, 37°C) angezüchtet bis die optische Dichte 0,5 (Wellenlänge $\lambda = 600\text{nm}$) erreicht wird (Ausgangsmaterial: Kolonie von Agar-Platte, eingefrorene Bakterien oder wenige Tage alte bakterielle Kulturen). Bakterien in 300ml LB mit 1mM Kanamycin weiter züchten bis die optische Dichte bei 0,5 liegt ($\lambda = 600\text{nm}$). Die Bakterienkultur wird gleichmäßig auf Polycarbonat-Kolben (Zahl abhängig von Art und Anzahl der variierten Parameter) verteilt. Isopropyl-D-Thiogalactopyranosid (IPTG 1mM)

wird zugegeben, unter Schütteln inkubiert (Temperatur und Zeitdauer nach Versuchsordnung). Die OD_{600} wird stündlich gemessen.

2.2.3.2. Kontrolle

Vor der Induktion mit IPTG wird die Induzierbarkeit der Bakterien mit folgendem Test überprüft: Die Bakteriensuspension wird in LB Medium verdünnt (2×10^{-6} und 10^{-5}). Jeweils $50 \mu\text{l}$ der Verdünnung 2×10^{-6} werden auf LB-Agar-Platten ohne Zusatz und LB-Agar-Platten mit 1mM Kanamycin plattiert. $50 \mu\text{l}$ der Verdünnung 10^{-5} werden auf LB-Agar-Platten mit 1mM IPTG und LB-Agar-Platten mit 1mM IPTG und 1mM Kanamycin plattiert. Die Platten werden bei 37°C über Nacht inkubiert.

Die Bakterien, die den korrekt ligierten Vektor pET38/baa aufgenommen haben, sind zum einen resistent gegen Kanamycin und zum anderen stellen sie ihr Wachstum nach Induktion mit IPTG zugunsten der Kollagenasebildung ein, beziehungsweise zeigen verlangsamtes Wachstum. Auf den LB-Agar-Platten ohne weitere Zusätze wird die größte Anzahl an Klonen erwartet. Mit dem Zusatz von Kanamycin werden alle Klone selektiert, die gegen Kanamycin resistent sind. Im besten Fall besteht bezüglich der Anzahl der ausgezählten Klone auf den reinen LB-Agar-Platten und auf denen mit Kanamycin-Zusatz kein wesentlicher Unterschied. Das würde auf eine hohe Effizienz der Ligation und Transformation und eine geringe Rate von Spontanmutationen beziehungsweise Infektion der Agar-Platten hinweisen. Durch den Zusatz von IPTG erfolgt eine Wachstumshemmung bzw. Wachstumsverlangsamung bei den durch IPTG induzierbaren Bakterien. Auf diesen Platten werden daher wesentlich geringere Klonzahlen erwartet als auf den Platten ohne IPTG-Zusatz. Auf den Platten mit Zusatz sowohl von Kanamycin als auch IPTG sollten alle Bakterien mit pET38/baa durch ihre vektorvermittelte Kanamycinresistenz selektiert und durch IPTG im Wachstum gehemmt werden. Hier ist das geringste Bakterienwachstum zu erwarten.

2.2.3.3. Analyse

2.2.3.3.1. Lyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 2 Formen der Lyse durchgeführt:

- **Ultraschall**

Die Bakterienkultur wird auf 50ml Zentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert (5min , $5000 \times g$, 4°C). Der Überstand wird bei $+4^\circ\text{C}$ gelagert. Zu den pelletierten Bakterien $1,5 \text{ml}$ Lysepuffer ($\text{pH } 8,0$) zugeben und mischen. Dann werden die Bakterien mit gepulstem Ult-

raschall lysiert (Bandelin Sonopuls HD2070, 2min 50sec; Zyklus (relative Pulsdauer) 50%; Power (Leistung) 80%). Vom Rohlysat („crude lysate“) werden 100µl bei -20°C gelagert. Der Rest des Lysats im 50ml Zentrifugenröhrchen wird zentrifugiert (30min, 9.000xg). Der Überstand („clear lysate“) wird abpipettiert und bei -20°C gelagert.

- **BugBuster™**

Anmerkung: Es wurde nicht die im *Novagen* Protokoll angegebene Benzonase™ (= DNaseI) verwendet, sondern DNaseI von *Epicentre Technologies* (1U/µl). Die Lysemethode mit dem BugBuster™ Reagens und Endonuclease System von *Novagen* beruht auf einer Mischung aus nicht-ionischen Detergentien, die Bakterienzellwände zerstören ohne Denaturierung der löslichen Proteine, und einer Endonuclease zum Abbau von DNA. Intrazelluläre lösliche Proteine werden freigesetzt. 40ml Bakterienkultur werden in 50ml Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (10.000xg, 10min). Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird gewogen und in 5ml BugBuster™ Reagens pro Gramm resuspendiert. Dann wird DNaseI (1U/µl, *Epicentre Technologies*) im Verhältnis zu BugBuster™ Reagens von 1:1.000 zugegeben und vorsichtig mit dem Lysat vermischt (10-20min). Die Mischung wird zentrifugiert (16.000xg, 20min, 4°C), unlöslicher Zellschrott setzt sich am Boden ab, und der Überstand kann bei -20°C gelagert werden.

2.2.3.3.2. SDS-PAGE

Der Name ist englisch und steht für: sodium dodecyl sulfate, SDS; Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, PAGE. Die Proteine werden auf einem 8% Polyacrylamidgel in SDS Laufpuffer nach Größe aufgetrennt (Gelgröße 8,6x7,7cm, 100V, ca. 1,5-2h).

Für ein 8% Proteingel werden

- 2,96ml H₂O
- 3,74ml 1M Tris-HCl, pH 8,8
- 3,20ml Acrylamidlösung (25% Acrylamid, 0,67% N, N'-Methylen-bisacrylamid in aqu.dest.)
- 0,10ml 10% SDS
- 5,7µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- 15µl 10% Ammoniumperoxidisulfat (APS)

in einem 100ml Erlenmeyer-Kolben vermischt und zwischen die abgedichteten Glasplatten gegossen (Trenngel). Darüber wird eine luftabschließende Schicht Butanol gegeben. Nach Polymerisation des Trenngels (Dauer ca. 15-20min) wird die Butanolschicht abgegossen,

die Oberfläche des Trenngels mit destilliertem Wasser mehrmals gewaschen. Auf die Trenngelschicht wird das Sammelgel gegossen.

Pipettierschema für das Sammelgel: 3,575ml H₂O

0,625ml 1M Tris-HCl, pH 6,8

0,750ml Acrylamidlösung (Zusammensetzung s.o.)

50µl 10% SDS

10µl TEMED

15µl 10% APS

In das Sammelgel wird der Kamm für die Kammern gesteckt und bis zur vollständigen Polymerisation des Gels abgewartet. Das SDS-PAGE Gel wird in die mit SDS Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt und bis zur Bedeckung der Geltaschen mit Laufpuffer aufgefüllt. Die Proben werden im Verhältnis 1:100 mit Aqua dest. verdünnt und mit dem Photometer bei der Wellenlänge $\lambda = 280\text{nm}$ auf ihre optische Dichte untersucht. Entsprechend dem Wert ihrer optischen Dichte werden die Proben durch Verdünnung mit Aqua dest. auf einen gemeinsamen Wert bezüglich ihrer OD₂₈₀ gebracht. Die Vereinheitlichung der optischen Dichte der Proben ermöglicht den direkten Vergleich der Banden bezüglich ihrer Proteinmenge auf dem fertigen SDS-PAGE-Gel und lässt nicht einzelne Bahnen mit hohem Proteingehalt stark hervortreten, während andere mit niedrigem Proteingehalt im Vergleich kaum zum Vorschein kommen. Nach Zugabe von 3x-Ladepuffer werden die Proben für 10min bei 100°C in den Heizblock gegeben und denaturiert. Die Geltaschen werden mittels Pipette (Hamilton Glaspipette) mit den Proben (15µl incl. Ladepuffer) befüllt.

▪ **Coomassie-Blue-Färbung**

Das Proteingel wird unter Schwenken in 25% Isopropanol und 10% Essigsäure (Volumen ca. 50ml) eingelegt (30-60min). Die Färbung erfolgt mit 0,006% Coomassie Brilliant Blue G250 in 10% Essigsäure unter ständiger Bewegung des vollständig mit Lösung bedeckten Gels (2-10h). Das Entfärben wird in 10% Essigsäure vorgenommen (ca. 2h). Das Gel kann bei 4°C in 7% Essigsäure oder H₂O gelagert oder anschließend getrocknet werden. Die Sensitivität der Färbemethode liegt bei etwa 0,1µg pro Bande.

▪ **Silber-Färbung**

Das Proteingel wird unter Schwenken in folgender Reihenfolge mit den angegebenen Lösungen (alle in H₂O) inkubiert:

Reihenfolge	Lösung	Inkubationsdauer
1	50% Methanol, 12% Trichloressigsäure (TCA), 2% CuCl ₂	30min
2	Lösung A (10% Ethanol, 5% Essigsäure)	15min
3	0,01% KMnO ₄	15min
4	Lösung A	15min
5	10% Ethanol	15min
6	H ₂ O	15min
7	0,1% AgNO ₃	15min
8	H ₂ O	20sec
9	10% K ₂ CO ₃	1min
10	0,01% Formaldehyd in 2% K ₂ CO ₃	4-15min bis die Banden gut sichtbar braun hervortreten

Das Gel wird in Lösung A gewaschen und in H₂O bei 4°C gelagert oder getrocknet⁶⁵. Die Silbermethode erlaubt die Darstellung von bereits sehr kleinen Proteinmengen um 0,02µg.

2.2.3.3.3. Pro-Q™ Sapphire 365 Oligohistidin-Färbung

Pro-Q™ Sapphire 365 Oligohistidine Gel Stain von *Molecular Probes/Invitrogen* färbt Proteine mit Poly-Histidin-Tags spezifisch an. Das Minigel wird mit Fixierlösung aus 50% Methanol und 10% Essigsäure in Aqua dest. bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln für 20min inkubiert. Das Gel wird 3x in Aqua dest. für jeweils 20min unter ständiger Bewegung gewaschen. Über Nacht wird es mit dem Farbstoff Pro-Q™ Sapphire 365 Oligohistidine Gel Stain im Dunkeln inkubiert. Das Gel wird mindestens 2x (je nach Hintergrundsignal) für je 20min in Aqua dest. gewaschen. Gefärbte Oligo-His-Fusionsproteine werden durch Fluoreszenz detektiert. Die optimale Anregungswellenlänge ist 365nm, aber auch eine UV Bank wie im Imagemaster kann zur Anregung verwendet werden. Die Emissionswellenlänge beträgt 450nm und wurde im Imagemaster von der Kamera detektiert.

2.2.3.3.4. Western-Blot

Die Proteine werden mit einem 8% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Das Gel wird 60min mit SYPRO Tangerine gefärbt (*Molecular Probes/Invitrogen*) (1:5.000 verdünnt in 50mM Phosphatpuffer, pH 7,0, 150mM NaCl) (nur bei Kollagenase Western ausgeführt). SYPRO Tangerine färbt Proteine, ohne sie zu denaturieren und interferiert nicht mit dem nachfolgenden Transfer. Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff gefärbten Proteine werden unter UV Licht fotografiert (Imagemaster, *Pharmacia Biotech*). Für den Transfer werden die Gele 10min in Transferpuffer + 0,1% SDS inkubiert. Proteine werden in einem Semi-Dry Blotter (*Biometra*) auf eine Biodyne A (*Pall*) Nylonmembran bei konstanten 3W für 60min transferiert. Als Puffer dient Transferpuffer mit 10% Methanol.

- **Ni-NTA-HRP Western-Blot**

Membran 2x 10min in TBS-Tween gewaschen, 60min mit 3% BSA in TBS blockiert, 3x 10min mit TBS-Tween gewaschen, 1h mit Ni-NTA-HRP (*Qiagen*), 1:1.000 verdünnt in TBS-Tween inkubiert und nochmals 3x 10min in TBS-Tween gewaschen. In DAB Lösung gefärbt.

- **Anti-poly-His-Antikörper Western-Blot**

Membran 10min in TBS gewaschen, 60min in TBS + 2% SlimFast Schokolade (proteinhaltiges Schlankheitsgetränk aus dem Supermarkt) blockiert, 2x 10min in TBS-Tween gewaschen und 60min mit 2µl anti-His-Tag monoklonalem Antikörper (*Novagen*) (0,2µg/ml) in 4ml TBS + 3% BSA inkubiert. Anschließend wieder 3x in TBS-Tween gewaschen, 30min in Meerrettichperoxidase-konjugiertem Sekundäantikörper inkubiert (3µl Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin (*DAKO*) in 4ml TBS + 3% BSA) und nach 3x Waschen in TBS Tween in DAB-Lösung gefärbt.

- **Anti-Kollagenase Antikörper**

Wasch- und Blockierschritte wie zuvor beschrieben. Primäantikörper (5µl Zellkulturüberstand LDS 81, freundlicherweise von Prof. R.F.L. James, University of Leicester, UK, zur Verfügung gestellt⁵⁹, in 5ml TBS + 1% Casein verdünnt und Membran 60min inkubiert. Sekundäantikörper wie zuvor, aber in 5ml TBS + 1% Casein. Färbung in 1-Step-TMB-Blotting™ (*Pierce*).

2.2.4. Isolierung

2.2.4.1. Aufreinigung

Die Aufreinigung des Proteins aus den Lysaten erfolgt mit Ni-NTA-Säulchen von *Qiagen*. Die Säulchen bestehen aus Silica mit Nitrilotriessigsäure (NTA), einem Chelatbildner, der

Ni²⁺-Ionen, die von Polyhistidinketten gebunden werden, im Chelatzentrum bindet. Die Säulchen sind bereits mit Ni²⁺ beladen. Nach Auftragen der Lysate, die das Protein mit Polyhistidinkette enthalten, bindet es an Ni-NTA bis es eluiert wird. Die Elution erfolgt unter denaturierenden Bedingungen in saurem Milieu (pH 4,5), und unter nicht-denaturierenden Bedingungen unter hohen Konzentrationen von Imidazol, das kompetitiv mit dem Poly-His-Protein um die Bindungsstellen konkurriert.

2.2.4.1.1. Denaturierend

Die Ni-NTA-Säulchen werden mit 600µl Harnstoff Lysepuffer equilibriert und zentrifugiert (2min, 700xg). Dann werden 600µl Lysat auf die Säulchen gegeben und wieder zentrifugiert (2min, 700xg). Die Säulchen werden dann 2x jeweils mit 600µl Harnstoff-Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert (2min, 700xg). Die Elution des Proteins erfolgt in 2 Schritten jeweils mit 200µl Harnstoff Elutionspuffer und erneuter Zentrifugation (2min, 700xg).

2.2.4.1.2. Nicht-Denaturierend

Die Ni-NTA-Säulchen werden mit 600µl Imidazol Lysepuffer equilibriert und zentrifugiert (2min, 700xg). Dann werden 600µl Lysat auf die Säulchen gegeben und wieder zentrifugiert (2min, 700xg). Die Säulchen werden anschließend 2x mit jeweils 600µl Imidazol Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert (2min, 700xg). Die Elution erfolgt in 2 Schritten jeweils mit 200µl Imidazol Elutionspuffer und erneuter Zentrifugation (2min, 700xg).

2.2.4.2. Dialyse

In dieser Arbeit wurden Kontrollproteine mit Oligohistidindomänen zunächst in dem üblicherweise bei der Aufreinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen verwendeten Imidazol Lysepuffer gelöst. Im Verlauf wurde die Elimination von Imidazol aus der Lösung notwendig, die durch ein Dialyseverfahren realisiert wurde. Als Dialysekammern werden QuixSep[®] Micro Dialyzer mit einem Fassungsvermögen von 1 ml mit einer semi-permeablen Membran (76µm, Trennschärfe 12-14kD, Vol/cm = 18,4) von *Membrane Filtration Products, Inc.* verwendet. Die Kammern werden mit 0,5ml Proteinlösung gefüllt und in ein 1.000ml Becherglas, das mit 800ml Lysepuffer ohne Imidazol (gleiche Zusammensetzung wie Lysepuffer ohne Imidazol) gefüllt ist, gelegt. Die Lösung wird für 1h unter ständiger Bewegung gehalten. Dann wird der Dialysepuffer verworfen und die Dialyse mit 800ml neuer Pufferlösung ohne Imidazol wieder für 1h unter ständigem Rühren fortge-

setzt. Nach diesem Verfahren ist davon auszugehen, dass Imidazol mit einem Molekulargewicht von 68 Dalton nicht mehr vorhanden ist und das Kontrollprotein mit einem Molekulargewicht von 35kD in der Dialysekammer verbleibt.

2.2.5. Aktivitätsmessung

Die Enzymaktivitätsmessung wird mit dem FALGP Assay durchgeführt⁶⁶. Der FALGP Assay ist eine kinetische Aktivitätsbestimmung und beruht darauf, dass der Farbstoff 2-Furanacryloyl-L-Leucylglycyl-L-Prolyl-L-Alanin (FALGP) als Substrat für die Kollagenase dient. Durch den enzymatischen Verdau des Farbstoffs durch die Kollagenase ändert sich die Extinktion der Lösung, die über 30min kontinuierlich bei einer Wellenlänge λ von 345nm gemessen wird. Als Referenz dient Kollagenase XI von *Sigma* ($c = 2,5\text{mg/ml}$, FALGP Hydrolyse Aktivität = $4,7\text{U/mg}$), die den Farbstoff FALGP ($c = 2\text{mg/ml}$) enzymatisch abbaut. Als Reaktionspuffer dient ein Tricin Puffer. Die Auswertung der Messungen erfolgt mit dem Photometer und der Software Swift Reaction Kinetics von *Pharmacia Biotech*. Über einen Zeitraum von 30min wird im Abstand von 15sec die Absorption der Lösungen gemessen. Es erfolgt die graphische Darstellung der gemessenen Absorptionswerte. In der graphischen Darstellung entspricht die Steigung der Tangente an die jeweilige Kurve der Enzymaktivität der in der Probe enthaltenen Kollagenase (Abb. 17). Je steiler der dargestellte Extinktionsverlust der untersuchten Lösung, desto stärker ist die Enzymaktivität.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung

3.1.1. Strategie

(a) Kollagenasegen baa

Für die Klonierung wurden von den verschiedenen *C. histolyticum* Genen für die Kollagenasen die Sequenz mit der Genbanknummer D87215 ausgewählt. Diese Sequenz wurde bereits zuvor erfolgreich für eine Klonierung eingesetzt⁶⁷. Der korrespondierende Eintrag in den Proteindatenbanken hat die Nummer BAA77435, daher die im Folgenden verwendete Kurzbezeichnung baa. Das Gen wurde mit PCR amplifiziert, allerdings nicht das gesamte Leseraster („open reading frame“), sondern nur die Sequenz, die dem sezernierten Protein entspricht (also ohne Signalpeptid). Da die Enden dieser Sequenz für die PCR sehr ungünstig sind (AT reich), wurde die Sequenz zuerst mit weiter außen liegenden Primern aus genomischer *C. histolyticum* DNA amplifiziert, bevor die eigentliche Sequenz in einer zweiten PCR aus dem Produkt der ersten PCR dargestellt wurde. In dieser zweiten PCR wurden auch die Restriktionsschnittstellen *NheI* und *XhoI* für die Klonierung eingefügt.

(b) Vektor pET38

Der Vektor wurde wegen seiner Regulierbarkeit durch IPTG, der Möglichkeiten der späteren Proteinaufreinigung und seiner Signalsequenz für den Transport des Expressionsprodukts ins Periplasma ausgewählt. Daher wurde auch die Signalsequenz von baa entfernt. Er wurde mit den beiden Restriktionsenzymen *NheI* und *XhoI* verdaut, wie auch das Kollagenasegen baa. Durch Erzeugung unterschiedlicher Überhänge war eine gerichtete Klonierung möglich (Abb. 2 und Abb. 3).

(c) Klonierung

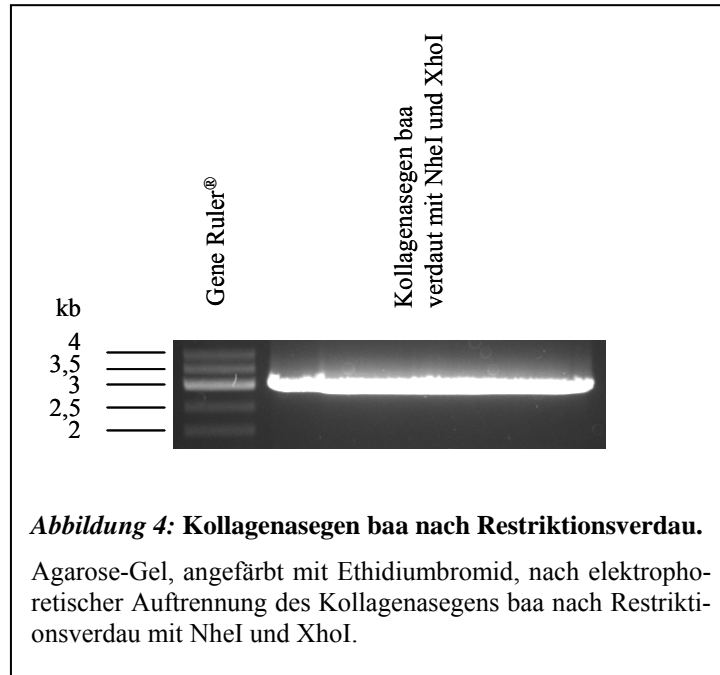
Bei der Klonierung wurde darauf geachtet, dass der Leserahmen von Vektor (Signalsequenz N-terminal, Tags C-terminal) und baa Sequenz übereinstimmten. Das erwartete rekombinante Produkt hatte folgenden Aufbau ist in folgender Abbildung dargestellt.

3.1.2. Vektor pET38

Das Kollagenasegen baa soll in die NheI (Position 549) und XhoI (Position 615) Restriktionsschnittstellen des Klonierungsvektor pET38b kloniert werden. Dafür wurde jeweils ein Restriktionsverdau des Plasmidvektors mit NheI und XhoI angesetzt, und 80% der Einzelansätze wurden zu einem sogenannten „Doppelverdau“ vereint. Alle drei Ansätze wurden auf einem TAE-Agarose-Gel aufgetrennt. Die beiden „Einzelverdaus“ zeigten die für linearisierte DNA typische Einzelbande mit der erwarteten Größe von 5,8kB. Hätte einer der Verdaus nicht funktioniert, wäre ein Bandenmuster mit mindestens 3 Banden, wie es für überspiralisierte („supercoiled“) Plasmid DNA typisch ist, aufgetreten. Da beide „Einzelverdaus“ vollständig waren, kann man davon ausgehen, dass auch der „Doppelverdau“ erfolgreich war, da beide Ansätze in demselben Puffer angesetzt wurden. Durch den „Doppelverdau“ wird ein 66bp langes Fragment aus dem Vektor freigesetzt. Da dieses Fragment aufgrund der geringen Intensität auf dem Gel nicht sichtbar ist und sich mit Agarose-Gelen ein Größenunterschied von 5,831kB (Einzelverdau) gegenüber 5,755kB (Doppelverdau) nicht auflösen lässt, ist die Überprüfung eines erfolgreichen „Doppelverdaus“ ohne die Einzelverdaukontrollen auf einem Agarose-Gel nicht möglich. Der NheI-XhoI doppelverdaute Vektor wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt, um das 66bp Fragment zu entfernen, das bei der nachfolgenden Klonierung stören würde (2.2.2.1.3.).

3.1.3. Kollagenasegen baa und sein Produkt

Wie bereits in den Ausführungen zur Klonierungsstrategie ausgeführt, wurden dem Kollagenasegen baa in einer zweiten PCR die Restriktionsschnittstellen für die beiden Restriktionsenzyme NheI und XhoI angefügt. Das PCR Produkt wurde aufgereinigt und mit NheI und XhoI (2.2.2.3.1.) in einem Ansatz geschnitten. Das nun mit Überhängen („sticky ends“) versehene PCR Fragment wurde auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und aufgereinigt, um die kurzen Oligonukleotide, die durch den Restriktionsverdau freigesetzt wurden, zu entfernen. Auf dem Agarose-Gel wies das Fragment die erwartete Größe von 3,042kb auf (Abb. 4).



3.1.4. Ligation und Transformation

Nach dem Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen NheI und XhoI weisen pET38b und baa komplementäre Überhänge auf, die eine gerichtete und effektive Ligation ermöglichen. Die ungefähre Konzentration der Fragmente wurde auf einem Agarose-Gel im Vergleich zu einem HindIII Marker bestimmt und äquimolare Mengen der Fragmente wurden für die Ligation angesetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz, in dem das baa Fragment weggelassen wurde. Der Ligationsansatz wurde 5h bei 16°C inkubiert und durch Zugabe von 1µl 0,5M EDTA gestoppt. In der Regel wurden 2µl jedes Ligationsansatzes verwendet, um 100µl kompetente BL21 (DE3) Bakterien zu transformieren. 50 und 200µl der Transformationsansätze wurden auf Kanamycin-haltige Agarose-Platten ausgestrichen. Nur Bakterien, die den Vektor pET38 aufgenommen haben, können auf einem solchen Medium wachsen.

Auf den Platten mit dem Kontrollansatz sind deutlich weniger Kolonien detektierbar (Tabelle 1). Sie stammen vermutlich von minimalen Verunreinigungen des unverdauten oder nur einmal geschnittenen Vektors. Man kann daher davon ausgehen, dass die Kolonien auf den Platten mit dem Ligationsansatz erfolgreich mit dem rekombinanten Vektor pET38/baa transformiert wurden. Zur Kontrolle wurden je nach Versuchsreihe 4-6 Kolonien in je 4ml LB-Kanamycin angezüchtet und Plasmid DNA aus den Bakterien isoliert.

	50µl	200µl
pET38/baa	30.000 Kolonien/µg DNA	38.000 Kolonien/µg DNA
pET38 Ctrl.	6.600 Kolonien/µg DNA	5.000 Kolonien/µg DNA

Tabelle 1: Transformationseffizienz des ligierten Vektors und des Kontrollansatzes.

3.1.5. Selektion der Klone

Die Plasmid DNA wurde mit NdeI verdaut, um zu überprüfen, ob die angezüchteten Klone mit dem rekombinanten Vektor pET38-baa transformiert wurden. Der originale, unveränderte Vektor pET38 wird durch diesen Verdau linearisiert und liefert ein Fragment der Größe 5,821kb. Der rekombinante Vektor pET38-baa dagegen liefert 3 Fragmente von 6,492kb, 1,587kb und 0,706kb. Abbildung 5 zeigt auf den Bahnen 2 und 4 dieses Bandenmuster. Die Klone, deren Plasmid DNA auf diesen Bahnen aufgetragen wurden, enthalten den gewünschten rekombinanten Vektor pET38/baa. Für die weiteren Versuche wurde der Klon, der auf Bahn 2 aufgetragen wurde, verwendet.

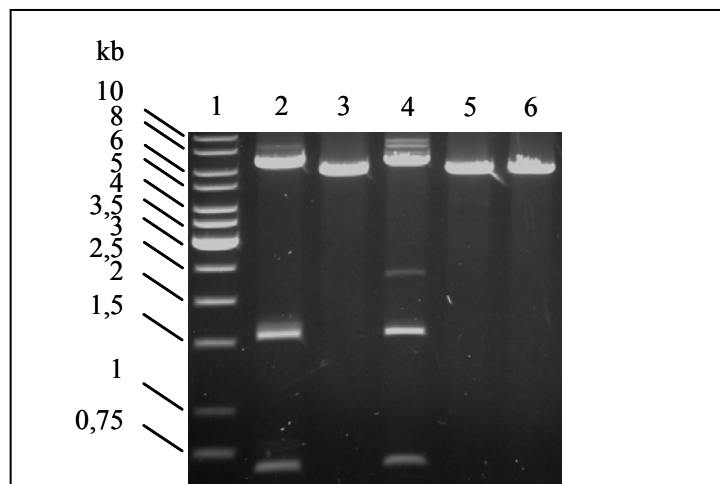


Abbildung 5: Selektion der Klone.

Ethidiumbromid-gefärbtes Agarose-Gel. Bahn 1 zeigt den Größenmarker GeneRuler®, auf den Bahnen 2-6 ist jeweils die aus einem Klon isolierte Plasmid DNA nach Restriktionsverdau mit NdeI aufgetragen. Auf den Bahnen 2 und 4 sind die erwarteten Bandenmuster des Vektors pET38/baa zu erkennen. Die auf Bahn 4 noch zusätzlich sichtbaren Banden sind am ehesten auf einen unvollständigen Restriktionsverdau zurückzuführen.

3.1.6. Transformation in exprimierende Bakterienstämme

Mit der Plasmid DNA des oben beschriebenen Klons wurden die unten aufgelisteten Expressions-kompetenten Bakterien (λ -Phagen DE3 induziert) transformiert. Die unterschiedlichen Transformationsergebnisse hierbei sind auf unterschiedliche Transformationseffizienzen zurückzuführen.

<u>Bakterienstamm</u>	<u>Transformationsergebnis</u>
BL 21(DE3)	43.000 Kolonien/ μ g DNA
BL21 LysS (DE3)	3.300 Kolonien/ μ g DNA
HMS 174 (DE3)	157.000 Kolonien/ μ g DNA
Novablue (DE3)	660.000 Kolonien/ μ g DNA
Tuner (DE3)	28.300 Kolonien/ μ g DNA

3.2. Expressionsoptimierung

3.2.1. Induktion

Die Expression von pET 38 kann nur induziert werden, wenn das Plasmid in Bakterienstämme eingebracht wird, die über das T7 RNA Polymerase Gen verfügen. Dieses Gen wurde bei den hier verwendeten Bakterienstämme mit dem lysogenen Phagen λ DE3 eingebracht, der das Gen für die T7 RNA Polymerase unter Kontrolle des lacUV5 Promotors trägt. Das Gen wurde dabei stabil in das bakterielle Genom integriert. Wie bereits zuvor beschrieben, erfolgt die Induktion zur Expression unter physiologischen Bedingungen mit Lactose, die an den lac Repressor bindet. Dadurch löst sich der Repressor vom Promotor und die Genexpression wird ermöglicht. Im Labor wird die Lactose durch IPTG (Isopropyl-D-Thiogalactopyranosid) ersetzt (siehe Abb. 1, Seite 4). Die Bedingungen für eine optimale Gen- und Proteinexpression müssen empirisch ermittelt werden. Die dabei untersuchten Parameter werden im Folgenden dargestellt.

3.2.1.1. Bakterienstämme

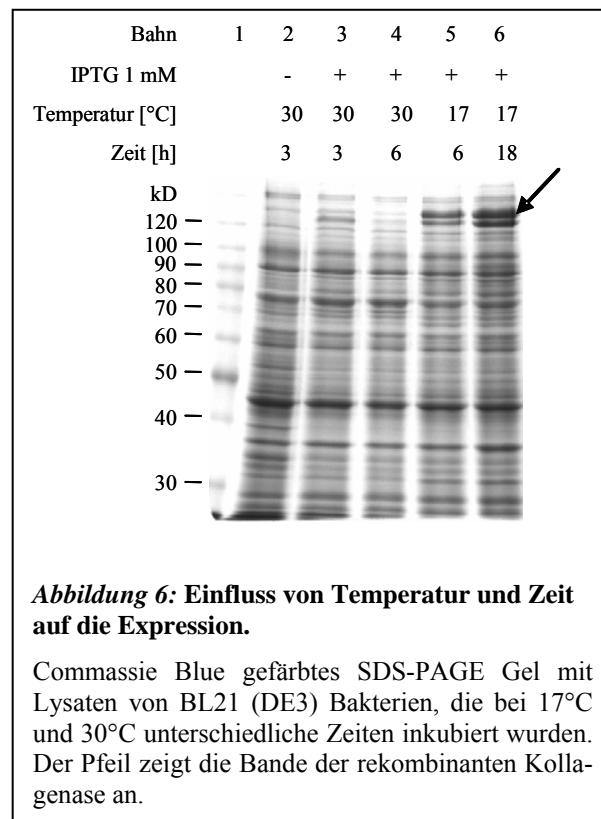
Für die Versuche zur Expression des Proteins wurden insgesamt 5 verschiedenen Bakterienstämme von *Novagen* verwendet:

- BL21 (DE3)
- BL21 LysS (DE3)
- HMS174 (DE3)
- Novablue (DE3)
- Tuner (DE3)

Alle Bakterienstämme sind lysogene E. coli Bakterien des Bakteriophagen DE3, sie besitzen damit alle das Gen für die T7 RNA Polymerase. Mit den pET Vektorsystemen von *Novagen* haben sich alle als hochstringente Expressionsbakterien erwiesen, wobei E. coli Tuner (DE3) eine zusätzliche Eigenschaft besitzt: Die Expression bei diesem Stamm kann durch Zugabe von IPTG nicht nur wie bei den anderen aktiviert, sondern durch unterschiedliche Mengen an IPTG bezüglich des Expressionsausmaßes modifiziert werden.

3.2.1.2. Zeit und Temperatur

Bei allen Stämmen wurde die Expression bei 30°C 3h und 6h nach Induktion und bei 17°C 6h und 18h (über Nacht) nach Induktion gemessen. Die Induktion (= Zugabe von IPTG) wurde bei einer optischen Dichte (OD_{600}) von durchschnittlich 0,5 der bakteriellen Suspension durchgeführt.



In diesen Versuchen wurde mit BL21 (DE3) die höchste Proteinexpression erreicht. In den folgenden Versuchen wurde nur noch BL21 (DE3) verwendet. Es zeigt sich, dass bei 30°C die Expression des Proteins nach 3 Stunden stärker ausgeprägt ist als nach 6 Stunden. Bei einer Temperatur von 17°C ist jedoch das längere Zeitintervall von etwa 18 Stunden im Vergleich zu 6 Stunden das in der Expression ergiebigere (Abb. 6). Um die Expression zu

quantifizieren, wurden die SDS-PAGE Gele digitalisiert. Mit Hilfe des Computers wurde die Intensität der Banden bestimmt. Hierbei ergab sich für die 132kD Bande auf Bahn 5 (BL21 (DE3), IPTG, 17°C, 6h) eine Pixel Intensität von 130, während die Intensität der entsprechenden Bande auf Bahn 6 (BL21 (DE3), IPTG, 17°C, 18h) bei 170 lag. Aus diesen Werten, die in Relation zur Intensität des Markers gesetzt wurden, konnte für die entsprechende Bande auf Bahn 5 eine Enzymmenge von etwa 1g in der Gesamtkulturmenge von 1l, für die Bande auf Bahn 6 etwa 1,6g Enzym auf 1l Bakterienkultur errechnet werden.

3.2.1.3. Glucose

Bei einem Mangel von Glucose in der stationären Wachstumsphase ist es möglich, dass es zu einer cAMP vermittelten Repression des lac oder lacUV5 Promotors kommt⁶⁸. Um ein solche Repression auszuschließen, wurde dem Medium 1% Glucose zugesetzt. Die Zugabe von Glucose führte jedoch zu keiner erhöhten Expression der rekombinanten Kollagenase, so dass im Weiteren auf eine Zugabe von Glucose verzichtet wurde.

3.2.2. Lyse

3.2.2.1. Lysemethode

Die Ultraschall Lyse (Sonification) gilt als Standardmethode zur Lyse. Sie kann in unterschiedlichen Puffern (denaturierend, nativ) durchgeführt werden. Die BugBuster™ Methode ist laut Aussage des Herstellers *Novagen* der Sonification ebenbürtig, obwohl die Lyse ausschließlich durch Zugabe von Puffern erfolgt. Bei einem direkten Vergleich von Sonification und BugBuster™ war die Sonification jedoch die bessere Methode:

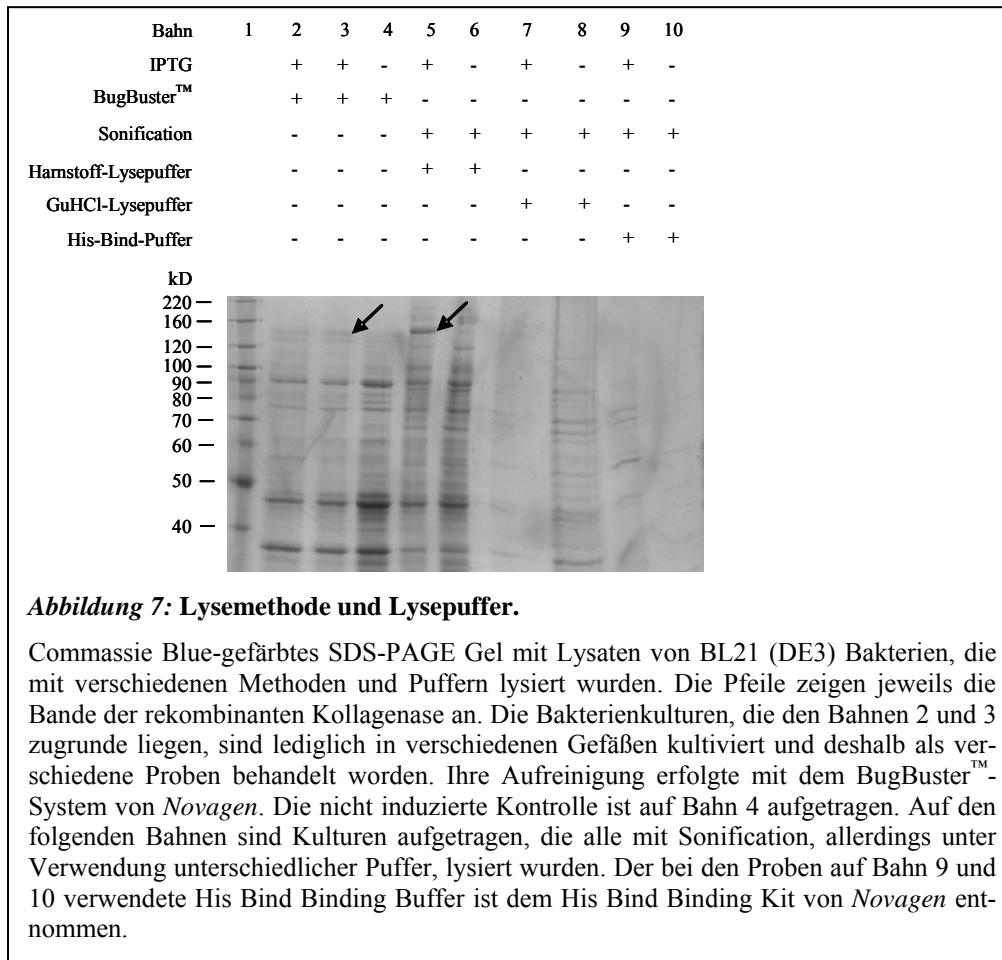


Abbildung 7 zeigt nur eine einzige Bahn, auf der eine Bande im gewünschten Größenbereich von 132kD gut sichtbar ist. Diese wurde mittels Sonification unter Verwendung des Harnstoff-Lysepuffers erreicht. Bei der Lyse mittels Sonification wurden verschiedene Lysepuffer angewendet, diese werden in Punkt 3.2.2.2. näher erläutert. Obwohl zwei voneinander unabhängige Bakterienkulturen angezüchtet wurden, und mit diesen die Lyse mittels BugBuster™ Methode durchgeführt wurde, zeigt sich kein Vorteil in dieser Lyse-methode im Vergleich mit der etablierten Sonification, gemessen an der Intensität der Proteinbande im Bereich 132kD auf den entsprechenden Bahnen auf dem SDS-PAGE-Gel. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ausschließlich die Sonification zur Lyse von Bakterienkulturen gewählt. Dabei wurden folgende Lysepuffer getestet.

3.2.2.2. Lysepuffer

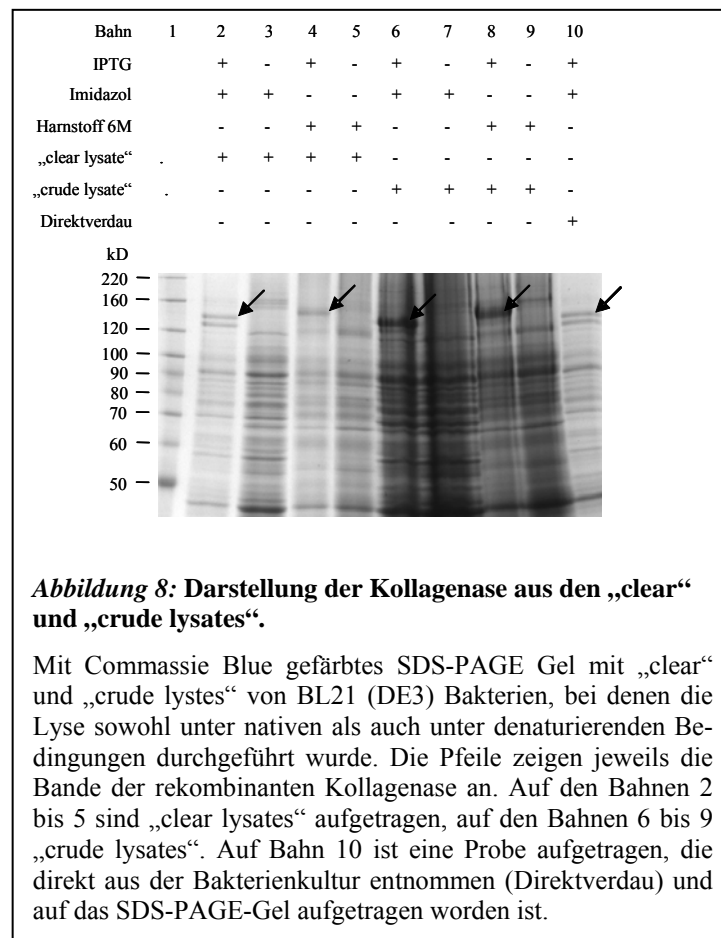
Bei der Ultraschall-Lyse (Sonification) wurden verschiedene Puffer auf ihre Effektivität untersucht:

- Säulenpuffer UBT

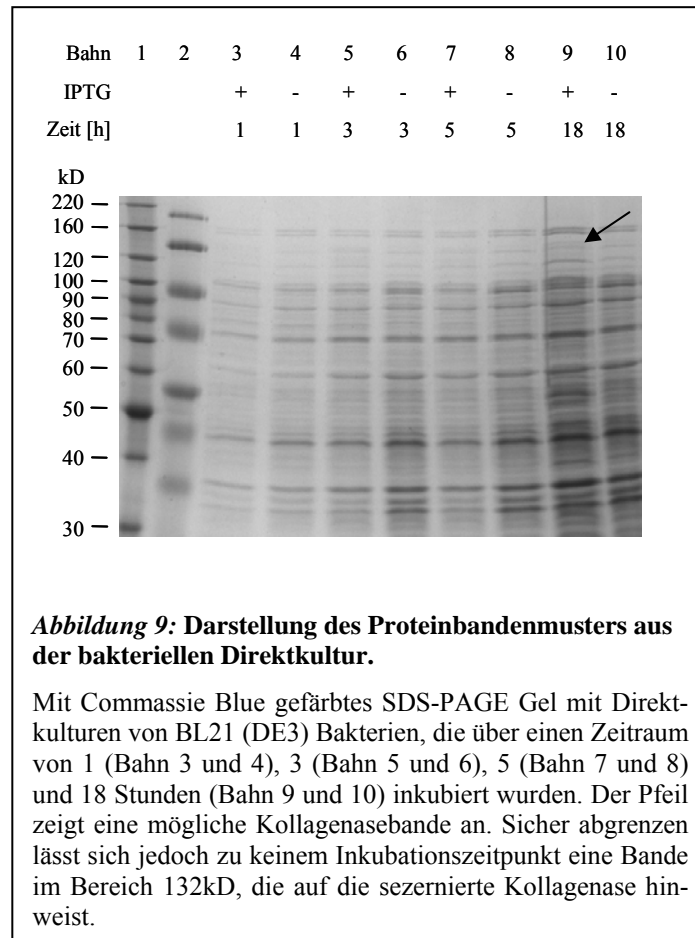
- Lysepuffer nach dem Protokoll „Protein purification under native conditions“ aus dem Ni-NTA-Spin Handbook von *Qiagen*⁶⁹
 - a) mit 10mM Imidazol wie angegeben und
 - b) ohne Imidazol
- Lysepuffer nach dem Protokoll „Protein purification under denaturing conditions“ aus dem gleichen Handbuch mit
 - a) 6M Harnstoff
 - b) 8M Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl)
- His-Bind-Binding-Buffer aus dem His-Bind-Binding-Kit von *Novagen*

In den ersten Versuchen wurde für die Sonification ausschließlich der Säulenpuffer UBT verwendet. Man kann davon ausgehen, dass die Kollagenase unter Verwendung dieses Puffers nicht denaturiert wird. Bei den Versuchen, mit denen der Einfluss von Temperatur und Zeit auf die Proteinexpression dargestellt wurde (siehe Abb. 6), wurde der Säulenpuffer UBT als Lysepuffer verwendet. Die Expressionsrate war hier sehr hoch, im Bereich um 132kD zeigte sich eine kräftige Bande. Dieser Puffer erwies sich jedoch bei der späteren Aufreinigung des Proteins als problematisch (siehe Kap. 4). Neben dieser Lyse unter nativen oder nicht-denaturierenden Bedingungen wurden weitere Versuche unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer mit Guanidiniumhydrochlorid und Harnstoff richtete sich hierbei nach den entsprechenden Protokollen aus dem Ni-NTA-Spin Handbook von *Qiagen*. Der His-Bind-Binding-Puffer stammt aus dem gleichnamigen Kit von *Novagen*. Abbildung 9 zeigt lediglich unter Kombination der Sonification mit dem Harnstoff-Lysepuffer eine Bande im erwarteten Bereich der Kollagenase. Das Proteinmuster der Lysate, denen zur Ultraschall-Lyse GuHCl-Lyse-Puffer oder His-Bind-Binding-Puffer zugegeben worden waren, zeigt keine sichtbare Bande in diesem Bereich, insgesamt ist aber bei diesen Lysaten die Intensität des gesamten Proteinmusters schwächer. Beide Methoden – die Lyse unter nativen, nicht-denaturierenden Bedingungen und die Lyse unter denaturierenden Bedingungen, wurden direkt verglichen: Es wurden „clear“ und „crude lysates“ verglichen, die zum einen mit Imidazol-Puffer (10mM Imidazol) und zum anderen mit Harnstoffpuffer (6M Harnstoff) lysiert worden waren. Zum besseren Verständnis der Ergebnisse sei an dieser Stelle angemerkt, dass die Begriffe „clear lysate“ und „crude lysate“ in Ermangelung geeigneter deutscher Begriffe in dieser Arbeit nicht übersetzt wurden. „Crude lysates“ sind die Lysate, die unmittelbar nach der Lysemethode (z. B.) Sonification vorliegen. Sie bestehen aus den Kulturüberständen sowie

den lysierten Bakterien mit ihrem Zellinhalt und dem gesamten Debris. „Clear lysates“ entstehen durch Zentrifugation der „crude lysates“, durch die der Zelldetritus sedimentiert und der dadurch entstandene Überstand als „clear lysate“ aufgenommen wird.

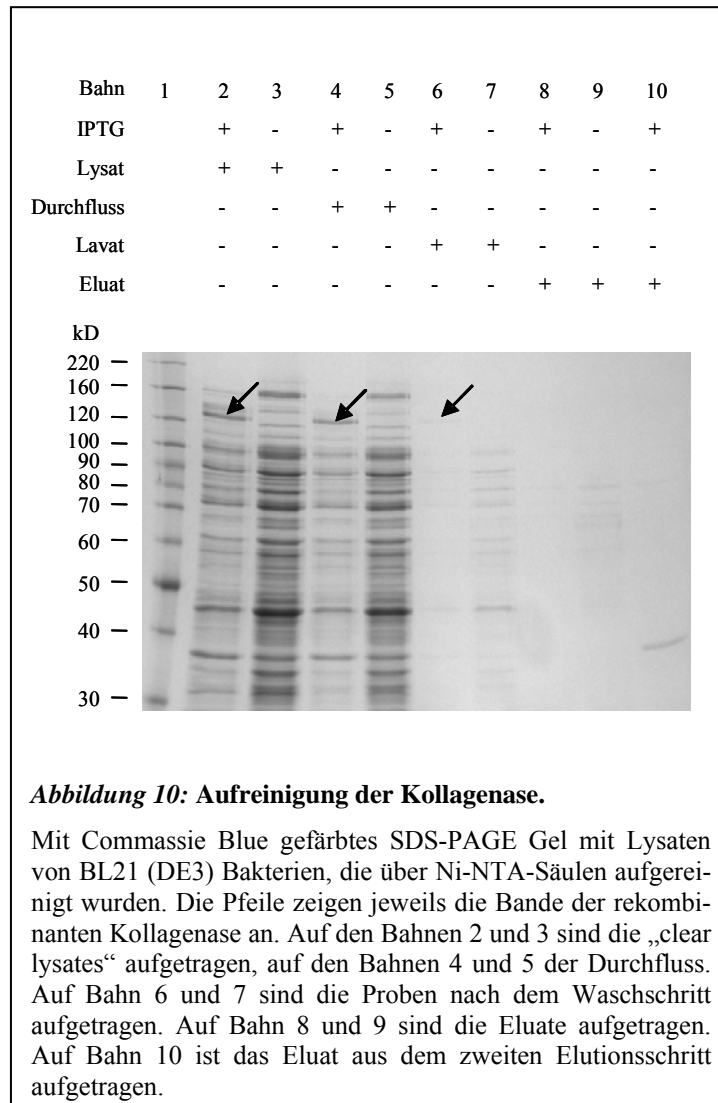


Die Bande der rekombinanten Kollagenase bei 132kD ist in den „clear lysates“ sowohl mit Imidazol- als auch mit Harnstoffpuffer deutlich zu erkennen. Im Lysat mit Imidazolpuffer ist noch eine zusätzliche Bande in diesem Bereich sichtbar. Auch in den 2 „crude lysates“ sind die Banden der rekombinanten Kollagenase deutlich sichtbar. Auch ohne quantitative, EDV-gestützte Auswertung wird deutlich, dass die Proteinausbeute mit allen Puffern etwa gleich hoch ist. Der verwendete Puffer und damit die Art der Lyse – nativ oder denaturierend – scheinen also keinen Einfluss auf die Ausbeute des Proteins nach Lyse zu haben. Dem direkten Vergleich unterzogen wurden außerdem der Säulenpuffer UBT und der Lysepuffer ohne Zusatz von Imidazol. Auch hier ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede.



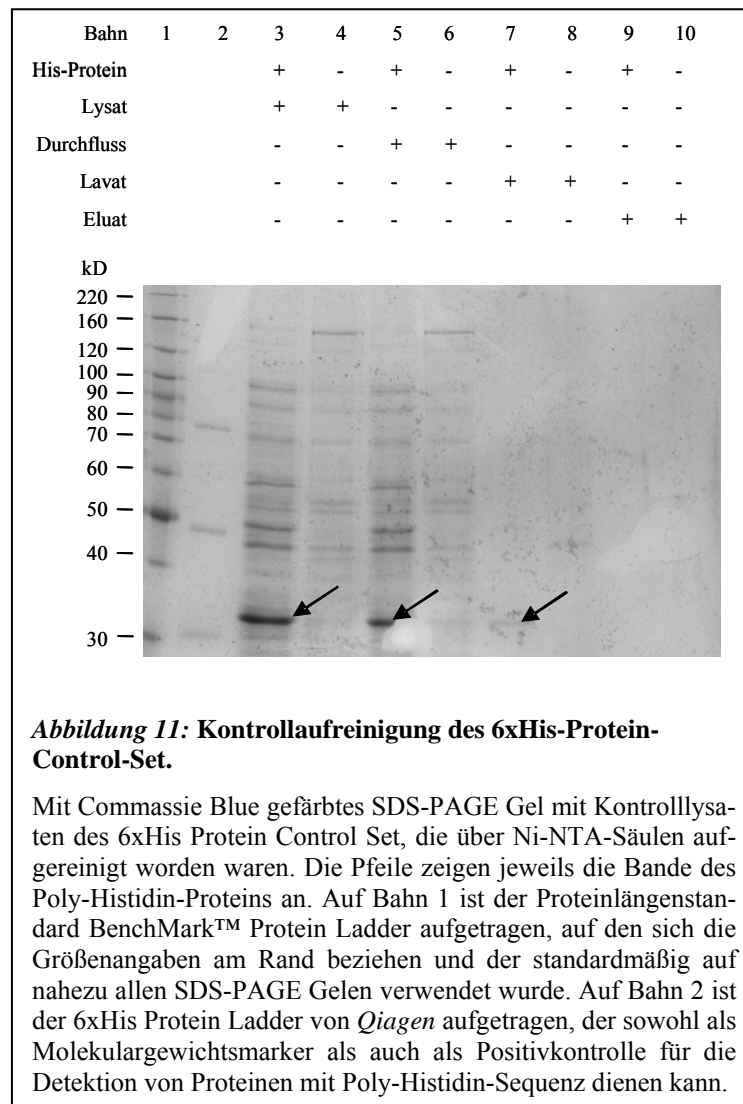
3.3. Isolierung des Fusionsproteins

Die Isolierung der Kollagenase erfolgte mit Ni-NTA-Säulen von *Qiagen*. Die poly-His Sequenz am Ende der rekombinanten Kollagenase bindet spezifisch an das Nickelion des Ni-NTA-Komplexes. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte unter zunächst unter nicht-denaturierenden (nativen) Bedingungen, dann auch unter denaturierenden Bedingungen mit den entsprechenden Lyse-, Wasch- und Elutionspuffern gemäß den Protokollen aus dem Ni-NTA-Spin-Handbook⁷⁰.

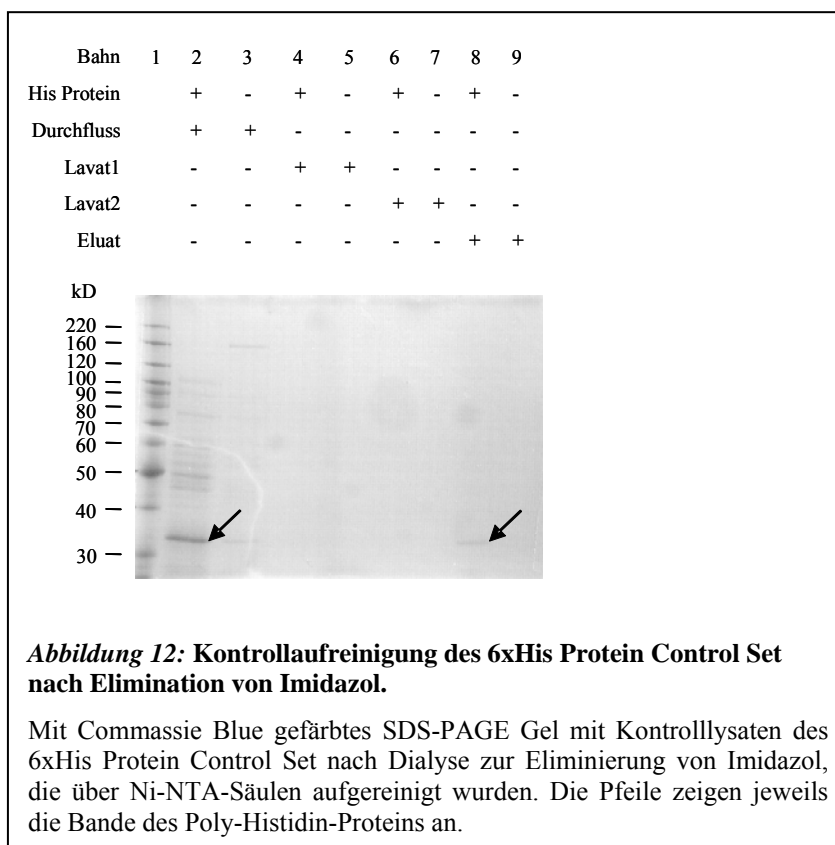


Der größte Teil der rekombinanten Kollagenase befindet sich im Durchfluss und nicht wie erwartet in der Säulenelution (Abb. 10). Dies weist darauf hin, dass das Fusionsprotein nicht an die Säulen bindet. Dass die Bindungskapazität der Säulen mit den aufgetragenen Proteinen überschritten wurde, ist aufgrund folgender Überlegungen unwahrscheinlich: Die Bindekapazität der Säulen liegt laut Hersteller bei ungefähr 150µg, die aufgetragene Proteinkonzentration liegt schätzungsweise bei 50ng/µl; das heißt, die aufgetragene Menge von 600µl Lysat entspricht etwa 30µg Protein. Nachdem eine Isolierung unter nativen Bedingungen nicht möglich war, wurden Isolierungsversuche unter denaturierenden Bedingungen mit den entsprechenden Puffern durchgeführt. Zwischen den Isolierungsversuchen unter nicht-denaturierenden und denaturierenden Bedingungen wurden keine signifikanten Unterschiede gesehen. Um daher sicherzugehen, dass die Aufreinigung von Poly-His-Proteinen über die Ni-NTA-Säule funktioniert, wurde folgender Test durchgeführt:

Es wurden kommerziell erhältliche Kontrolllysate (6xHis Protein Control Set, *Pierce Chemical Co*) mit den Ni-NTA Säulen aufgereinigt. Dabei wurden die lyophilisierten Lysate nicht wie angegeben mit Wasser rekonstituiert, sondern mit dem Imidazol-haltigen Lysepuffer, um vergleichbare Bedingungen für die Aufreinigung zu erhalten. Das positive Kontrolllysate enthält eine rekombinante 35kD schwere Uratoxidase (Uricase) mit Poly-Histidinsequenz.

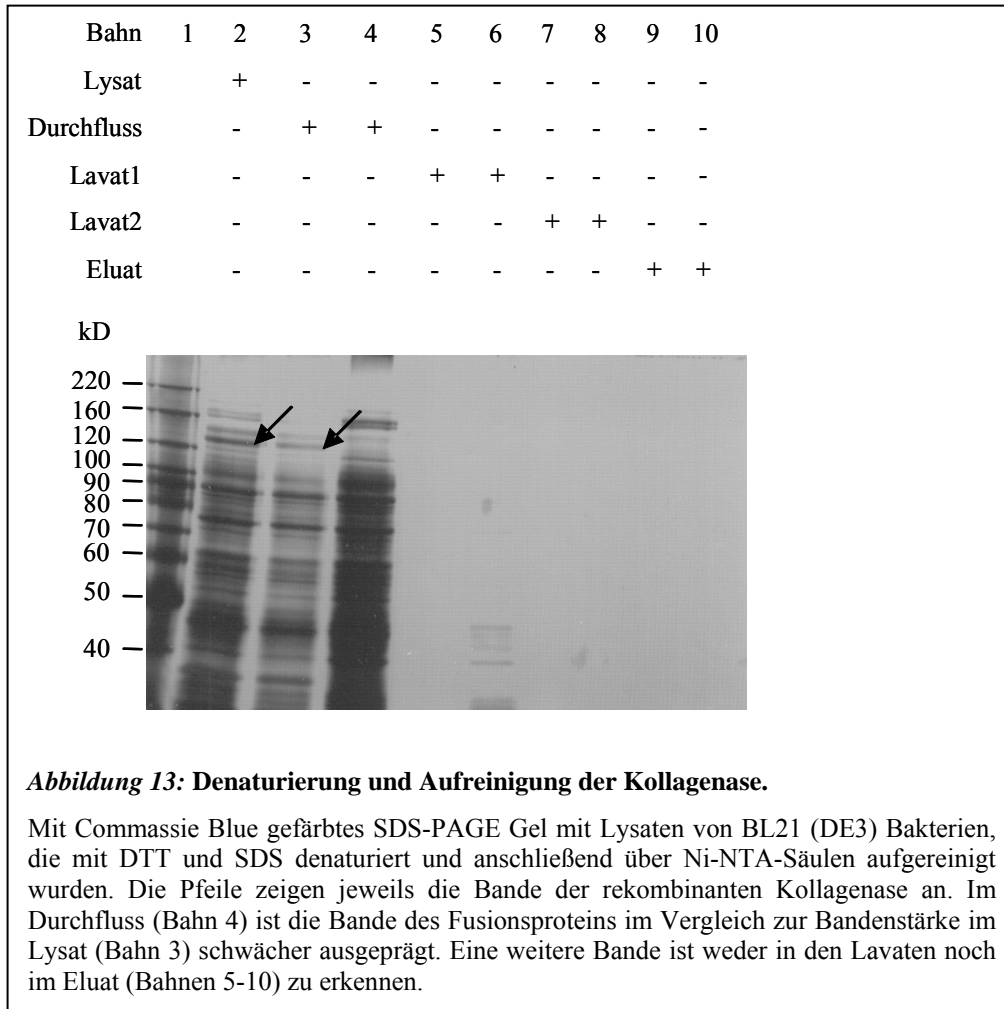


Auch das Kontrollprotein bindet nicht an die Säulen, sondern ist im ersten Durchfluss zu finden. Möglicherweise verhindert bereits die geringe Imidazolkonzentration im Puffer die Bindung an die Säule. Die Zugabe von 10mM Imidazol wird in allen Protokollen empfohlen, um unspezifische Bindung zu verhindern. Das Imidazol wurde mittels Dialyse entfernt und das Kontrolllysate wurde erneut auf die Ni-NTA Säulen aufgetragen:



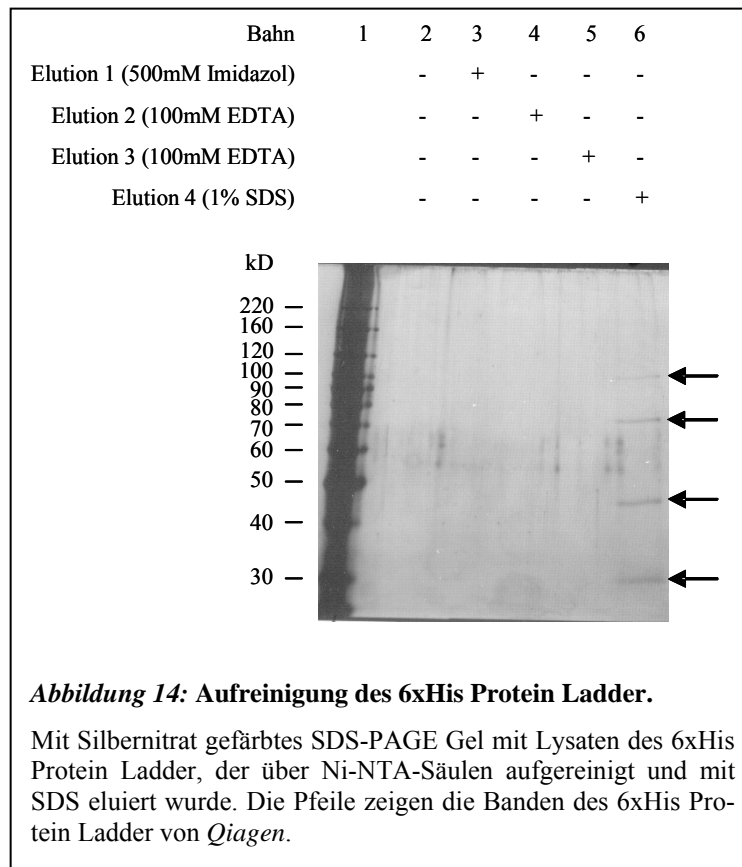
Wieder befindet sich ein Großteil des Proteins im Durchfluss. Dennoch zeigt sich im Eluat der Positivkontrolle die erwartete Bande bei 35kD, was die Vermutung bekräftigte, dass Imidazol die Bindung verhindert. Aus diesem Grund wurden bei einem erneuten Ansetzen einer BL21(DE3)-Bakterienkultur Lyse- und Waschpuffer nach dem bisherigen Protokoll (unter nativen Bedingungen), jedoch ohne Imidazol verwendet. Die Aufreinigung über die Säulen gelang nicht, auch hier erschien der größte Teil der Kollagenase im ersten Durchfluss über die Säulen. Das kann als Hinweis gewertet werden, dass die Ursache der Schwierigkeiten bei der Aufreinigung des Fusionsproteins auch beim Fusionsprotein selbst liegen könnte. Möglicherweise liegt eine für die Isolierung ungünstige Tertiärstruktur vor, in der die Poly-Histidin-Sequenz so verdeckt ist, dass eine Bindung an die Ni-NTA-Säulen nicht möglich und das Fusionsprotein der verwendeten Aufreinigungsmethode damit nicht zugänglich ist. Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde eine vollständige Denaturierung und anschließende Isolierung des Fusionsproteins durchgeführt. Das Lysat, von dem zuvor eine Probe aufgereinigt worden war, wurde zusammen mit 1M DTT und 10% SDS für 10 Minuten bei 100°C im Heizblock zur Denaturierung des Fusionsproteins inkubiert. DTT und SDS wurden mit Dialyse entfernt, und die Lysate wurden wieder über die Ni-NTA-Säulen aufgereinigt.

Diesmal befand sich nur sehr wenig rekombinante Kollagenase im Durchfluss, doch konnte auch kein Protein im Eluat gefunden werden.



Dieses Ergebnis führte zu der Vermutung, dass zumindest ein Teil der Gesamtmenge des Fusionsproteins auf der Säule verblieben ist und sich auch nach 2 Waschvorgängen und einem Elutionsschritt nicht von der Säule löste. Der Versuch, das Fusionsprotein mit 100mM EDTA, das eine Chelatbindung mit den Nickel-Ionen der Ni-NTA-Säulen eingeht und damit die aktive Affinitätsgruppe von den Säulen entfernt, zu eluieren, gelang nicht. Nachdem sich das Fusionsprotein nicht aufreinigen ließ, soll hier dargestellt werden, dass dies nicht an vermeidbaren Fehlern in der Ausführung, nicht also an methodischen Fehlern lag. Als Polyhistidin-Protein wurde die 6xHis Protein Ladder von *Qiagen* verwendet und nach Protokoll unter nativen Bedingungen über die Ni-NTA-Säulen aufgereinigt. Lyse- und Waschpuffer enthielten kein Imidazol. Der Marker blieb auf den Säulen gebunden. Weder im Durchfluss, noch nach dreimaligem Waschen, noch nach zweimaligem Elutionsversuch mit 250mM Imidazol zeigte sich das Bandenmuster des Proteinmarkers auf

dem SDS-PAGE Gel. Nach weiteren Elutionsversuchen mit 500mM Imidazol und 100mM EDTA, ließ sich der Proteinmarker schließlich mit 1% SDS von der Säule lösen.

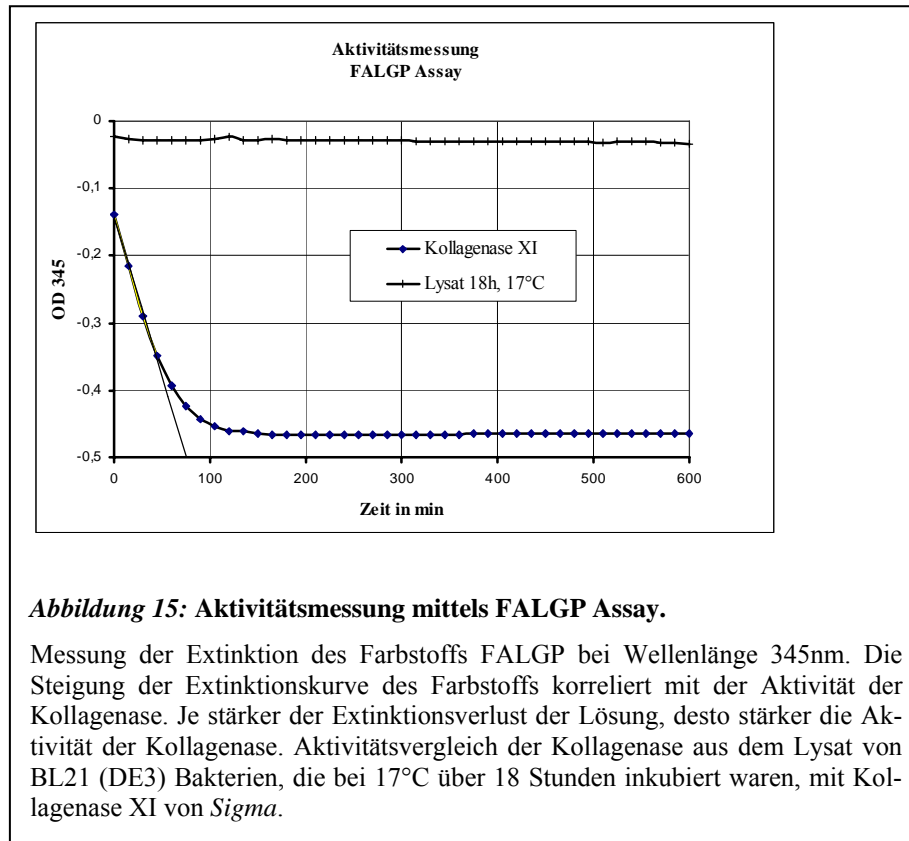


3.4. Nachweise des Fusionsproteins

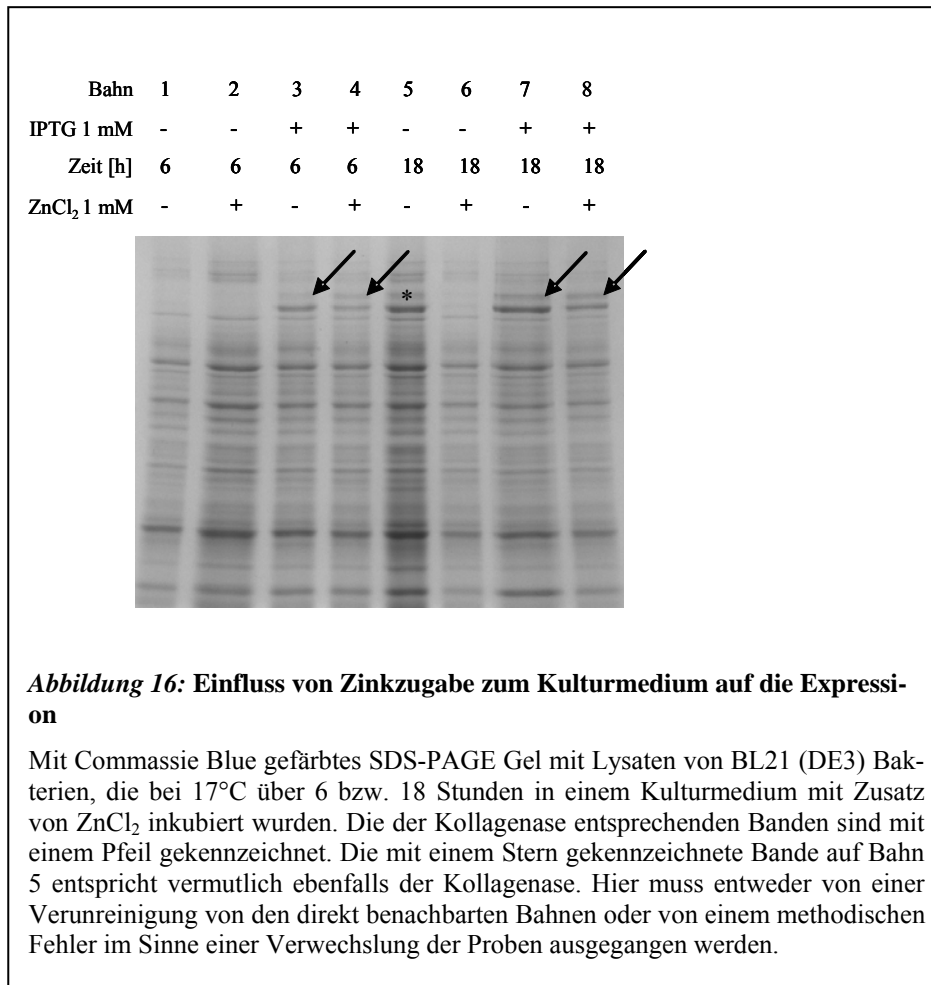
3.4.1. Aktivitätsmessung

Da die Aufreinigung der rekombinanten Kollagenase nicht möglich war, konnte die Enzymaktivität nicht mit einer gereinigten Fraktion durchgeführt werden. Um dennoch festzustellen, ob das rekombinante Protein aktiv war, wurde versucht, die Aktivität der Kollagenase direkt in den bakteriellen Lysaten nachzuweisen. Insgesamt wurden 4 Ansätze - repräsentativ für diese Untersuchungen ist hier nur ein Ansatz gezeigt - auf Aktivität der Kollagenase untersucht. Die Aktivität in den Lysaten wurde mit der Aktivität einer Referenzkollagenase (Kollagenase Typ XI von *Sigma*) verglichen. Die Aktivitätsmessung erfolgte mit Hilfe des FALGP Assay, bei dem der Farbstoff FALGP (2-Furanacryloyl-L-Leucylglycyl-L-Prolyl-L-Alanin) das Substrat der Kollagenase ist. Durch den enzymatischen Abbau des Farbstoffs ändert sich die Extinktion der Lösung, die über 30 Minuten kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 345nm gemessen wird.

Alle Aktivitätsmessungen brachten die gleichen Ergebnisse: Im Vergleich zur Referenzkollagenase XI von *Sigma* ergab sich für keines der untersuchten Lysate, die die rekombinante Kollagenase enthielten, eine signifikante enzymatische Aktivität.



Eine Möglichkeit für die fehlende Aktivität könnte ein Mangel an Zink sein. Zink ist in der Kollagenase enthalten und ist an Struktur und Wirksamkeit des Enzyms beteiligt. Um sicherzustellen, dass nicht der Mangel an Zink limitierend für die Expression und vor allem die Aktivität ist, wurde dem Wachstumsmedium 1mM ZnCl₂ zugegeben.



Die Expressionsbakterien BL21 (DE3) wurden wie bei vorhergehenden Versuchen induziert und bei 17°C über 6 bis zu 18 Stunden kultiviert. Wie in Abb. 16 dargestellt, ergibt die Zugabe von 1mM ZnCl₂, auch bei unterschiedlichen Inkubationszeiten, keine verbesserte Expression im Vergleich zum Medium ohne ZnCl₂. Auf dem SDS-PAGE Gel zeigt sich in 2 von 3 aufgetragenen Proben mit ZnCl₂ keine Bande im Bereich um 132kD, die sich dem Fusionsprotein zuordnen ließe. Die Zugabe von Zink wirkt sich demnach nicht auf die Expression der Kollagenase aus. Der Versuch, durch Zugabe von ZnCl₂ eine messbare Aktivität der Kollagenase zu erhalten, war nicht erfolgreich. Ein Mangel an Zink für die fehlende Aktivität wurde daher ausgeschlossen. Aus diesem Grund wurde der Ansatz mit Zugabe von Zink nicht weiter verfolgt.

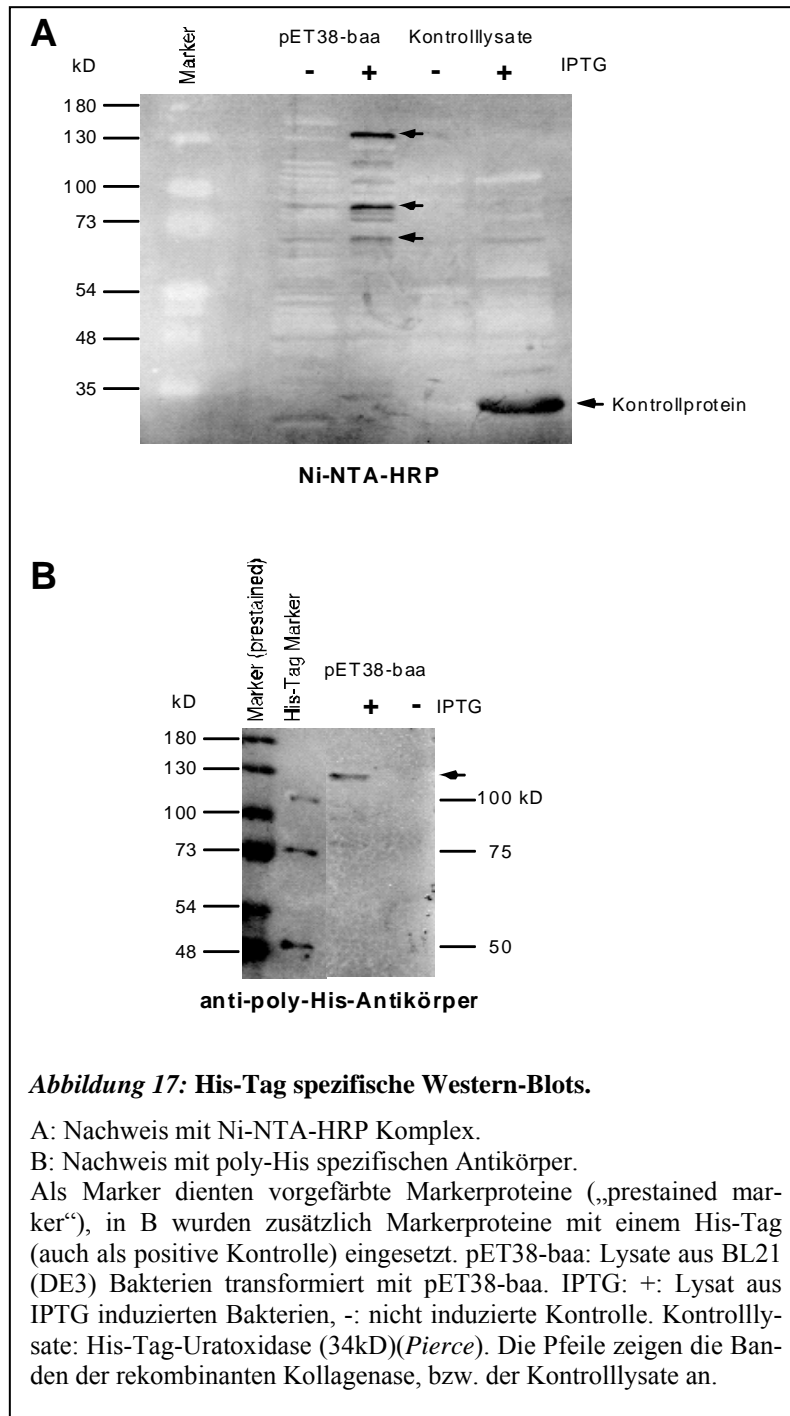
3.4.2. Pro-Q™ Sapphire 365 Oligohistidin-Färbung

Die Schwierigkeiten, die sich bei der Aufreinigung der Kollagenase mittels Affinitätschromatographie ergaben, führten zu der Frage, ob sich am Fusionsprotein tatsächlich

eine Poly-Histidin-Sequenz befindet. Daher wurde eine Färbemethode angewandt, die eine spezifische Anfärbung von Proteinen mit einem Oligo-Histidin-Tag erlaubt. Pro-Q™ Sapphire 365 Oligohistidine Gel Stain von *Molecular Probes/Invitrogen* enthält den Chelatbildner Nitrilotriessigsäure (NTA), damit lassen sich Poly-Histidin-Proteine direkt auf dem SDS-Polyacrylamid Gel spezifisch anfärben und mittels 300nm UV Transilluminator betrachten. Laut Herstellerangaben können bereits 30ng eines Hexahistidin-Fusionsproteins selektiv dargestellt werden. Eine erfolgreiche selektive Anfärbung unserer Kollagenase war nicht möglich. Als Kontrolle hierzu diente der schon mehrfach zuvor als Kontrollprotein verwendete 6xHis Protein Ladder von *Qiagen* mit einer Menge von etwa 250ng/Bande. Auch das Kontrollprotein ließ sich nicht adäquat anfärben, so dass auf weitere Färbungen mit dem Pro-Q™ Sapphire 365 Oligohistidine Gel Stain verzichtet wurde. Nachdem mit dieser Methode der Nachweis einer Poly-Histidin-Sequenz weder am Fusions- noch an einem Kontrollprotein möglich war, wurde der Nachweis mit etablierten sensitiveren Methoden geführt.

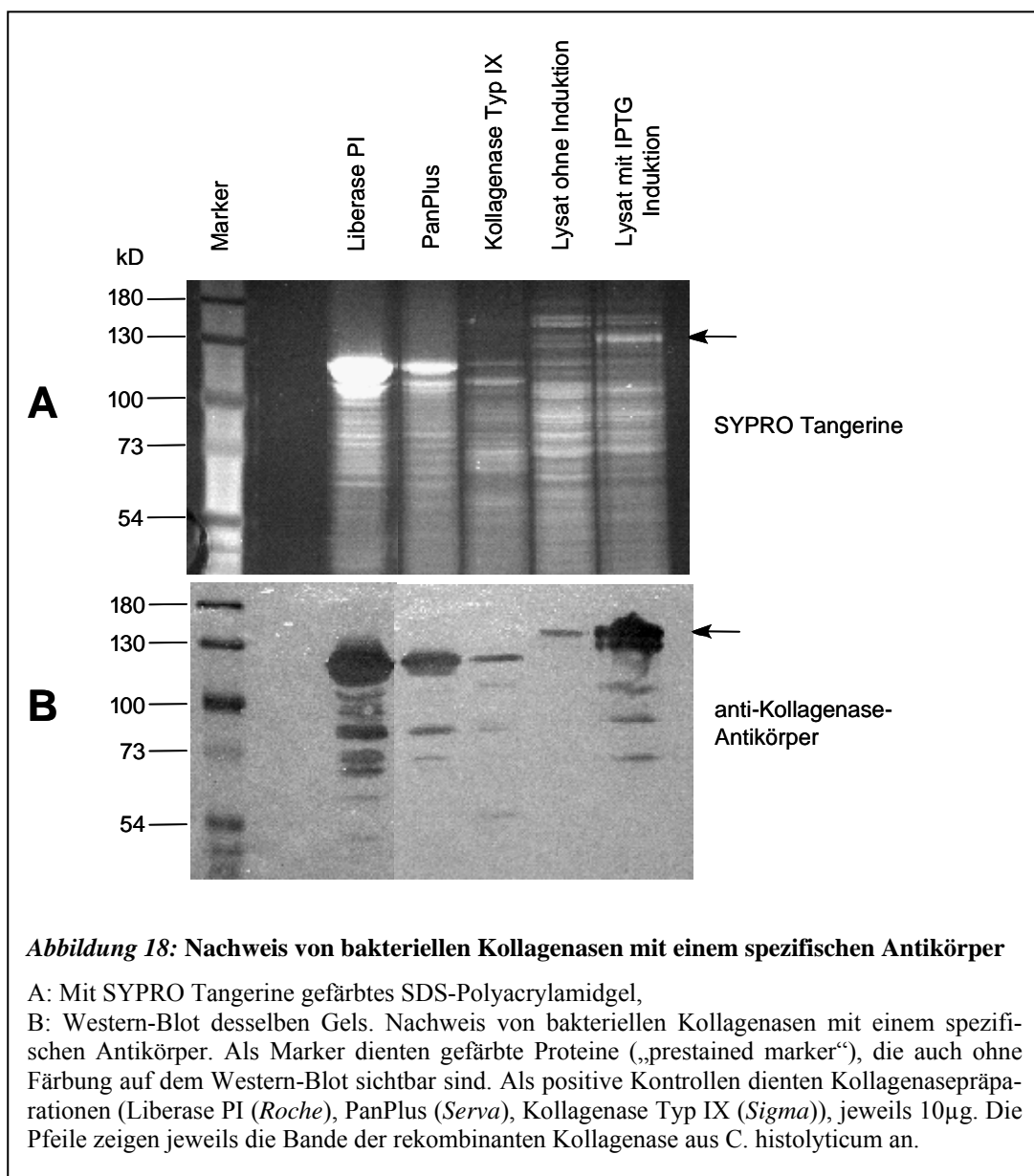
3.4.3. Western-Blot

Da das nach IPTG Induktion exprimierte Protein sich weder mit Affinitätsäulen aufreinen noch mit Poly-Histidin-Sequenz spezifischen Färbemethoden anfärben ließ, stellt sich die Frage, ob das nach IPTG Induktion detektierbare 132kD Protein wirklich die gewünschte rekombinante Kollagenase ist. Ein Lysat, von dem angenommen werden konnte, dass das Fusionsprotein enthalten war, wurde mittels Western-Blot untersucht. Die pET38baa transformierten BL21 (DE3) Bakterien wurden mit IPTG induziert und lysiert. Als Kontrolle dienten Lysate von nicht-induzierten Bakterien sowie kommerziell erhältliche Kontrolllysate (*Pierce*) mit poly-His-Uratoxidase. Die Lysate wurden mit einem 8% SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Poly-His-Sequenzen wurden mit einem Ni-NTA-Meerrettichperoxidase (HRP) Komplex und Diaminobenzidine-(DAB)-Färbung nachgewiesen. Deutlich ist eine Bande bei 132kD in dem Lysat aus den induzierten Bakterien zu sehen (Abb. 17 A).



Weiterhin sind Banden bei etwa 80 und 60kD festzustellen, die vermutlich auf Abbauprodukte zurückzuführen sind. In der nicht-induzierten Kontrolle ist die 132kD Bande nicht sichtbar. Die Kontrolllysate zeigen ebenfalls das erwartete Muster: keine Bande in der nicht-induzierten Kontrolle, eine starke Bande bei 34kD in der positiven Kontrolle. Damit konnte gezeigt werden, dass das durch IPTG induzierte Protein eine poly-His Sequenz enthält. Allerdings kann der Ni-NTA-Komplex auch an Proteine mit Zn-Komplexen binden⁶⁹.

Da die Kollagenase einen Zn-Komplex enthält, wurde der Versuch mit einem anti-poly-His Antikörper wiederholt, um diese Möglichkeit auszuschließen. Zweifelsfrei konnte eine Bande bei 132kD mit einem poly-His spezifischen Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 17 B). Um schließlich zu zeigen, dass es sich bei dem induzierten Protein um eine Kollagenase handelt, wurde ein Western-Blot mit einem Kollagenase spezifischen Antikörper (LDS 81⁵⁹) durchgeführt. Als Kontrollen dienten hier 3 kommerziell erhältliche Kollagenasepräparationen. Die Proteine wurden auf einem 8% SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mit SYPRO Tangerine gefärbt (Nur diese Proteinfärbetechnik ist mit den folgenden Schritten des Western-Blots kompatibel).



Deutlich ist die Bande der Kollagenase bei 120kD in den Kontrollen sichtbar. In dem Lysat aus IPTG induzierten Bakterien ist das Protein bei 132kD sichtbar, das in der nicht-induzierten Kontrolle fehlt. Das Molekulargewicht der rekombinanten Kollagenase ist höher als das der Kontrollkollagenase, da das rekombinante Protein um die beiden „tags“ CBD („cellulose binding domain“) und Poly-Histidin (His) verlängert wurde. Der Kollagenase-spezifische Antikörper färbt zudem diverse Banden geringeren Molekulargewichts, vermutlich Abbauprodukte der Kollagenase an. Obwohl die Bande des rekombinanten Proteins auf dem SYPRO Tangerine-gefärbten Gel nur sehr schwach ausgeprägt ist, ist diese Bande auf dem Western-Blot deutlich markiert. Man sieht auch eine schwache Bande in der nicht-induzierten Kontrolle, die darauf hinweist, dass auch im nicht-induzierten Zustand eine geringe Expression der rekombinanten Kollagenase stattfindet. Mit Hilfe dieser Western-Blots konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass nach IPTG-Induktion eine rekombinante Kollagenase mit einem funktionellen His-Tag exprimiert wird.

4. Diskussion

Die Isolierung von Langerhansinseln aus porzinem Pankreas und die anschließende xenogene Transplantation der Inseln mit dem langfristigen Ziel der Therapie des Diabetes mellitus hat bereits Erfolge gezeigt. Sie gehört nach wie vor zu einer Reihe von viel versprechenden Therapieansätzen der Volkskrankheit Diabetes. Bisher wurden für die Isolierung von Langerhansinseln kommerziell hergestellte Mischungen aus verschiedenen Kollagenasen verwendet⁷¹. Diese Kollagenasen sind nicht nur sehr teuer, sondern weisen zwischen den Chargen beträchtliche Qualitätsschwankungen auf^{60, 72, 73}, die eine saubere, reproduzierbare Trennung des endokrinen vom exokrinen pankreatischen Gewebe nur bedingt erlauben⁵⁸. Um diese Probleme zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit versucht, eine Kollagenase aus *C. histolyticum* rekombinant in *E. coli* zu exprimieren.

Ein Kollagenasegen BAA77435 aus *C. histolyticum* wurde mit PCR isoliert und in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert. Fünf verschiedene Bakterienstämme wurden mit dem rekombinanten Expressionsvektor transformiert. Nach Optimierung der Kultur- und Lysebedingungen konnte eine hohe Expression des 132kD großen Proteins erreicht werden. Die Aufreinigung und Reindarstellung der Kollagenase gelang nicht. Mittels Western-Blot konnte mit einem spezifischen Antikörper⁵⁹ jedoch eindeutig nachgewiesen werden, dass das 132kD Protein zum einen eine bakterielle Kollagenase ist. Zum anderen wurde mit einem spezifischen Anti-His-Antikörper der Nachweis erbracht, dass das diese Kollagenase ein Protein mit Poly-His-Tag ist. In den Aktivitätsmessungen konnte allerdings trotz der hohen Expression keine Aktivität des Enzyms gefunden werden. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass vorhergehende Versuche aus unserem Labor mit einem anderen Vektorsystem (pTYB) keine nennenswerte Expression ergaben, jedoch enzymatische Aktivität zeigten.

Nachdem mittels Western-Blot (s. o.) der Beweis erbracht wurde, dass es sich eindeutig um die gesuchte Kollagenase handelt, drängt sich die Frage auf, weshalb sie zum einen nicht aufgereinigt werden kann und zum anderen keine enzymatische Aktivität aufweist. Der verwendete Vektor pET38 ermöglicht eine schnelle Aufreinigung des Expressionsprodukts mittels zweier Aufreinigungssequenzen am C-terminalen Ende. Das rekombinante Protein wurde als Fusionsprotein aus der klonierten Kollagenase und den beiden „tags“

CBD („cellulose binding domain“) und Poly-Histidin (His) exprimiert. Diese „tags“ erlauben die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie über Cellulosesäulen (über die cellulose binding domain) oder Ni^{2+} (Poly-His bindet an Nickelionen). Da die Aufreinigung von Poly-His-Proteinen über Ni-NTA-(nitrilotriacetic acid) Säulen eine etablierte Methode ist^{69, 74-76}, wurde die Entscheidung für diesen Weg der Aufreinigung getroffen.

Es konnte in Versuchen mit einem kommerziell erworbenen Poly-Histidin-Protein gezeigt werden, dass bei der Aufreinigung des Fusionsproteins weder ein methodischer Fehler noch ein Fehler an den Ni-NTA-Säulen vorlag. Bei der Aufreinigung des 6xHis Protein Ladder ergaben sich Hinweise darauf, dass die Ni-NTA-Säulen mit Imidazol interagierten und Imidazol die Bindung des Proteins an die Säulen zu verhindern schien. Dennoch muss davon ausgegangen werden, dass die Anwesenheit von Imidazol in den verwendeten Lösungen nicht allein für eine insuffiziente Aufreinigung des Fusionsproteins verantwortlich ist. Die rekombinante Kollagenase konnte nämlich auch nicht unter Anwendung der gleichen Versuchsbedingungen wie bei der erfolgreichen Aufreinigung des Kontrollproteins (6xHis Protein Ladder), das heißt ohne jegliche Verwendung von Imidazol, aufgereinigt werden.

Die Vermutung liegt nahe, dass die Grundlage der Aufreinigung über die Ni-Säulen, die Poly-Histidin-Sequenz, gar nicht vorhanden oder in irgendeiner Form verdeckt ist, beispielsweise durch eine für die Isolierung ungünstige Tertiärstruktur des Fusionsproteins. Die erste Vermutung konnte insofern widerlegt werden, als sich durch Western-Blot eindeutig eine Poly-Histidin-Sequenz nachweisen ließ. Die Vermutung, dass die Tertiärstruktur des Fusionsproteins dafür verantwortlich sein könnte, dass die Poly-Histidin-Sequenz nicht exponiert ist und damit die Bindung des Proteins an die Ni-Säulen verhindert wird, konnte bislang nicht ausgeschlossen werden. Hinweise hierauf ergaben die oben erwähnten Versuche mit dem 6xHis Protein Ladder von *Qiagen*. Während dieser Poly-His-Marker so fest an die Ni-NTA-Säulen band, dass er sich erst mit SDS von den Säulen löste, erschien das Fusionsprotein in den Aufreinigungsversuchen immer bereits im ersten Durchfluss und zeigte keinerlei Affinität zu den Ni-Säulen.

Die Gruppe um Hesse konnte nachweisen, dass es prinzipiell möglich ist, eine Kollagenase aus *C. histolyticum* in *E. coli* rekombinant herzustellen⁶⁷. Die von Hesse et al. dargestellte Kollagenase enthielt im Gegensatz zu der von unserer Arbeitsgruppe ausgearbeiteten Kol-

lagenase keine Poly-Histidin-Sequenz, ihre Aufreinigung erfolgte stattdessen in 2 Chromatographieschritten. Das Kollagenasegen wurde ebenfalls in einen Vektor kloniert und das rekombinante Protein unter Kontrolle des lac Promotor/Operator-Systems zur Expression gebracht. Das rekombinante Protein war sowohl im Überstand als auch innerhalb der Bakterienzellen zu finden. In den Versuchen Hesses et al. zeigte sich genügend Aktivität der Kollagenase für einen Bioassay zur Isolierung porziner Langerhansinseln. Allerdings wurde hier die rekombinante Kollagenase als ein Teil einer definierten Mischung aus verschiedenen für die Aufreinigung geeigneten proteolytischen Enzymen getestet. Unter diesem Aspekt formierte sich das Ziel, eine einzige Kollagenase zur Aufreinigung von Langerhansinseln zur Verfügung zu haben, die sich mit einfachen Mitteln schnell, unkompliziert und hochwertig aufreinigen lässt.

Die Gruppe um Brandhorst verglich die Effektivität von Langerhansinseln nach Aufreinigung aus humanen Pankreata mit Liberase HI (Roche)^{77, 78} mit einer anderen rekombinant hergestellten Mischung, die sich aus Kollagenase Klasse I und Klasse II aus *C. histolyticum* sowie aus Neutraler Protease zusammensetzt⁴⁶. Liberase HI ist eine Mischung aus verschiedenen Kollagenase-Isoenzymen und weiteren proteolytischen Enzymen, die einer Aufreinigung unterzogen und so von bakteriellen Endotoxinen befreit wurden⁷⁹. Die Unterschiede aus Liberase HI und der Mischung aus clostridialer Kollagenase Klasse I und II und Neutraler Protease bestehen vorwiegend im Mischungsverhältnis der Enzyme. Im direkten Vergleich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Liberase HI und Kollagenase bezüglich Reinheit und *In-Vitro*-Funktion. Bezüglich der Viabilität der Inseln schnitt der Verdau mittels rekombinanter Kollagenase im Vergleich zur Liberase HI signifikant schlechter ab.

Im Hinblick auf diese Mischungen sollte man die Daten verschiedener Arbeitsgruppen nicht außer Acht lassen, die einen positiven Effekt bezüglich Aktivität und Wirkung im Zusammenwirken verschiedener Kollagenase-Klassen und Proteasen postuliert haben⁸⁰⁻⁸⁴. Diese Ergebnisse rechtfertigen wiederum die Anwendung von definierten Mischungen aus Kollagenasen und weiteren proteolytischen Enzymen.

Es gibt zwei Klassen von *C. histolyticum* Kollagenasen, Klasse I und Klasse II, die unterschiedliche enzymatische Eigenschaften und Substratspezifitäten aufweisen^{61, 85}. Die in dieser Arbeit verwendete Kollagenase ist eine Kollagenase der Klasse II.

Die Arbeit von Hesse⁶⁷ et al. hat gezeigt, dass die Aufreinigung der Kollagenase Klasse II verschiedene Isoformen ergibt, die sich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Denkbar wäre daher, dass es Isoformen gibt, die sich nur wenig in ihrem Molekulargewicht, aber merklich in ihrer Tertiärstruktur und damit auch in der Exposition der Poly-Histidin-Sequenz unterscheiden, was eine mögliche Erklärung für die Schwierigkeiten der Aufreinigung über die Ni-NTA-Säulen wäre.

Bei der Isolierung von porcinen und auch humanen Langerhansinseln ist das Fehlen einer sicher verlässlichen, qualitativ hochwertigen und ökonomisch vertretbaren Kollagenase ein limitierender Faktor. Alle Gruppen, die sich der Lösung dieses Problems angenommen haben, greifen bisher auf Enzymmischungen zurück. Die Darstellung einer einzigen Kollagenase, die den oben genannten Anforderungen genügt, ist bisher nicht gelungen. Es zeigt sich, dass Mischungen nur eine unzureichende Lösung sind und keine qualitative Verbesserung im Bezug auf die Aufreinigung von Langerhansinseln bringen. Die Herstellung einer einzigen rekombinanten Kollagenase scheint daher der richtige Weg zur erfolgreichen Transplantation von Langerhansinseln.

Die Fortführung dieser Arbeit mit dem Versuch mit einer weniger etablierten Aufreinigungsmethode über die „cellulose binding domain“ könnte sich als eine Möglichkeit hierzu erweisen. Weiterhin könnte sich die Anwendung eines anderen Vektorsystems zunächst unter Beibehaltung des Kollagenasegens sowie der Klonierungsbakterien als eine geeignete Möglichkeit zur Darstellung einer hochreinen und aktiven Kollagenase erweisen.

5. Zusammenfassung

Die Transplantation von Inselzellen aus dem Pankreas stellt eine mögliche Therapieoption zur Behandlung des Diabetes mellitus dar. Unverzichtbar ist hierzu eine saubere Aufreinigung des Inselgewebes. Die Aufreinigung wurde bislang mit Enzymgemischen durchgeführt, die im Wesentlichen aus *C. histolyticum*-Kollagenasen und -Proteasen zusammengesetzt waren. Die Problematik dieser Kollagenasegemische ist zum einen die schwere Reproduzierbarkeit der Zusammensetzung und der Enzymaktivitäten der einzelnen Komponenten – es gibt beträchtliche Qualitätsschwankungen zwischen den Chargen – zum anderen sind diese kommerziell vertriebenen Kollagenasegemische teuer. Die Lösung dieser Probleme könnte daher in der rekombinanten Herstellung der einzelnen Komponenten des Gemisches liegen. Einzelne Komponenten oder kontrollierte Gemische aus rekombinanten Enzymen können dann reproduzierbar und kostengünstig für die Inselisolierung eingesetzt werden. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der rekombinanten Darstellung einer Kollagenase aus *C. histolyticum* zur Isolierung von Langerhansinseln aus dem porzinen Pankreas. Das Kollagenasegen konnte erfolgreich in einen bakteriellen Expressionsvektor mit dem T7 lac Promotor kloniert werden und die Proteinexpression induziert werden. Unter optimalen Bedingungen konnten 50mg Kollagenase/l Kultur erreicht werden. Bei der Klonierung wurde das Kollagenasegen um „tags“ (angehängte Sequenzen) verlängert, die für die spätere Aufreinigung hilfreich sein sollten. Die Aufreinigung über die Poly-Histidin-Sequenz des Fusionsproteins blieb allerdings aus unbekannten Gründen erfolglos. Das Vorhandensein einer Poly-Histidin-Sequenz am Fusionsprotein konnte durch Western-Blot jedoch eindeutig nachgewiesen werden. Im FALGPA-Assay zeigten die Zellysate keine Kollagenaseaktivität, allerdings konnte auch hier durch Western-Blot mit Hilfe eines spezifischen Anti-Kollagenase-Antikörpers der Nachweis geführt werden, dass das rekombinante Protein eine Kollagenase ist.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die *C. histolyticum*-Kollagenase mit hoher Effizienz rekombinant darstellen lässt. Jedoch scheint unter den gewählten Bedingungen das Protein in einer tertiären Struktur vorzuliegen, die keine enzymatische Aktivität aufweist und die Isolierung mit Hilfe des His-Tags verhindert.

6. Literaturverzeichnis

1. Powers AC, Austenat E, Semmler S. Diabetes Mellitus. In: Dietel M, Dudenhausen J, Suttorp N, eds. *Harrisons Innere Medizin*. Vol. 2. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag, 2003:2307-37.
2. Ridgway WM, Fathman CG. The association of MHC with autoimmune diseases: understanding the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 86:3-10.
3. McDevitt HO. The role of MHC class II molecules in susceptibility and resistance to autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:677-81.
4. Hammond KJ, Kronenberg M. Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 2003; 15:683-9.
5. Beyan H, Buckley LR, Yousaf N, et. al. A role for innate immunity in type 1 diabetes? *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19:89-100.
6. Lernmark A. Type 1 diabetes - does suppressing T cells increase insulin? *N Engl J Med* 2005; 352:2642-4.
7. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 2004; 88:787-835.
8. Froguel P. Genetics of type II diabetes. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2000; 93 Spec No 4:7-12.
9. Froguel P, Velho G. Genetic determinants of type 2 diabetes. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56:91-105.
10. Demenais F, Kanninen T, Lindgren CM, et al. A meta-analysis of four European genome screens (GIFT Consortium) shows evidence for a novel region on chromosome 17p11.2-q22 linked to type 2 diabetes. *Hum Mol Genet* 2003; 12:1865-73.
11. Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 1998; 19:491-503.
12. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341:248-57.
13. Citrome L. Metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Psychopharmacol* 2005; 19:84-93.

14. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1999; 100:1134-46.
15. Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, et al. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27 Suppl 1:S79-83.
16. Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341:1127-33.
17. Boulton AJ, Malik RA. Diabetic neuropathy. *Med Clin North Am* 1998; 82:909-29.
18. Aiello LP, Gardner TW, King GL, et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1998; 21:143-56.
19. Bloomgarden ZT. American Diabetes Association Annual Meeting, 1999: type 2 diabetes treatment. *Diabetes Care* 2000; 23:405-11.
20. Wheeler ML. Nutrition management and physical activity as treatments for diabetes. *Prim Care* 1999; 26:857-68.
21. Bloomgarden ZT. American Diabetes Association Annual Meeting, 1999. New approaches to type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22:1899-903.
22. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993; 329:977-86.
23. Meyerhoff C, Bischof F, Sternberg F, Zier H, Pfeiffer EF. On line continuous monitoring of subcutaneous tissue glucose in men by combining portable glucosensor with microdialysis. *Diabetologia* 1992; 35:1087-92.
24. Frost MC, Meyerhoff ME. Implantable chemical sensors for real-time clinical monitoring: progress and challenges. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6:633-41.
25. Felig P, Tamborlane W, Sherwin RS, Genel M. Infusion-pump treatment of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1979; 301:268-9.
26. Saudek CD, Duckworth WC, Giobbie-Hurder A, et al. Implantable insulin pump vs multiple-dose insulin for non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized clinical trial. Department of Veterans Affairs Implantable Insulin Pump Study Group. *Jama* 1996; 276:1322-7.
27. Owens DR, Zinman B, Bolli G. Alternative routes of insulin delivery. *Diabet Med* 2003; 20:886-98.
28. Harsch IA. Inhaled insulins: their potential in the treatment of diabetes mellitus. *Treat Endocrinol* 2005; 4:131-8.

29. Roche E, Enseat-Wase R, Reig JA, Jones J, Leon-Quinto T, Soria B. Therapeutic potential of stem cells in diabetes. *Handb Exp Pharmacol* 2006;147-67.
30. Otonkoski T, Gao R, Lundin K. Stem cells in the treatment of diabetes. *Ann Med* 2005; 37:513-20.
31. Dieterle CD, Hierl FX, Gutt B, et al. Insulin and islet autoantibodies after pancreas transplantation. *Transpl Int* 2005; 18:1361-5.
32. Burke GW, Ciancio G, Sollinger HW. Advances in pancreas transplantation. *Transplantation* 2004; 77:S62-7.
33. Pyke D. Pancreatic transplantation for type 1 diabetes. *Lancet* 1990; 335:1538.
34. Pascher A. Xenotransplantation. In: Pfitzmann R, Neuhaus P, Hetzer R, (Hrsg.) *Organtransplantation. Transplantation thorakaler und abdomineller Organe*, 2001:239-246.
35. Ulrichs K. *Pankreasinsel-Transplantation*. Stuttgart, Berlin, Köln: Verlag W. Kohlhammer, 1994.
36. Simeonovic CJ. Xenogeneic islet transplantation. *Xenotransplantation* 1999; 6:1-5.
37. Ulrichs K, Hamelmann W, Bühler C, et al. Transplantation of porcine Langerhans islets for therapy of type I diabetes. The way to clinical application. *Zentralbl Chir* 1999; 124:628-35.
38. Kaufman DB, Lowe WL, Jr. Clinical islet transplantation. *Curr Diab Rep* 2003; 3:344-50.
39. Platt JL. Acute vascular rejection. *Transplant Proc* 2000; 32:839-40.
40. Bühler L, Deng S, Anderegg E, et al. Mechanism of rejection of islet of Langerhans xenografts. *Swiss Surg* 1995:210-3.
41. Gray DW. An overview of the immune system with specific reference to membrane encapsulation and islet transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 944:226-39.
42. Gray DW. Encapsulated islet cells: the role of direct and indirect presentation and the relevance to xenotransplantation and autoimmune recurrence. *Br Med Bull* 1997; 53:777-88.
43. Kendall WF, Jr., Collins BH, Opara EC. Islet cell transplantation for the treatment of diabetes mellitus. *Expert Opin Biol Ther* 2001; 1:109-19.
44. Grohn P, Klöck G, Schmitt J, et al. Large-scale production of Ba(2+)-alginate-coated islets of Langerhans for immunoisolation. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102:380-7.

45. Breuer S. Etablierung des Modells "Ratte-anti-Schwein" zur xenogenen Transplantation mikroverkapselter Langerhans-Inseln. Dissertation der Medizinischen Fakultät. Würzburg: Bayerische Julius-Maximilians-Universität, 2004.
46. Brandhorst H, Brandhorst D, Hesse F, et al. Successful human islet isolation utilizing recombinant collagenase. *Diabetes* 2003; 52:1143-6.
47. Krickhahn M, Bühler C, Meyer T, Thiede A, Ulrichs K. The morphology of islets within the porcine donor pancreas determines the isolation result: successful isolation of pancreatic islets can now be achieved from young market pigs. *Cell Transplant* 2002; 11:827-38.
48. Krickhahn M, Meyer T, Bühler C, Thiede A, Ulrichs K. Highly efficient isolation of porcine islets of Langerhans for xenotransplantation: numbers, purity, yield and in vitro function. *Ann Transplant* 2001; 6:48-54.
49. Hesse UJ, Schmitz-Rode M, Danis J, et al. In vitro and in vivo viability assessment of unpurified pancreatic islet tissue. *J Surg Res* 1994; 57:556-62.
50. Popel A. Untersuchungen zur humoralen Immunantwort in Wistar-Ratten nach xenogener Transplantation mikroverkapselter Langerhans-Inseln des Schweins. Dissertation der Medizinischen Fakultät. Würzburg: Bayerische Julius-Maximilians-Universität, 2004.
51. Steinbrink DR, Bond MD, Van Wart HE. Substrate specificity of beta-collagenase from *Clostridium histolyticum*. *J Biol Chem* 1985; 260:2771-6.
52. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. In: Ullmann U, (Hrsg.). Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1999.
53. Seifter S, Harper E. Collagenases. In: Colowick SP, ed. *Methods enzymol.* Vol. 19. New York: Academic Press, 1970:613-635.
54. de Souza SJ, Brentani R. Sequence homology between a bacterial metalloproteinase and eukaryotic matrix metalloproteinases. *J Mol Evol* 1993; 36:596-8.
55. Matsushita O, Jung CM, Katayama S, Minami J, Takahashi Y, Okabe A. Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*. *J Bacteriol* 1999; 181:923-33.
56. Wolters GH, Vos-Scheperkeuter GH, van Deijnen JH, van Schilfgaarde R. An analysis of the role of collagenase and protease in the enzymatic dissociation of the rat pancreas for islet isolation. *Diabetologia* 1992; 35:735-42.
57. Lettl A. Preparation of crude *Clostridium histolyticum* collagenase for therapeutic purposes. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1978; 22:63-72.

58. Johnson PR, White SA, London NJ. Collagenase and human islet isolation. *Cell Transplant* 1996; 5:437-52.
59. Chen RL, James RF. Characterization of an important enzymatic component in collagenase that is essential for the effective digestion of the human and porcine pancreas. *Cell Transplant* 2001; 10:709-16.
60. Klöck G, Kowalski MB, Hering BJ, et al. Fractions from commercial collagenase preparations: use in enzymic isolation of the islets of Langerhans from porcine pancreas. *Cell Transplant* 1996; 5:543-51.
61. Wolters GH, Vos-Scheperkeuter GH, Lin HC, van Schilfgaarde R. Different roles of class I and class II *Clostridium histolyticum* collagenase in rat pancreatic islet isolation. *Diabetes* 1995; 44:227-33.
62. Novagen. pET System Manual, 2000.
63. Lopez PJ, Guillerez J, Sousa R, Dreyfus M. On the mechanism of inhibition of phage T7 RNA polymerase by lac repressor. *J Mol Biol* 1998; 276:861-75.
64. Giordano TJ, Deuschle U, Bujard H, McAllister WT. Regulation of coliphage T3 and T7 RNA polymerases by the lac repressor-operator system. *Gene* 1989; 84:209-19.
65. Ansorge W. Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. *J Biochem Biophys Methods* 1985; 11:13-20.
66. Van Wart HE, Steinbrink DR. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. *Anal Biochem* 1981; 113:356-65.
67. Hesse F, Burtscher H, Popp F, Ambrosius D. Recombinant enzymes for islet isolation: purification of a collagenase from *Clostridium histolyticum* and cloning/expression of the gene. *Transplant Proc* 1995; 27:3287-9.
68. Grossman TH, Kawasaki ES, Punreddy SR, Osburne MS. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* 1998; 209:95-103.
69. Qiagen. QIAexpress® Detection and Assay Handbook. Hilden, 2002.
70. Qiagen. Ni-NTA Spin Handbook. Hilden, 2003.
71. Bond MD, Van Wart HE. Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* 1984; 23:3085-91.
72. London NJ, Robertson GS, Chadwick DR, Johnson PR, James RF, Bell PR. Human pancreatic islet isolation and transplantation. *Clin Transplant* 1994; 8:421-59.

73. Toledo-Pereyra LH, Zammit M, Malcom S, Cromwell P. Inconsistency of collagenase activity for isolation of islet cells for transplantation. *Transplantation* 1979; 27:222.
74. Hainfeld JF, Liu W, Halsey CM, Freimuth P, Powell RD. Ni-NTA-gold clusters target His-tagged proteins. *J Struct Biol* 1999; 127:185-98.
75. Schmitt J, Hess H, Stunnenberg HG. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol Biol Rep* 1993; 18:223-30.
76. Westra DF, Welling GW, Koedijk DG, Scheffer AJ, The TH, Welling-Wester S. Immobilised metal-ion affinity chromatography purification of histidine-tagged recombinant proteins: a wash step with a low concentration of EDTA. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 760:129-36.
77. Gill JF, Chambers LL, Baurley JL, et al. Safety testing of Liberase, a purified enzyme blend for human islet isolation. *Transplant Proc* 1995; 27:3276-7.
78. Brandhorst H, Brandhorst D, Hering BJ, Bretzel RG. Significant progress in porcine islet mass isolation utilizing liberase HI for enzymatic low-temperature pancreas digestion. *Transplantation* 1999; 68:355-61.
79. Linetsky E, Inverardi L, Kenyon NS, Alejandro R, Ricordi C. Endotoxin contamination of reagents used during isolation and purification of human pancreatic islets. *Transplant Proc* 1998; 30:345-6.
80. Van Wart HE, Steinbrink DR. Complementary substrate specificities of class I and class II collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry* 1985; 24:6520-6.
81. Kono T. Roles of collagenases and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal tissues. *Biochim Biophys Acta* 1969; 178:397-400.
82. Lwebuga-Mukasa JS, Harper E, Taylor P. Collagenase enzymes from *Clostridium*: characterization of individual enzymes. *Biochemistry* 1976; 15:4736-41.
83. Mandl I, Keller S, Manahan J. Multiplicity of *Clostridium Histolyticum* Collagenases. *Biochemistry* 1964; 20:1737-41.
84. Van Wart HE, Bond MD. An accurate, quantitative assay for collagenase activity based on the synergistic hydrolysis of collagen. *Anal Biochem* 1982; 120:151-8.
85. Vos-Scheperkeuter GH, van Suylichem PT, Vonk MW, Wolters GH, van Schilf-gaarde R. Histochemical analysis of the role of class I and class II *Clostridium histolyticum* collagenase in the degradation of rat pancreatic extracellular matrix for islet isolation. *Cell Transplant* 1997; 6:403-12.

Danksagung

Besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Professor Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Experimentellen Chirurgie und Transplantations-Immunologie in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik (Chirurgie I, Zentrum für Operative Medizin), die mich in allen praktischen und theoretischen Angelegenheiten meiner Arbeit stets intensiv unterstützte.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. med. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik (Chirurgie I, Zentrum für Operative Medizin), für die Überlassung des Arbeitsplatzes, sowie die finanzielle und technische Unterstützung meiner Arbeit aus Mitteln der Grundausstattung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn U. Beutner, Ph.D., für seine kompetente und intensive Betreuung der Arbeit in allen Fragen rund um die Biochemie, Mikrobiologie und Immunologie.

Im übrigen gilt mein Dank allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Experimentelle Transplantations-Immunologie, die mir mit praktischer Hilfe und stets freundlich zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Reihl, geb. Kästel
Vornamen: Susanne Anna Maria
Geburtsdatum: 17. September 1977
Geburtsort: Ludwigshafen am Rhein
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschule Geinsheim
1988 – 1997 Edith-Stein-Gymnasium, Speyer

Au Pair:

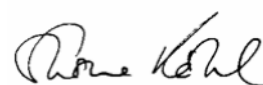
02/1998 – 09/1998 Tätigkeit als Au Pair in Guildford, Surrey, Großbritannien

Studium:

11/1998 – 04/2005 Studium der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität, Würzburg und der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
20.09.2000 Ärztliche Vorprüfung
28.08.2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
23.03.2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21.04.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf:

seit 01.05.2005 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik V (Nephrologie),
Klinikum Bayreuth GmbH



Würzburg, im September 2006

Susanne Reihl