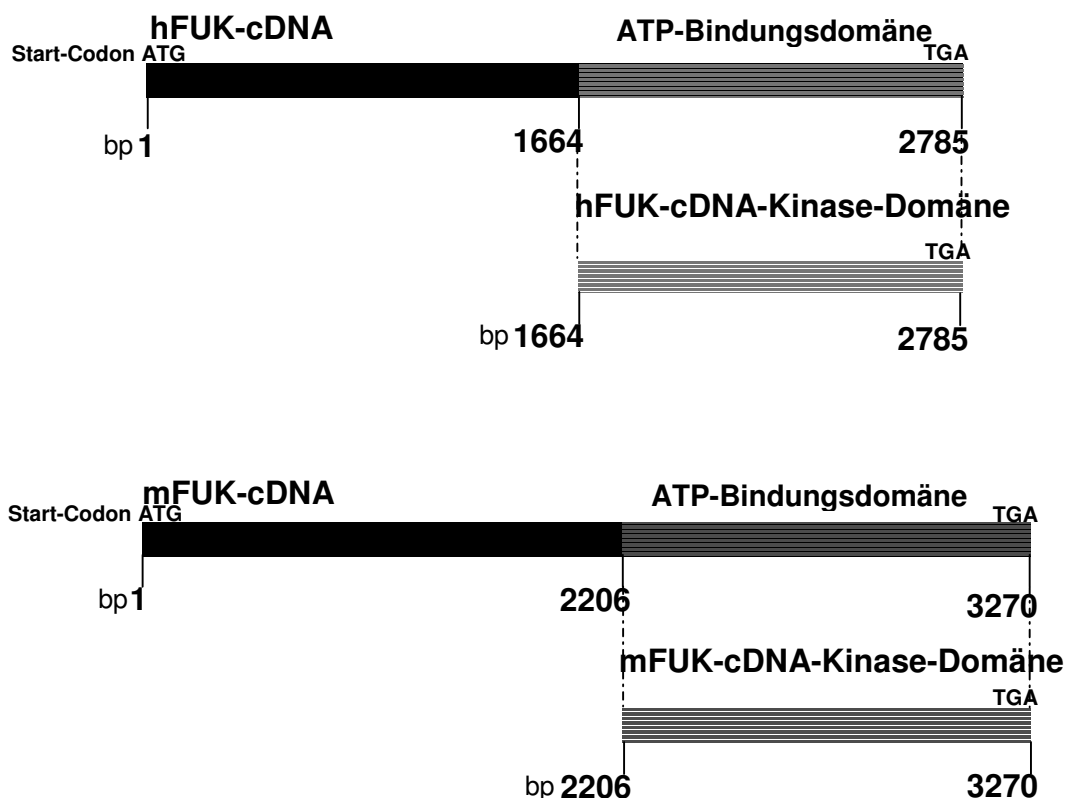


## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression der Fucokinase und ihrer Kinase-Domäne in *E. coli*

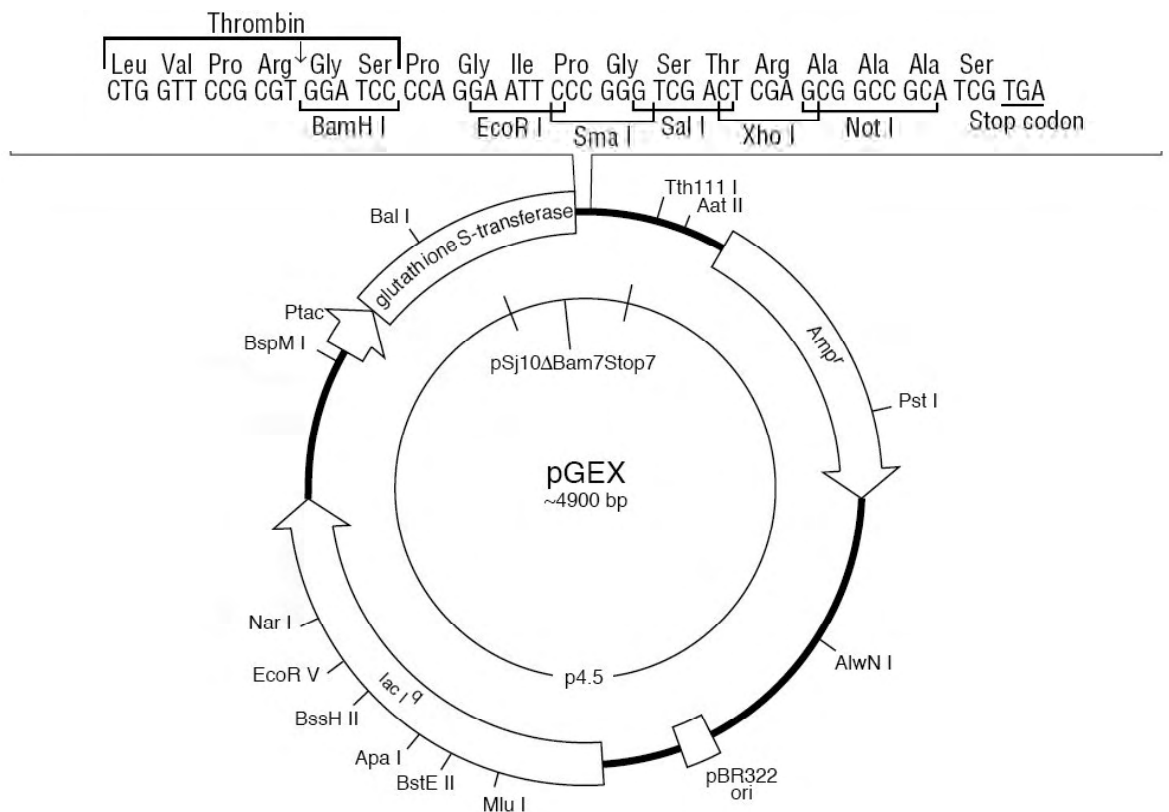
Bei der Expression der Fucokinase und ihrer Kinase-Domäne als His-Tag in *E. coli* (Hinderlich *et al.*, 2002) oder als E2-Tag-Protein in COS-7 eukaryontischer Zellen (Niittymaki *et al.*, 2004) wurden nur geringe Mengen an funktionellem Protein exprimiert. Daher wurde versucht, eine erhöhte Expression der humanen Fucokinase (hFUK), der humanen Kinase-Domäne alleine (hFUK-Kinase-Domäne) sowie der Kinase-Domäne der murinen Fucokinase (mFUK-Kinase-Domäne) als Fusionsprotein mit einem GST-Tag in *E. coli* zu erlangen. Die Kinase-Domänen des humanen bzw. des murinen Enzyms sind jeweils am C-terminalen Ende der Proteine lokalisiert (Abb. 7).



**Abb. 7: Übersicht über die humane und murine Fucokinase-cDNA-Sequenzen mit dem kompletten kodierenden Bereich und den entsprechenden Kinase-Domänen.**

Um die Überexpression der Proteine zu ermöglichen, wurden zunächst die cDNAs in einen prokaryontischen Expressionsvektor kloniert. Der Vektor pGEX (Abb. 8) kodiert für die

Glutathion-S-Transferase (GST). GST ist ein 26 kDa großes Protein aus *Schistosoma japonicum*, welches mit dem zu exprimierenden Protein N-terminal fusioniert wird. Der GST-Tag vereinfacht die Reinigung von rekombinanten Proteinen nach der Expression in *E. coli* und ermöglicht den Nachweis des Proteins durch den Einsatz von GST-Antikörpern. GST führt zusätzlich zu einer erhöhten Löslichkeit von Proteinen, die gerade bei den vorangegangenen Expressionsversuchen problematisch war. Über die Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie lässt sich das Protein aus dem Proteingemisch reinigen und mit dem GST-Antikörper detektieren. Die Abspaltung des GST-Tags wird durch eine entsprechende Schnittstelle für die Thrombin-Protease, die sich zwischen der GST-Protein-Sequenz und der Sequenz des rekombinanten Proteins befindet, ermöglicht.

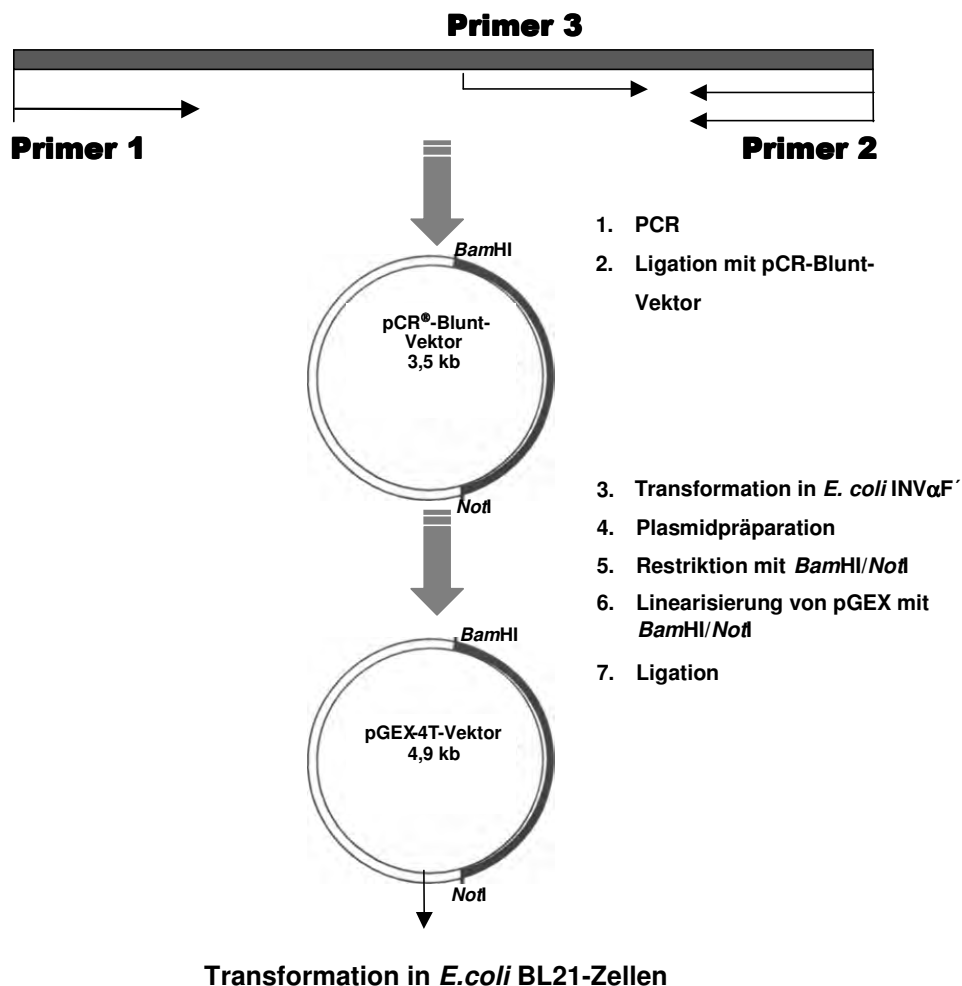


**Abb. 8: Genkarte des pGEX-4T-Vektors.**

Oben sind die Spaltstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen gezeigt.

#### 4.1.1 Konstruktion der Expressionsvektoren für die humane Fucokinase (hFUK) und für die separate humane Fucokinase-Domäne

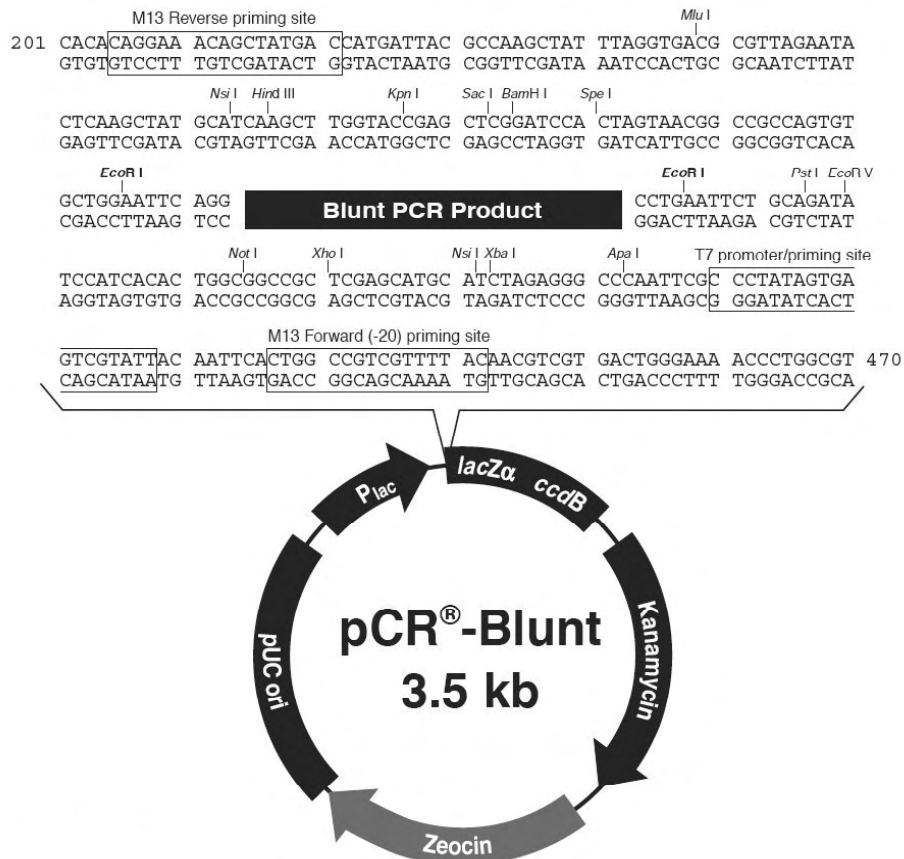
Als Basis für die Expression der humanen Fucokinase als auch der Kinase-Domäne diente das rekombinante Plasmid pCMV-SPORT6/hFUK. Dafür wurde es zunächst in kompetente *E. coli*-Zellen eingeschleust. Nach der Selektion mit Ampicillin sind einzelne, kleine, punktförmige, weiße Kolonien auf den Agarplatten gewachsen. Diese Klone wurden vermehrt und aus ihnen wurde Plasmid-DNA präpariert. Die isolierte DNA wurde durch Restriktionsverdau mit verschiedenen Kombinationen von Restriktionsenzymen (*NotI*, *SalI*, *HindIII*, *XhoI*, *EcoRI*) auf die erwartete Fragmentlänge geprüft (Daten nicht wiedergegeben). Die weitere Konstruktion der cDNAs erfolgte mittels einer PCR-Strategie (Abb. 9).



**Abb. 9: Strategie zur Klonierung der Fucokinase-cDNA in den pGEX-Vektor.**

Dargestellt sind das Fucokinase-cDNA-Konstrukt und die weiterführende Klonierung in den Expressionsvektor pGEX-4T. (Erklärung für Primer 3 s. 4.1.2).

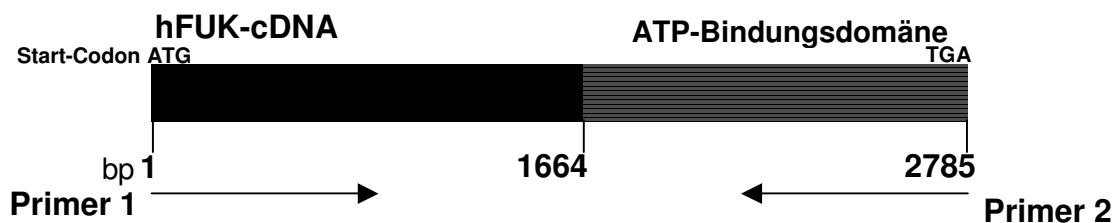
Die für die Klonierung benötigten DNA-Sequenzen wurden mit den entsprechenden Primern mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte in den pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor kloniert. Der pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor (Abb. 10) hat eine Länge von 3500 bp und trägt das Kanamycin-Resistenzgen, das bei der Transformation in Zellen eine Selektion ermöglicht. Der pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor eignet sich direkt für die Ligation von PCR-Produkten, wobei eine Modifizierung z.B. durch Restriktionsenzyme nicht notwendig ist.



**Abb. 10: Die Genkarte des pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektors.**

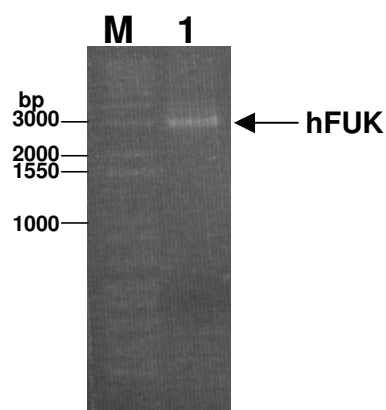
Die Polyklonierungsstelle zeigt die Sequenz mit den Schnittstellen der angegebenen Restriktionsendonucleasen. pUC ori stellt den Replikationsursprung dar. Weiterhin sind die Kanamycin- und Zeocin-Resistenzge als Selektionsmarker, und der P<sub>lac</sub>-Promotor für das lacZ'-Gen gezeigt.

Das humane-Fucokinase-Gen aus dem pCMCV-SPORT-6/hFUK wurde mittels PCR bei einer Temperatur von 62°C unter dem Einsatz von Pfx-Polymerase amplifiziert. Für die Amplifikation der humanen Fucokinase diente Primer 1 als *sense*- und Primer 2 als *antisense* (Abb. 11). Danach war eine cDNA der Größe von 2785 bp zu erwarten.



**Abb. 11: Schematische Darstellung der Position der Primer für die PCR von *hFUK*-cDNA.**

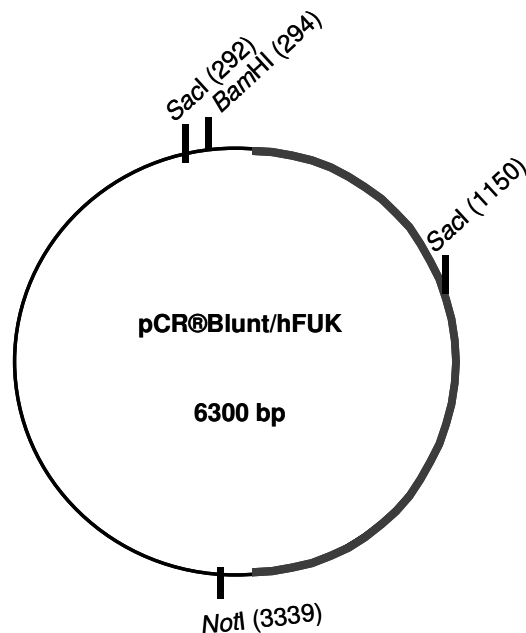
Die PCR-Produkte wurden der Größe nach analysiert, aus dem Agarosegel extrahiert, gereinigt und nochmals durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Bande mit knapp 3000 bp (Abb. 12), die durch die Amplifikation von *hFUK* mit Primer 1 und Primer 2 entstand, entspricht dem erwarteten Amplifikationsprodukt aus der vollständigen humanen Fucokinase-cDNA-Sequenz und wurde für die weitere Klonierung in den pCR®-Blunt-Vektor eingesetzt.



**Abb. 12: Agarosegel des PCR-Produktes der humanen Fucokinase-cDNA-Amplifikation nach der Gelextraktion.**

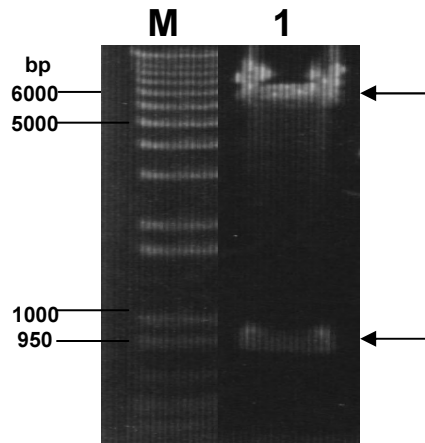
Spur M: DNA-Marker; Spur 1: PCR-Produkt nach der Amplifikation der *hFUK* mit Primer 1 und Primer 2.

Das PCR-Produkt wurde mit dem pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor ligiert. Das dabei entstandene rekombinante Plasmid pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK hat eine Größe von 6300 bp. Das Konstrukt pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK wurde in *E. coli* TOP-10 kompetente Zellen eingeschleust, auf LB-Selektionsplatten mit Kanamycin ausplattiert und über Nacht inkubiert. Die auf der Platte gewachsenen kleinen, weißen Kolonien zeigten eine Kanamycin-Resistenz. Im Anschluss daran wurden einzelne Klone kultiviert und die Plasmid-DNA durch Minipräparation isoliert. Um zu überprüfen, ob das Insert vollständig und in der richtigen Orientierung in den Vektor ligiert wurde, erfolgte eine Analyse des rekombinanten Plasmids durch den Restriktionsverdau mit *NotI*, *Bam*HI und *SacI* Restriktionsendonukleasen (Abb. 13). Bei dem Restriktionsverdau des rekombinanten pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK-Vektors mit *NotI*/*Bam*HI waren die erwarteten Banden von 3000 bp und von 3500 bp zu beobachten (Daten nicht wiedergegeben). Um zu überprüfen, ob das Gen in der richtigen Orientierung in dem Vektor vorliegt, wurde der rekombinante pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK-Vektor mit der Restriktionsendonuklease *SacI* geschnitten. Das Enzym schneidet einmal in dem pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor sowie in dem Insert. Danach sind eine Bande von 900 bp und eine Bande von 5600 bp zu erwarten. Liegt das Gen falsch orientiert vor, sind Banden von 4300 bp und 2200 bp möglich. Abb. 14 zeigt, dass das Gen in korrekter Orientierung vorliegt. Nachdem dieses Ergebnis sich wiederholt bestätigte, wurden die Klone mittels DNA-Sequenzierung analysiert. Die mutationsfreien Klone wurden für die weitere Klonierung eingesetzt.



**Abb. 13: Der Vektor pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK.**

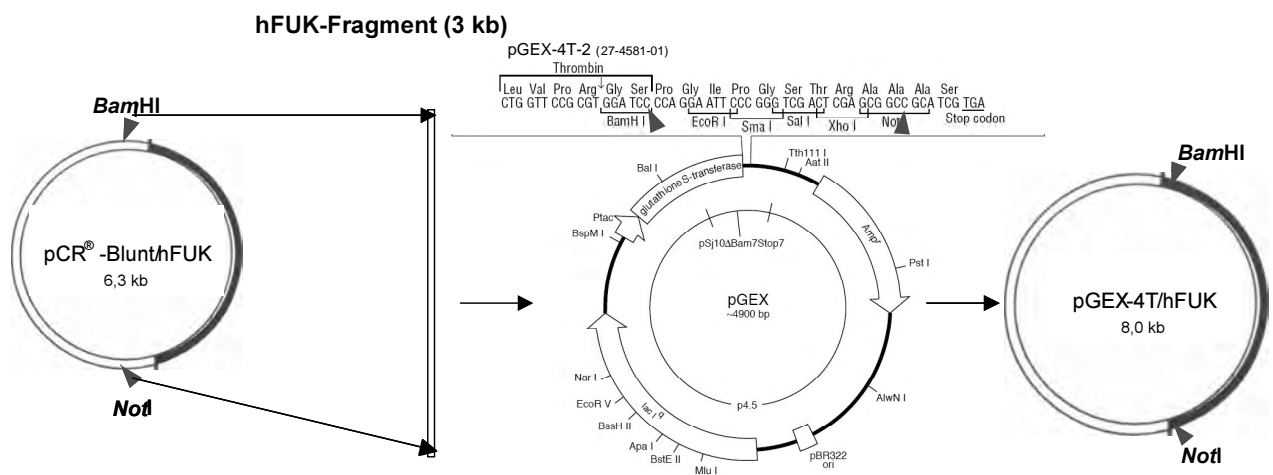
Die grüne Linie stellt die Sequenz des hFUK-Gens dar, die schwarze Linie die Sequenz des pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektors. Angezeigt sind zusätzlich die Schnittstellen für die benutzten Restriktionsendonukleasen.



**Abb. 14: Agarosegel nach dem Verdau des Vektors pCR®-Blunt/hFUK mit *SacI*.**

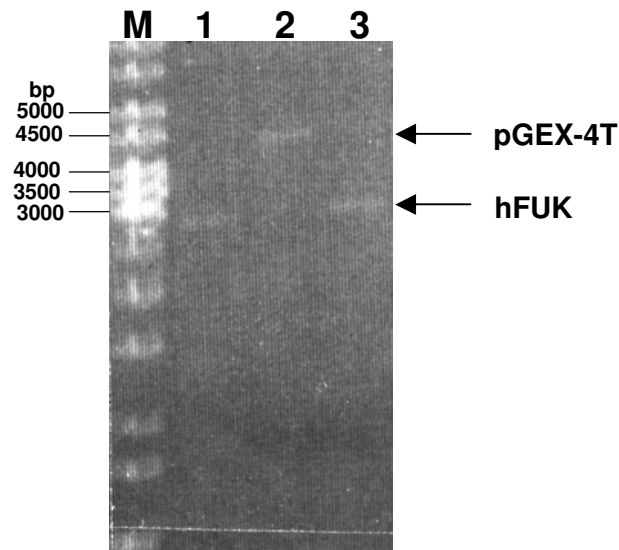
Spur M: DNA-Marker; Spur 1: pCR®-Blunt/hFUK verdaut mit *SacI*. Die schwarzen Pfeile deuten auf die entstandenen Fragmente hin.

Für die Klonierung der hFUK in den pGEX-4T-Vektor wurde das Gen aus pCR®-Blunt/hFUK mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (*Bam*HI und *Not*I) ausgeschnitten. Das FUK-Fragment wurde mit dem Expressions-pGEX-4T-Vektor ligiert, wobei das Konstrukt pGEX-4T/hFUK mit einer Größe von ca. 8000 bp zu erwarten war (Abb. 15). Danach wurde der mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I geschnittene pGEX-4T-Vektor und das hFUK-DNA-Fragment mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und aus dem Gel extrahiert.



**Abb. 15: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des Konstruktes pGEX-4T/hFUK.**

Die Abb. 16 zeigt das Kontroll-Agarosegel nach der Extraktion der entsprechenden Fragmente. Als Kontrolle für die hFUK diente das hFUK-PCR-Produkt, das hier als Bande in der Größe von 3000 bp zu sehen ist. Die Bande des geschnittenen pGEX-4T-Vektors ist in der Größe von 5000 bp nachweisbar. Die hFUK aus dem pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK befindet sich bei 3000 bp.



**Abb. 16: Der pGEX-4T-Vektor und die Inserts nach dem Restriktionsverdau mit *Bam*HI/*Not*I und anschließender Gelextraktion (Agarosegel).**

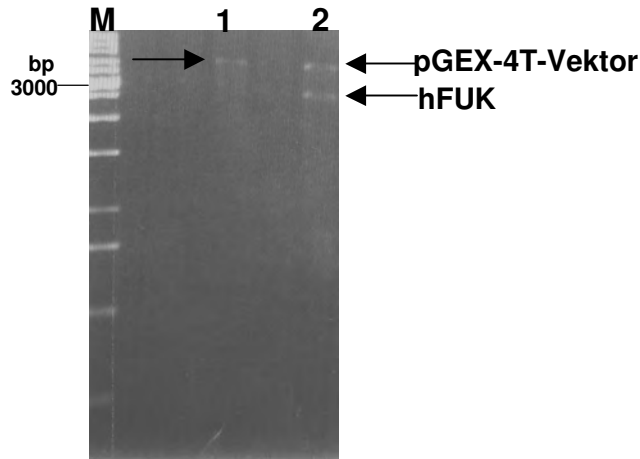
Spur M: DNA-Marker; Spur 1: Kontrolle hFUK-PCR-Produkt; Spur 2: mit *Bam*HI/*Not*I verdauter pGEX-4T-Vektor; Spur 3: hFUK aus pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK.

Da die durch die Gelextraktion erhaltenen DNA-Fragmente den Erwartungen entsprachen, sind sie für die Ligation mit dem pGEX-4T-Vektor verwendet worden. Nach der Transformation in One Shot<sup>®</sup>-TOP10 kompetente Zellen und der Selektion auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ist die DNA-Isolierung mittels Minipräparation durchgeführt worden. Die Analyse von DNA aus unterschiedlichen Klonen wurde mit den Restriktionsendonucleasen *Not*I und *Bam*HI durchgeführt. Bei den Klonen, die das humane Fukokinase-Gen (pGEX-4T/hFUK) beinhalten, ist ein Fragment in der Größe von 2792 bp und von 4500 bp zu erwarten. Als Negativkontrolle für die Restriktionsanalyse diente der mit *Bam*HI/*Not*I linearisierte pGEX-4T-Vektor (Abb. 17). Nach dem Restriktionsverdau des rekombinanten pGEX-4T/hFUK-Vektors sind wie erwartet 2 Banden mit der Größe 5000 bp und 3000 bp im Agarosegel zu sehen.

Aus dem Klon wurden neue Bakterienkulturen gezüchtet und für die weitere Sequenzanalyse eingesetzt. Die Analyse zeigte eine komplette Übereinstimmung mit der cDNA-Sequenz der



humanen Fucokinase. Das rekombinante Plasmid wurde schließlich für die Expression von humaner Fucokinase in *E. coli* BL21-Zellen verwendet.

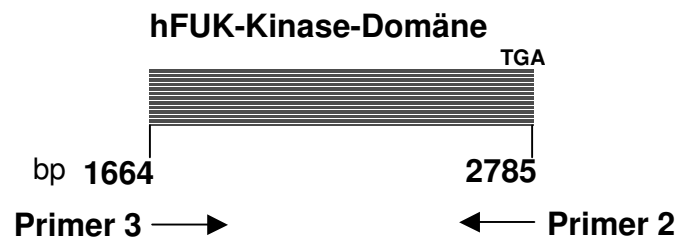


**Abb. 17: Analyse von pGEX-4T/hFUK durch den Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Not*I (Agarosegel).**

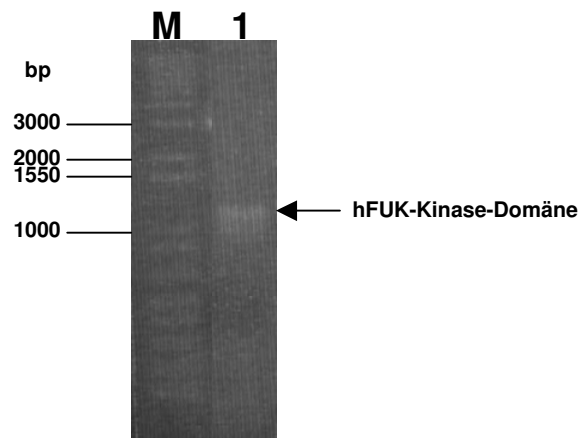
Spur M: DNA-Marker; Spur 1: pGEX-4T-Vektor verdaut mit *Bam*HI /*Not*I; Spur 2: pGEX-4T/hFUK verdaut mit *Bam*HI/*Not*I.

#### 4.1.2 Konstruktion des Expressionsvektors für hFUK-Kinase-Domäne

Das Gen der humanen Fucokinase-Domäne wurde aus dem pCMV-SPORT-6/hFUK mittels PCR amplifiziert. Für die Amplifikation der Kinase-Domäne diente Primer 3 als *sense*- und Primer 2 als *antisense*-Primer (Abb. 18). Nach der Amplifikation der hFUK-Kinase-Domäne ist eine Bande von 1121 bp zu erwarten. Das PCR-Produkt wurde auf das Agarosegel aufgetragen. Die Größe des PCR-Produkts wurde analysiert. Die Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, extrahiert und eine erneute Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese wurde vorgenommen (Abb. 19). Nach der Amplifikation der hFUK-Kinase-Domäne ist das entstandene PCR-Produkt als eine Bande in der Größe von 1200 bp im Agarosegel zu sehen. Da das PCR-Produkt die erwartete Bandengröße aufwies, wurde es für die weitere Klonierung in den pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor verwendet.

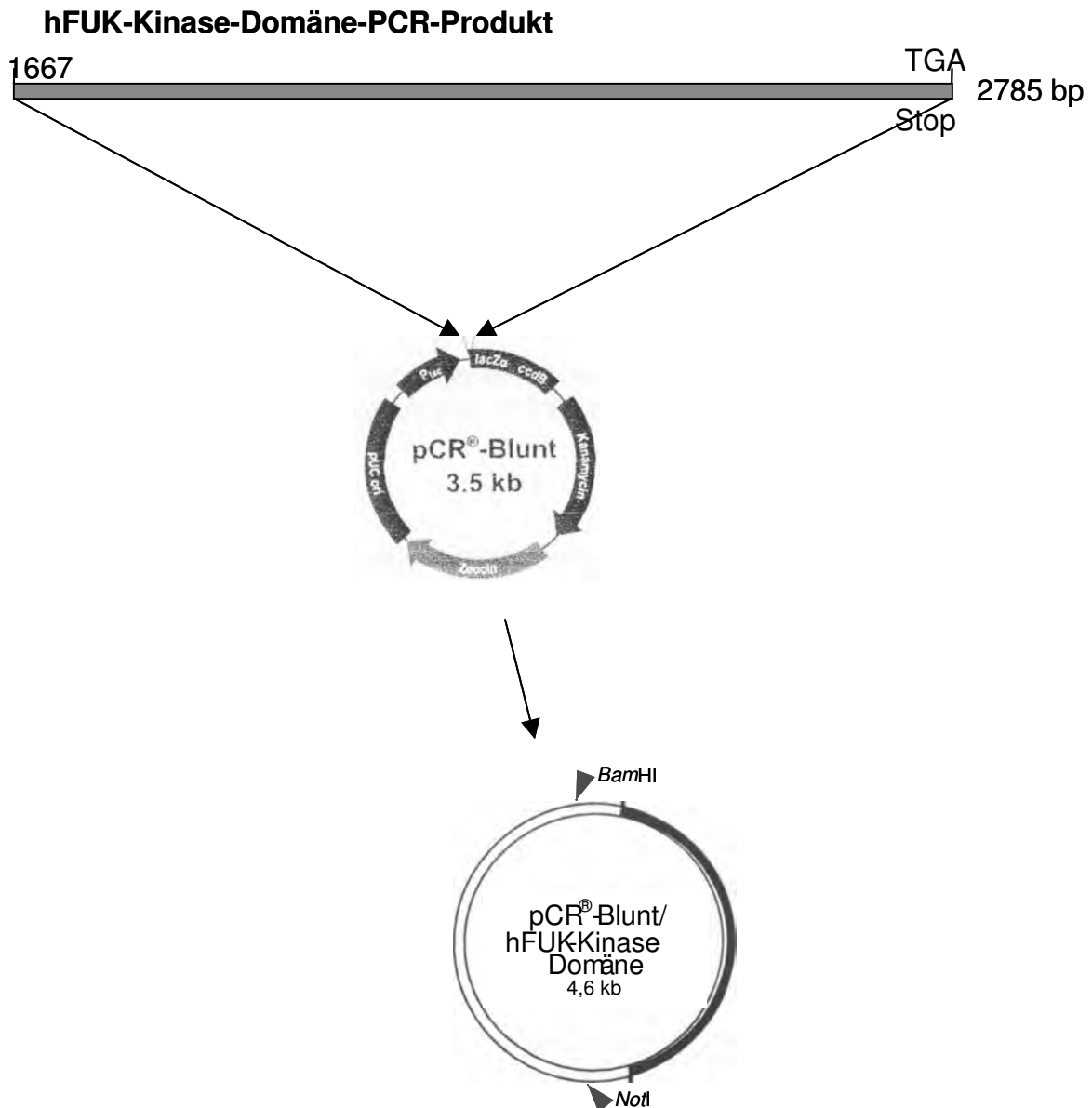


**Abb. 18:** Schematische Darstellung der Position der Primer für die PCR der hFUK-Kinase-Domäne.



**Abb. 19:** Analyse des PCR-Produktes der Amplifikation der hFUK-Kinase-Domäne nach der Gelextraktion.

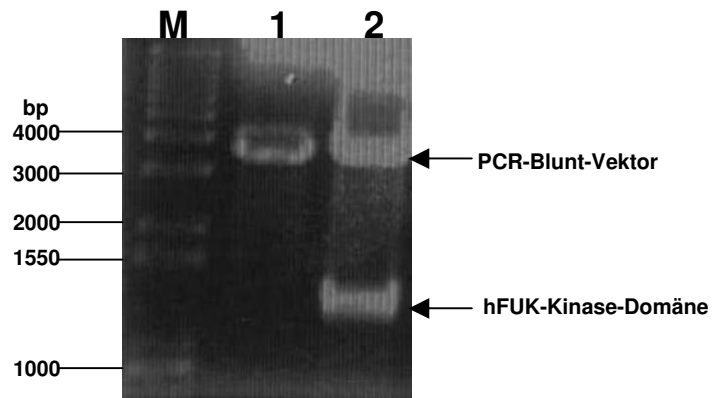
Spur M: DNA-Marker; Spur 1: PCR-Produkt nach der Amplifikation der hFUK-Kinase-Domäne mit Primer 3 und Primer 2.



**Abb. 20: Schematische Darstellung der Klonierung der hFUK-Kinase-Domäne in den pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor.**

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit dem pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor ligiert, so dass eine rekombinante Plasmid pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK-Kinase-Domäne von 4600 bp entstand (Abb. 20). Das Konstrukt wurde in *E. coli* TOP10-kompetente Zellen transferiert, auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den kanamycinresistenten Klonen erfolgte eine Plasmidpräparation und anschließend die Kontrolle der Plasmid-DNA des pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK-Kinase-Domäne-Konstruktes durch eine Restriktionsanalyse mit *NotI*/*Bam*HI. Nach dem Restriktionsverdau der pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK-Kinase-Domäne, ist eine Bande von 1200 und eine Bande von 3500 bp zu erwarten. Als Kontrolle diente der mit *NotI*/*Bam*HI verdaute pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor.

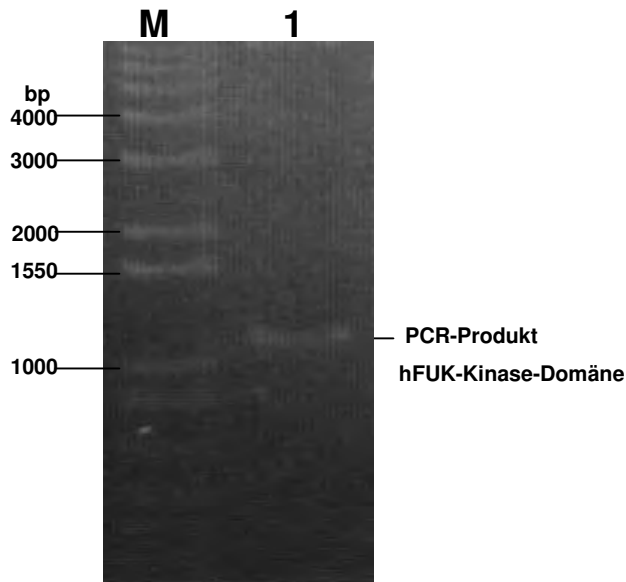
Nach der elektrophoretischen Trennung sind in dem Agarosegel zwei Banden zu sehen (Abb. 21). Eine Bande liegt zwischen 3000 und 4000 bp, was der Größe des linearisierten Vektors entspricht. Die zweite Bande hat die Größe entsprechend der Erwartung von 200 bp.



**Abb. 21: Agarosegel nach dem Verdau des Konstruktes pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK-Kinase-Domäne mit *Bam*HI und *Not*I.**

Spur M: DNA-Marker; Spur 1: pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor verdaut mit *Bam*HI/*Not*I; Spur 2: pCR<sup>®</sup>-Blunt/hFUK-Kinase-Domäne verdaut mit *Bam*HI/*Not*I.

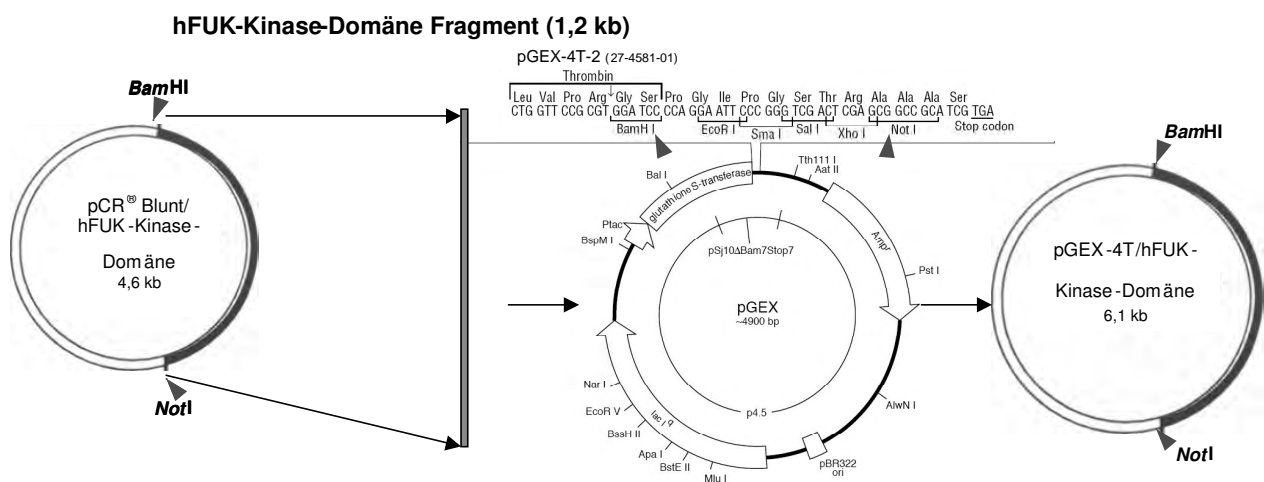
Aus den obigen Daten lässt sich allerdings nicht schließen, ob das Kinase-Domäne-Gen in der richtigen Orientierung ligiert worden ist. Da es keine passenden Restriktionsnukleasen für eine entsprechende Überprüfung gibt, ist die Analyse mit PCR durchgeführt worden. Die PCR-Analyse der Kinase-Domäne ist mit dem Blunt-Primer, der in der Blunt-Vektorsequenz hybridisiert und Primer 2 als *antisense* Primer für die Hybridisierungsstelle im Insert, durchgeführt worden.



**Abb. 22: Agarosegel nach der PCR der pCR®-Blunt/hFUK-Kinase-Domäne.**

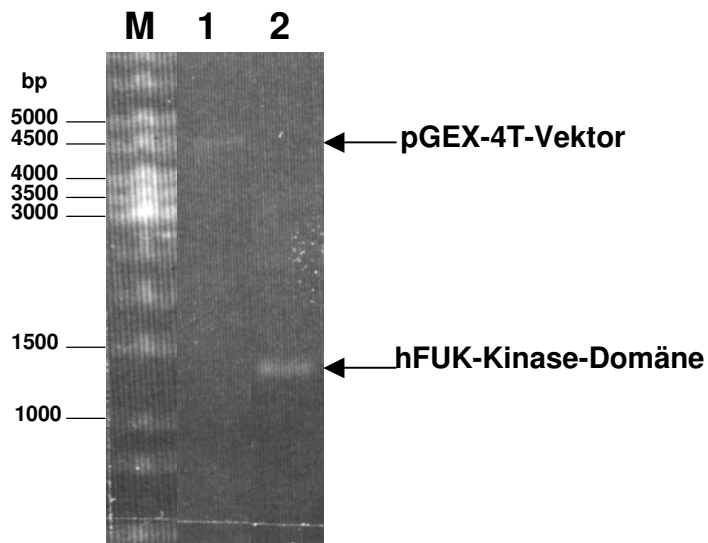
Die PCR erfolgte mit Blunt-Primer und Primer 2. Spur M: DNA-Marker; Spur 1: PCR-Produkt.

Nach der PCR von pCR®-Blunt/hFUK-Kinase-Domäne ist ein Produkt zu erwarten, das der Länge der vollständigen Sequenz der Kinase-Domäne von ca. 1200 bp entspricht. Nach der Analyse ist die entsprechende diskrete Bande der Größe von 1200 bp zu sehen (Abb. 22). Die DNA mehrerer Klone wurde anschließend sequenziert. Das Plasmid eines mutationsfreien Klons wurde zur weiteren Klonierung in den pGEX-T4-Vektor eingesetzt (Abb. 23).



**Abb. 23: Schematische Darstellung der Klonierung der hFUK-Kinase-Domäne in den pGEX-4T-Vektor.**

Die hFUK-Kinase-Domäne wurde aus dem durchsequenzierten, mutationsfreien, rekombinanten pCR®Blunt/hFUK-Kinase-Domäne-Vektor mit den Restriktionsenzymen BamHI/NotI ausgeschnitten. Der pGEX-4T-Vektor wurde ebenfalls durch BamHI/NotI geschnitten. Vor der Ligation erfolgte die Analyse mittels Agarosegel-Elektrophorese (Abb. 24). Der pGEX-4T-Vektor in der Größe von 450 bp und das ausgeschnittene hFUK-Kinase-Domäne-Fragment ist in der Größe von ca. 1300 bp zu sehen.

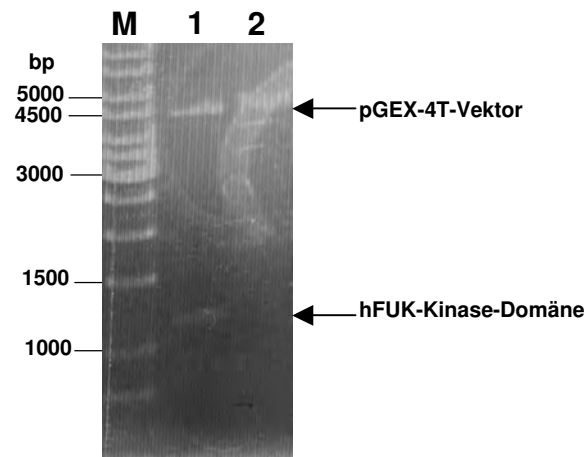


**Abb. 24: Analyse des hFUK-Kinase-Domänen-Fragments und des linearisierten pGEX-4T-Vektors.**

Spur M: DNA-Marker; Spur 1: pGEX-4T-Vektor verdaut mit *Bam*HI/*Not*I; Spur 2: hFUK-Kinase-Domäne ausgeschnitten mit *Bam*HI/*Not*I aus dem pCR®-Blunt/hFUK-Kinase-Domänen-Plasmid.

Der linearisierte pGEX-4T-Vektor und das hFUK-Kinase-Domäne-DNA-Fragment wurden anschließend aus dem Gel extrahiert und das hFUK-Kinase-Domäne-Gen mit dem pGEX-4T-Vektor ligiert. Nach der Einschleusung in One Shot®TOP10 kompetente Zellen und der Selektion auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin, ist die DNA-Isolierung des pGEX-4T/hFUK-Kinase-Domäne-Konstruktes (6100 bp) mittels Minipräparation durchgeführt worden. Durch den Restriktionsverdau des Plasmids mit *Bam*HI/*Not*I ist ein Fragment von 1191 bp und ein Fragment von 4500 bp zu erwarten. Nach dem Restriktionsverdau des Plasmids sind zwei Fragmente nachzuweisen. Ein Fragment gleicht der Kontrolle, das zweite Fragment befindet sich zwischen den Markerbanden von 1000 und 1500 bp (Abb. 25). Da mehrere Klone des pGEX-4T/hFUK-Kinase-Domäne-Konstruktes dieses Ergebnis zeigten, wurden potentiell positive Klone zur Sequenzanalyse eingesetzt. Nach dem Vergleich der Sequenzen wurden

entsprechende, mutationsfreie, rekombinante Plasmide des pGEX-4T/hFUK-Kinase-Domäne-Konstruktes für die Expression von Kinase-Domäne in *E. coli* BL21-Zellen verwendet.

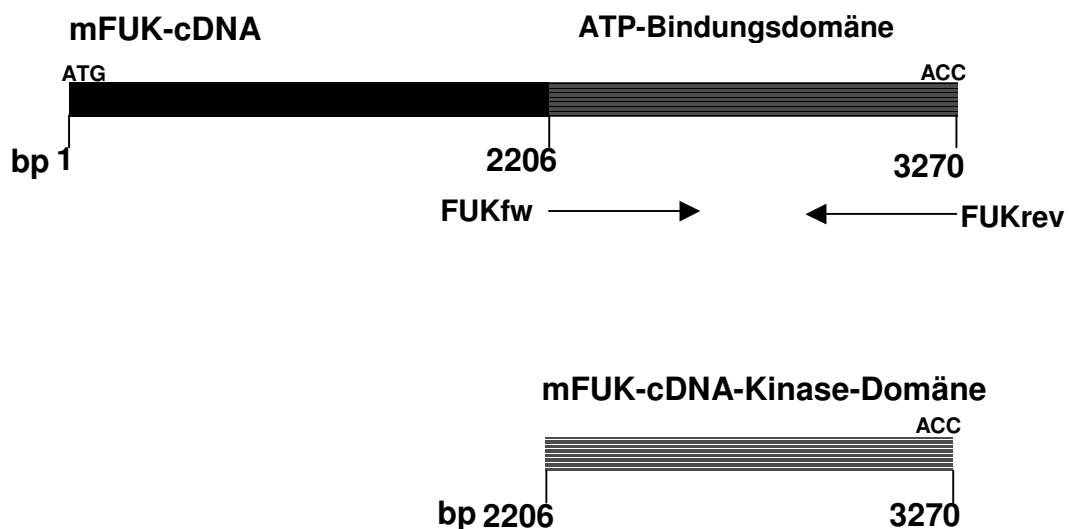


**Abb. 25: Analyse des pGEX-4T/hFUK-Kinase-Domäne-Konstruktes durch den Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Not*I (Agarosegel).**

Spur M: DNA-Marker; Spur 1: pGEX-4T/hFUK-Kinase-Domäne verdaut mit *Bam*HI/*Not*I; Spur 2: pGEX-4T-Vektor verdaut mit *Bam*HI/*Not*I.

#### 4.1.3 Konstruktion des Expressionsvektors für murine Fucokinase (mFUK)-Kinase-Domäne

Die mFUK-cDNA-Kinase-Domäne-Sequenz aus dem Vektor pQM-NTag/A wurde mittels PCR amplifiziert. Bei dieser Amplifikation wurde eine neue Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* einkloniert. Dieses amplifizierte Fragment mFUK-Kinase-Domäne hat 1064 bp (Abb. 26).



**Abb. 26: Schematische Darstellung der Position der Primer für die PCR der mFUK-Kinase-Domäne.**

Die Primer FUKfw und FUKrev sind für die Amplifikation eingesetzt worden. Der Primer FUKfw wurde mit einer *EcoRI*-Schnittstelle ergänzt.

Die Größe des Amplifikats wurde im Agarosegel analysiert, aus dem Gel extrahiert und für die weitere Klonierung in dem pCR<sup>®</sup>-Blunt-Vektor eingesetzt. Das mFUK-Kinase-Domäne-Gen wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* aus dem pCR<sup>®</sup>-Blunt/mFUK-Kinase-Domäne-Plasmid ausgeschnitten und in den durch Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XbaI* geschnittenen pGEX-4T-Vektor ligiert. Das Konstrukt pGEX-4T/mFUK-Kinase-Domäne wurde nach der Sequenzanalyse für die Expression in *E. coli* BL21-Zellen eingesetzt (Abb. 27).



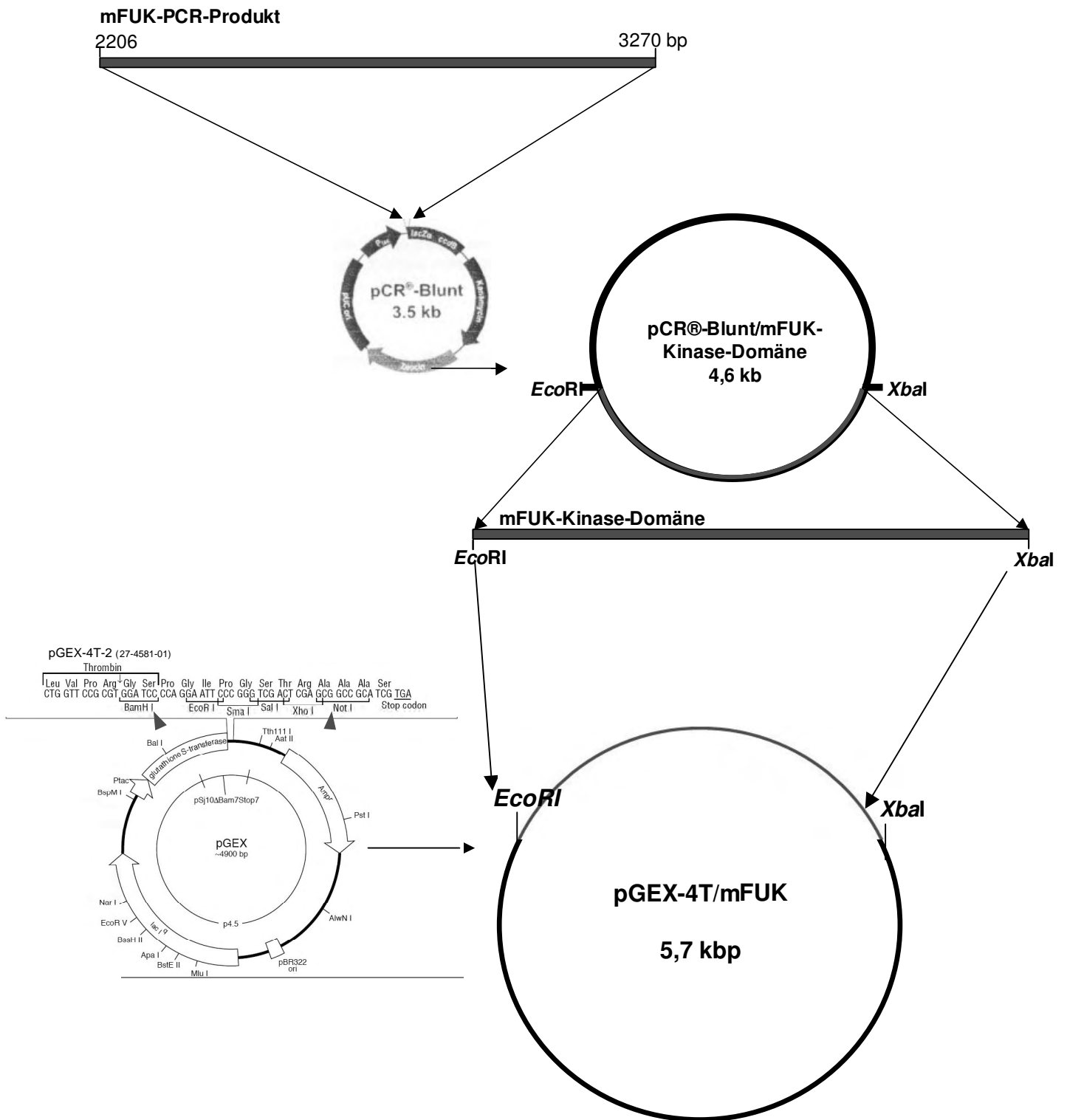
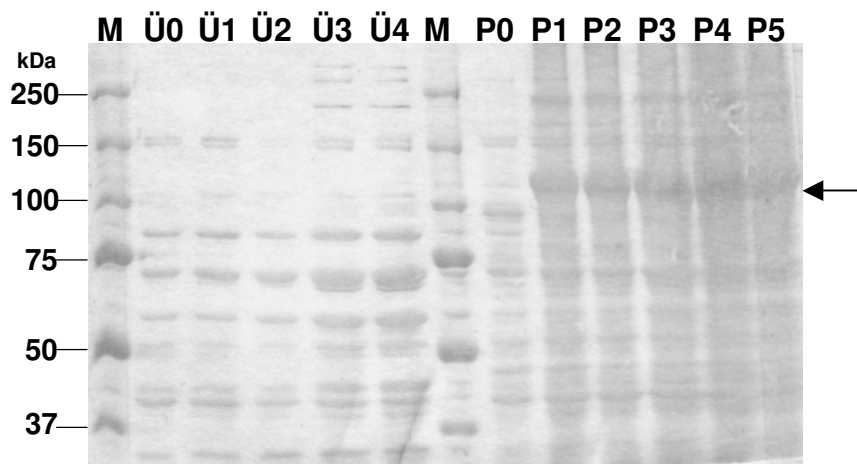


Abb. 27: Strategie zur Klonierung der mFUK-Kinase-Domäne in den pGEX-4T-Vektor.

#### 4.1.4 Expression der hFUK in *E. coli* BL21-Zellen

Die Pilotexpression der hFUK erfolgte in *E. coli* BL21-Zellen und wurde mit dem Konstrukt pGEX-4T/hFUK durch Induktion unter verschiedenen Expressionsbedingungen durchgeführt. Die Größe des rekombinanten Proteins wurde aus der cDNA-Sequenz mit 100 kDa vorhergesagt. Nach erfolgter Expression, Lyse der Zellen und Zentrifugation konnte in der SDS-PAGE nach der Coomassie-Färbung eine überexprimierte Bande mit der entsprechenden Größe im Sediment identifizieren werden (Abb. 28). Zusätzlich wurde eine Western-Blot-Analyse mit Anti-GST-Antikörpern durchgeführt, die weder ein Signal im Überstand zeigte, noch die überexprimierte Bande des hFUK-Proteins erkennen ließ. Diese Expression der humanen Fucokinase lieferte somit kein Protein für weitere Analysen.



**Abb. 28: SDS-PAGE der Pilotexpression des Konstruktes pGEX-4T/hFUK in *E. coli* BL21-Zellen.**

Spur M: Protein-Marker; Spur Ü0: Negativkontrolle-Überstand; Spuren Ü1-Ü4: Überstand nach der Inkubation von 1-4 h; Spur P0: Negativkontrolle Sediment; Spuren P1-P5: Sediment nach der Inkubation von 1-5 h. Der schwarze Pfeil zeigt die überexprimierten Banden.

#### 4.1.5 Expression der hFUK-Kinase-Domäne in *E. coli* BL21-Zellen

Die Expression der hFUK-Kinase-Domäne in *E. coli* BL21-Zellen wurde mit dem mutationsfreien Konstrukt pGEX-4T/hFUK-Kinase-Domäne unter verschiedenen Expressionsbedingungen durchgeführt. Die Pilotexpression der Kinase-Domäne der humanen Fucokinase zeigte, dass die optimalen Expressionsbedingungen nach einer Induktion mit 100  $\mu\text{mol/l}$  IPTG im Schüttelinkubator ab 3 h bei 37°C vorliegen. Nach der Expression wurden die *E. coli* BL21-Zellen geerntet und lysiert. Die lösliche Fraktion des Zelllysates wurde über eine GST-Sepharose-Säule gereinigt. Bei dieser Affinitätschromatographie bindet der spezifische Ligand den GST-Tag der rekombinanten Proteine an die Sepharose und die rekombinanten Proteine können so aus dem Proteingemisch abgetrennt werden. Das rekombinante Protein wurde eluiert und die Proteinmenge in den Fraktionen ermittelt (Abb. 29). Dabei wurde insgesamt 127  $\mu\text{g}$  hFUK-Kinase-Domäne-Protein chromatographisch gereinigt.

Da das exprimierte, rekombinante Kinase-Domäne-Protein sehr schwach in der Coomassie-Färbung sichtbar war, wurde nach der Elektrophorese die Silber-Färbung vorgenommen. In Abb. 30 (oberer Bildteil) ist die SDS-PAGE des exprimierten, rekombinanten Kinase-Domäne-Proteins nach der Affinitätsreinigung über die GST-Sepharose-Säule zu sehen. Die Intensität und die Verteilung der blau gefärbten Proteinbanden verhält sich entsprechend der ermittelten Werte der Proteinkonzentration in den Fraktionen (Abb. 29). Es scheint eine leichte Konzentrationssteigerung in den Fraktionen 5 und 6 nach der Elution zu geben, was im SDS-PAGE als eine diskret blau gefärbte Bande mit einer Molmasse von 60 kDa zu sehen ist. In der Probe mit dem Sediment ist eine sehr intensiv blau gefärbte Bande in der Größe von 60 kDa zu sehen. In der silbergefärbten SDS-PAGE sind die Proteinbanden nach der Reinigung über die GST-Säule deutlicher nachweisbar. In den Fraktionen sind zwei sehr nah liegende Banden um 60 kDa zu erkennen. Das überexprimierte, rekombinante Protein der hFUK-Kinase-Domäne wurde somit in der SDS-PAGE als 60 kDa große Bande im Sediment, als auch gereinigt in den Fraktionen nachgewiesen. Mit einem Western-Blot konnte das hFUK-Kinase-Domäne-GST-Tag-Protein zusätzlich im Überstand und in den Fraktionen nachgewiesen werden. Das Sediment zeigte neben einer spezifischen Bande zusätzlich unspezifische Reaktionen (Abb. 31).

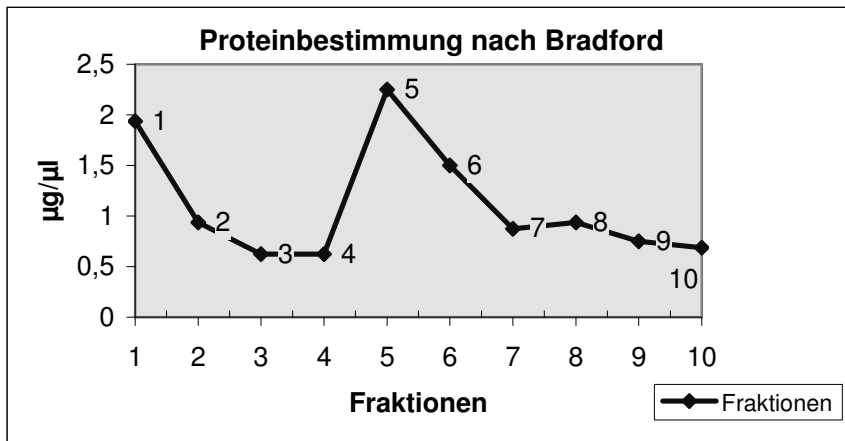


Abb. 29. Verlauf der Proteinkonzentration in den Fraktionen nach der GST-Affinitätschromatographie.

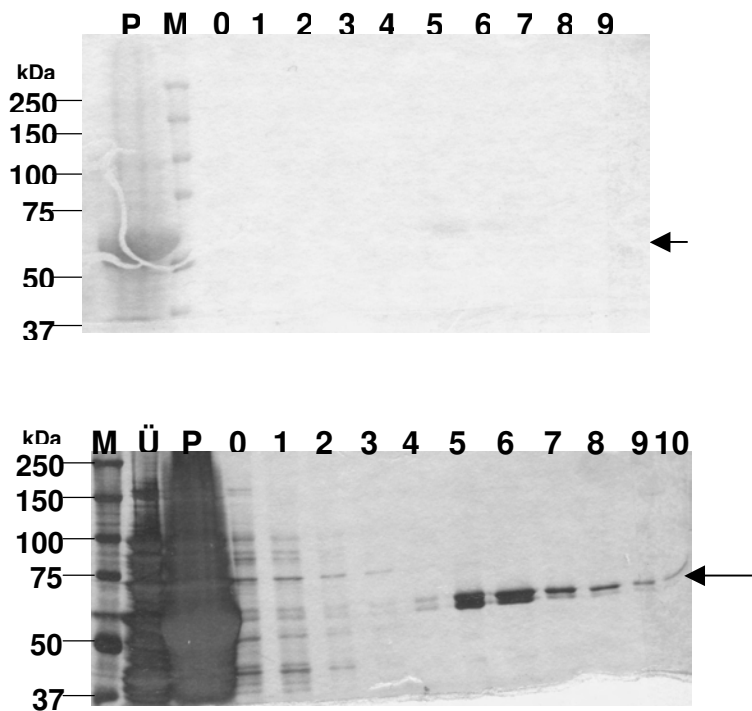
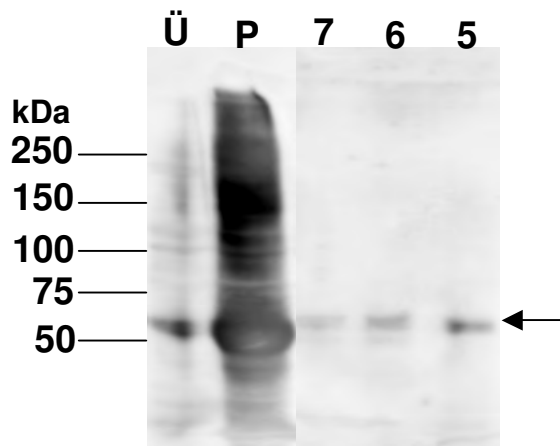


Abb. 30: SDS-PAGE des überexprimierten rekombinanten Kinase-Domäne-Proteins nach der GST-Affinitätschromatographie.

**Oben:** Coomassie-Färbung; Spur P: Sediment (10 µl); Spur M: Marker; Spur 0: Durchlauf; Spuren 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9: Fraktionen 1-9 nach der Affinitätschromatographie (je 25 µl). Der schwarze Pfeil weist auf die gereinigten Proteinbanden.

**Unten:** Silber-Färbung; Spur M: Marker; Spur Ü: Überstand (10 µl); Spur P: Sediment (10 µl); Spur 0: Durchlauf; Spuren 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10: Fraktionen 1 – 10 nach der Affinitätschromatographie (je 25 µl). Der schwarze Pfeil weist auf die gereinigten Proteinbanden.



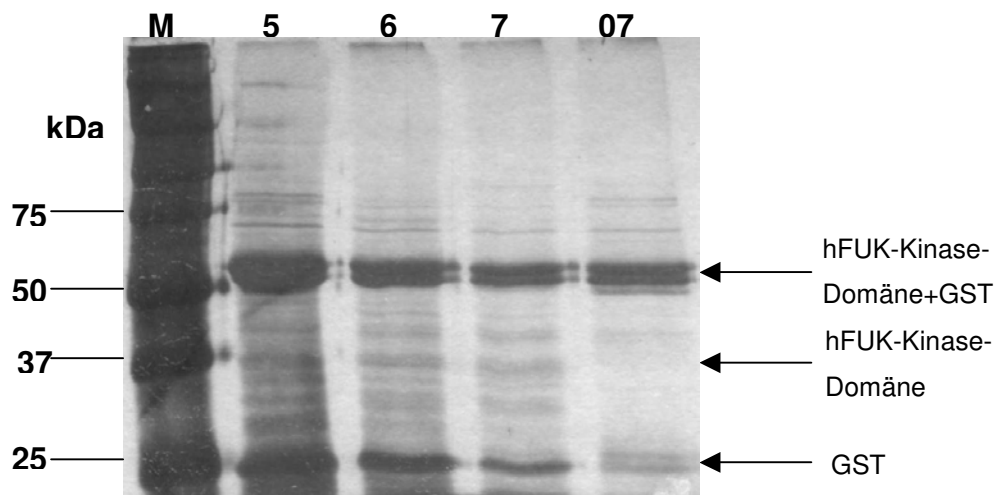
**Abb. 31: Western-Blot-Analyse der exprimierten hFUK-Kinase-Domäne.**

Spur Ü: Überstand; Spur P: Sediment; Spuren 7-5: Fraktionen 7-5 (s. Abb. 29). Der Pfeil deutet auf die hFUK-Kinase-Domäne.

Da rekombinante Proteine einen Einsatz als Antigene für die Herstellung von spezifischen Antikörpern haben können, ist durch den Einbau einer Thrombin-Schnittstelle zwischen dem GST-Tag und dem rekombinanten Protein die Möglichkeit der Abtrennung des Tags gegeben. Zudem hat der GST-Tag auch eine immunogene Wirkung, was jedoch die Herstellung von spezifischen Antikörpern negativ beeinflussen könnte. Die Abspaltung des GST-Proteins wurde mit der Thrombin-Protease durchgeführt. Um die Abspaltungsbedingungen zu optimieren, sind die Fraktionen über Nacht bei Raumtemperatur, sowie bei 37°C bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen inkubiert worden.

Als Negativ-Kontrolle wurde die Fraktion 7 aus der Affinitätschromatographie (s. o.) ohne Zugabe von Thrombin-Protease den gleichen Bedingungen ausgesetzt. Nach der Abspaltung von GST, ist neben dem GST selbst die Bande des hFUK-Kinase-Domäne-Proteins mit der erwarteten Größe von 37 kDa zu sehen (Abb. 32). Diese Bande zeigt sich nicht in der Negativ-Kontrolle.

Die gewonnene Menge an den hFUK-Kinase-Domäne-Protein war jedoch für eine Immunisierung nicht ausreichend. Bei dem Versuch die Ausbeute des Abspaltungsprodukts zu vergrößern, wurde die Thrombin-Protease direkt dem Überstand zugesetzt. Es konnte allerdings keine Erhöhung der Ausbeute erzielt werden (Daten nicht wiedergegeben).

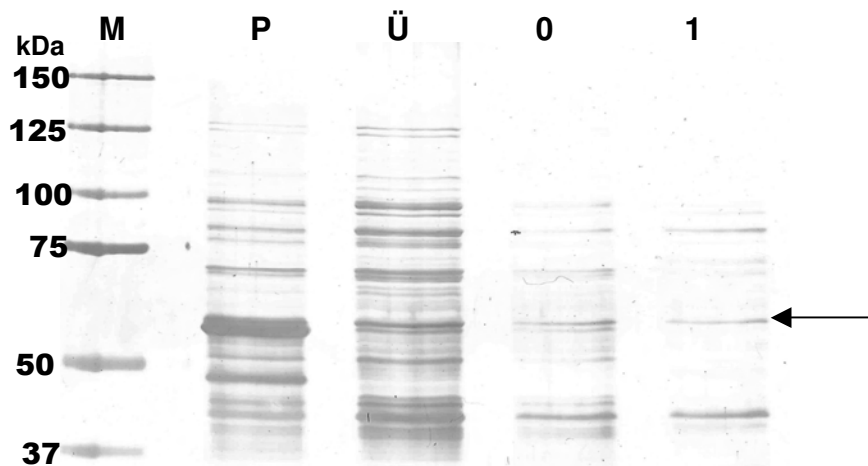


**Abb. 32: SDS-PAGE nach Thrombinverdau von GST-hFUK-Kinase-Domäne.**

Der Verdau erfolgte über Nacht bei 22°C. Spur M: Marker; Spuren 5-7: Fraktionen 5-7; Spur 07: Fraktion 7 ohne Zugabe von Thrombin-Protease.

#### 4.1.6 Expression mFUK-Kinase-Domäne in *E. coli* BL21 Zellen

Das durchsequenzierte und mutationsfreie pGEX-4T/mFUK-Kinase-Domäne-Konstrukt wurde für die Expression der mFUK-Kinase-Domäne in *E. coli* BL21 Zellen eingesetzt. Nach der Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen in der Pilotexpression (Daten nicht wiedergegeben) wurde eine weitere Expression durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert, zentrifugiert und in Sediment und der Überstand getrennt. Der Überstand wurde über eine GST-Säule gereinigt. Die Fraktionen und das Sediment sind dann mittels SDS-PAGE analysiert worden. Eine Überexpression des mFUK-Kinase-Domäne-Proteins mit GST, welches eine Größe von 60 kDa besitzt, zeigte sich im Sediment. Im Überstand, Durchlauf und Eluat ist ebenfalls eine diskrete Bande bei 60 kDa zu sehen (Abb. 33).

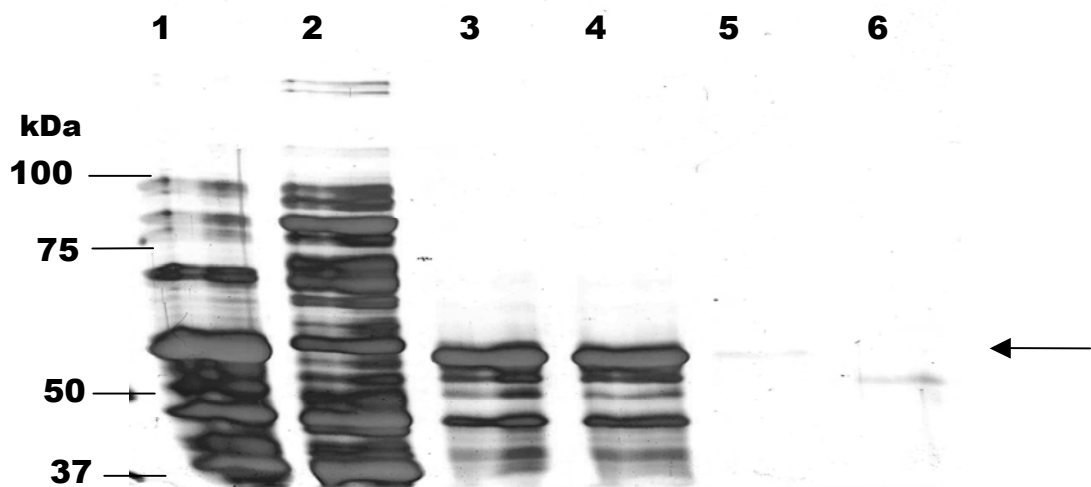


**Abb. 33: SDS-PAGE der Expression der mFUK-Kinase-Domäne.**

Spur M: Proteinmarker; Spur P: Sediment; Spur Ü: Überstand; Spur 0: Durchlauf; Spur 1: Eluat. Der schwarze Pfeil deutet auf die GST-mFUK-Kinase-Domäne.

Bei der Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurde häufig die Bildung von sogenannten Einschlusskörperchen (Inclusion-Bodies) beobachtet. Die Einschlusskörperchen stellen die unlöslichen Aggregate von ungefalteten Proteinen in der Zelle dar und entstehen bei der Überexpression des Proteins. Einschlusskörperchen befinden sich nach der Zellyse in der Sediment-Fraktion, sind meistens inaktiv und denaturiert. Die Löslichkeit solcher Proteine kann unter strengen denaturierenden Bedingungen erhöht werden.

Da die mFUK-Kinase-Domäne im Sediment vermutlich als Einschlusskörperchen vorliegt, sind Versuche zur Löslichkeitserhöhung mit dem Einsatz von Harnstoff vorgenommen worden. Das Sediment wurde dazu mit 6-molarer Harnstofflösung inkubiert. Danach folgte eine erneute Analyse des Produktes in den SDS-PAGE. Ein Teil der mFUK-Kinase-Domäne konnte dadurch gelöst werden. Eine anschließende GST-Affinitätschromatographie führte jedoch nicht zu einem sauberen Protein (Abb. 34).



**Abb. 34: SDS-PAGE nach der Inkubation des Sediments mit 6 mol/l Harnstoff.**

Spur 1: Sediment; Spur 2: Überstand; Spuren 3-4: Sediment-Fractions nach der vorherigen Behandlung mit 6 mol/l Harnstoff. Spuren 5-6: Fractions nach der GST-Affinitätschromatographie. Der schwarze Pfeil deutet auf die GST-mFUK-Kinase-Domäne.



## 4.2 Expression der Fucokinase in Insektenzellen

Da die Expression der humanen Fucokinase in *E. coli* BL21-Zellen nicht zu einem sichtbaren Erfolg geführt hat, wurde ein anderes Expressionssystem eingesetzt. Die Expression in Insektenzellen (Sf9-Zellen, HighFive™-Zellen) hat den Vorteil, dass durch hohe Transfektionsraten eine hohe Ausbeute an biologisch aktiven rekombinanten Proteinen gewonnen werden kann. Deshalb sollte versucht werden, die Fucokinase mit dem „Baculovirus Expression Vector System“ (BEVS) in Insektenzellen zu exprimieren (Abb. 36). Die Expression wurde mit dem Bac-to-Bac®-Expressions-System (Invitrogen) durchgeführt. Die Zellen werden dazu mit einem Baculovirus infiziert. Baculoviren gehören zu einer Familie von DNA-Viren, die ausschließlich Invertebraten und bevorzugt Insekten infizieren. Baculoviren haben ein großes doppelsträngiges, ringförmiges DNA-Genom. Aufgrund ihres flexiblen stäbchenförmigen Capsids sind sie in der Lage, größere Mengen an fremder DNA aufzunehmen. Für die meisten Expressionsexperimente wird der *Autographa californica nuclear polyhedrosis* Virus (AcNPV) verwendet. Als Wirtszellen haben sich Sf9-Zellen (aus *Spodoptera frugiperda*) und High Five™-Zellen aus *Tricholusia ni* etabliert. Infektiöse Viren werden von den Insektenzellen durch Fusion oder Endocytose aufgenommen und die virale DNA in den Zellkern eingeschleust. Dort beginnt nach etwa 6 h die Replikation der viralen DNA und der Zusammenbau von Viruspartikel (frühe Phase). Etwa 12 h nach der Infektion werden die ersten Viruspartikel durch Knospung freigesetzt und infizieren weitere Zellen (späte Phase). 24 h nach der Infektion werden große Mengen der Strukturproteine Polyhedrin und p10 gebildet (sehr späte Phase), die die Viruspartikel mit einer kristallinen Proteinhülle umgeben, um sie nach der Lyse der Insektenzelle zu schützen. Wegen der Größe des viralen Genoms wird das zu untersuchende Gen nicht direkt in die Virus-DNA inseriert, sondern zunächst in ein Transfer-Plasmid unter der Kontrolle eines Baculovirus-Promotors, oft des starken Polyhedrin-Promotors, kloniert. Das Gen wird zuerst in den pFastBac™-Vektor (Abb. 35), den Transfer- oder Donor-Vektor, inkloniert. Das zu exprimierende Gen wird am 5´ und 3´-Ende von der viralen DNA flankiert, so dass durch homologe Rekombination zwischen Donor-Plasmid und Baculovirus-DNA (Bacmid-DNA) ein rekombinanter Baculovirus gebildet wird, der das zu exprimierende Gen enthält. Die Bacmid-DNA kann dann für die weitere Herstellung des rekombinanten Virus durch die Infektion der Sf9-Zellen oder anderen Insektenzelllinien, z. B. HighFive-Zellen, benutzt werden (Amplifikation). Nach der Amplifikation von Viren kann die Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen gestartet werden. Um die optimalen Expressionsbedingungen für eine maximale Expression von rekombinantem Protein zu ermitteln, wurden Expressionen mit verschiedenen Linien (Sf9 und HighFive-Zellen), verschiedenen Konzentrationen an

rekombinanter Bacmid-DNA sowie unter verschiedenen MOI (multiplicity of infection), also dem Verhältnis von Viruszahl und Zellzahl, durchgeführt. Das exprimierte rekombinante Protein ist mit einem His-Tag fusioniert und kann über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und mit Anti-His-Tag-Antikörpern nachgewiesen werden.

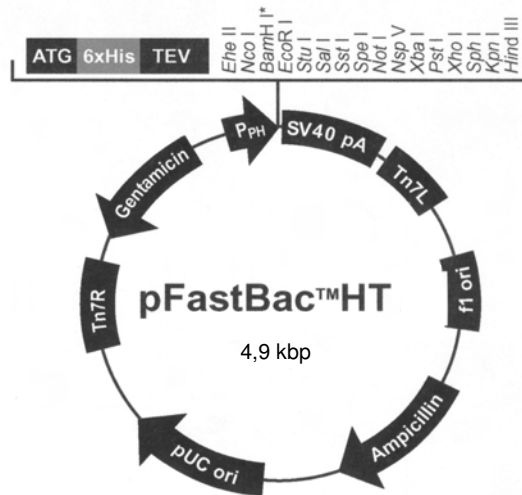


Abb. 35: Genkarte des pFastBac™-HT-Vektors.

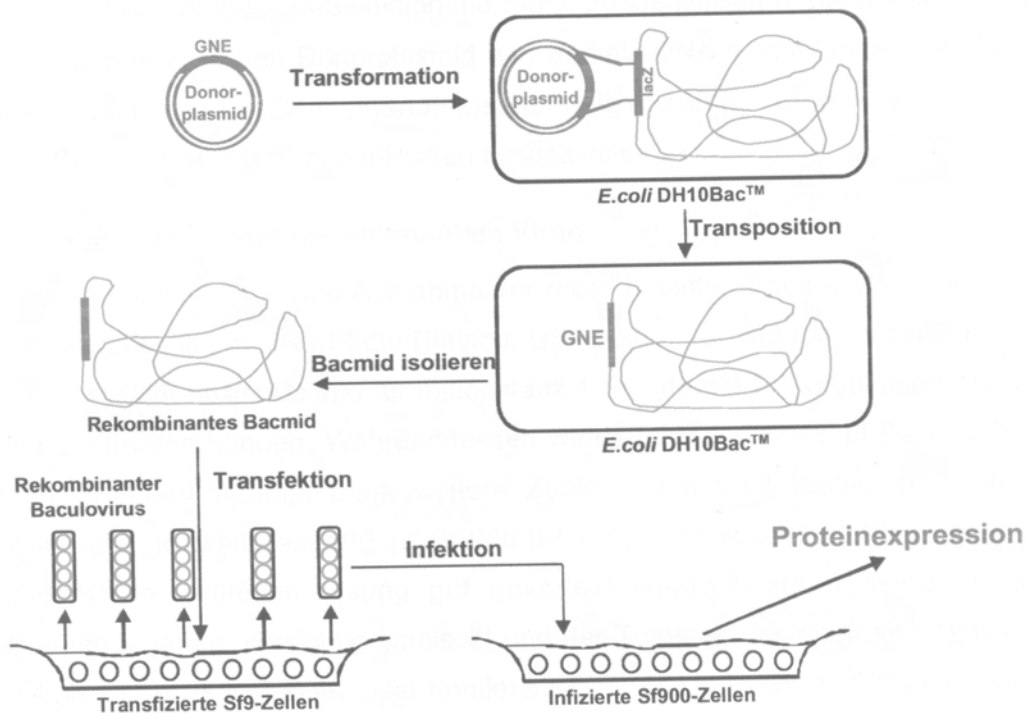


Abb. 36: Herstellung von rekombinantem Baculovirus und Genexpression mit dem BAC-TO-BAC®-Expressionssystem.

#### 4.2.1 Klonierung von *hFUK* in den pFastBac™HTb-Donor-Vektor

Um die *hFUK* in Insektenzellen zu exprimieren, wurde das Gen mit *Bam*HI und *Not*I aus dem pGEX-4T/*hFUK*-Vektor ausgeschnitten (Abb. 37). Der pFastBac™-HTb-Vektor wurde mit den gleichen Restriktionsendonukleasen linearisiert. Die geschnittenen Fragmente sind aus dem Agarosegel extrahiert worden. Danach wurden die Fragmente ligiert und *E. coli* TOP10-Zellen transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen auf Selektions-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht inkubiert. Aus positiven Klonen des pGEX-4T/*hFUK*-Konstruktes wurden Übernachtkulturen gefertigt und anschließend die Plasmid-DNA präpariert. Die Analyse der Plasmid-DNA des Konstruktes pFastBac™HTb/*mFUK* wurde mit Endonukleasen *Bam*HI und *Not*I durchgeführt. Es sind erwartungsgemäß ein Fragment des Gens in der Größe von 3000 bp und ein Fragment des Vektors von 5000 bp beobachtet worden (Daten nicht wiedergegeben). Danach wurden die erhaltenen Plasmid-DNAs durch Sequenzierung verifiziert. Es konnte trotz mehrfacher Versuche kein mutationsfreies Konstrukt pFastBac™HTb/*hFUK* erhalten werden, so dass diese Variante der Klonierung nicht weiter verfolgt wurde.

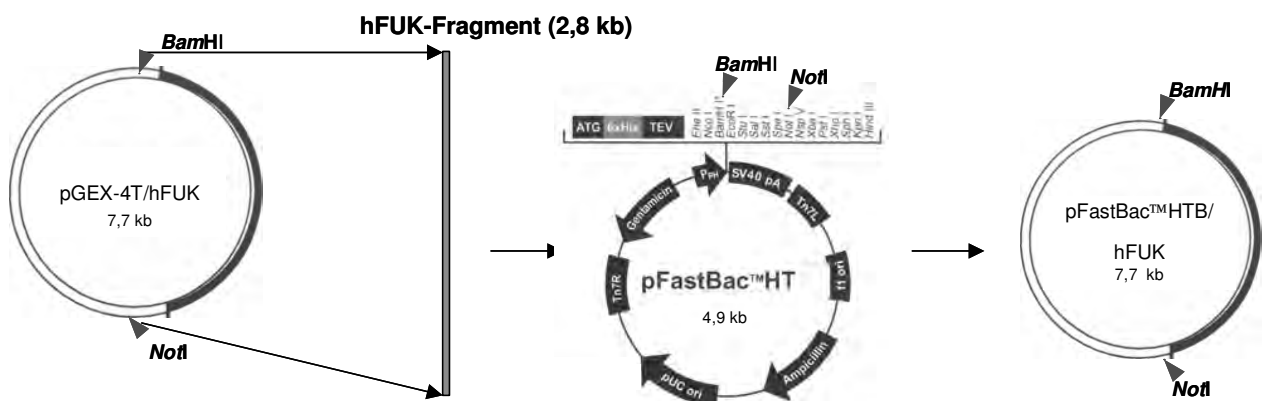
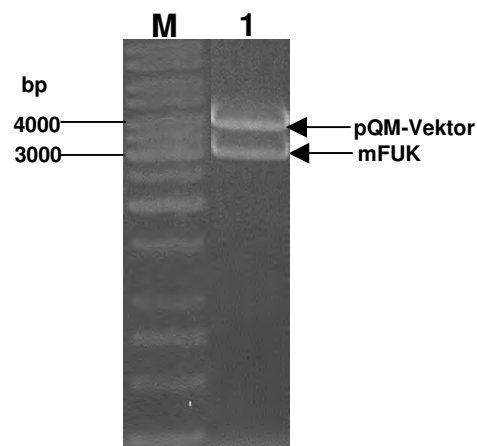


Abb. 37: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der *hFUK* in pFastBac™HTb.

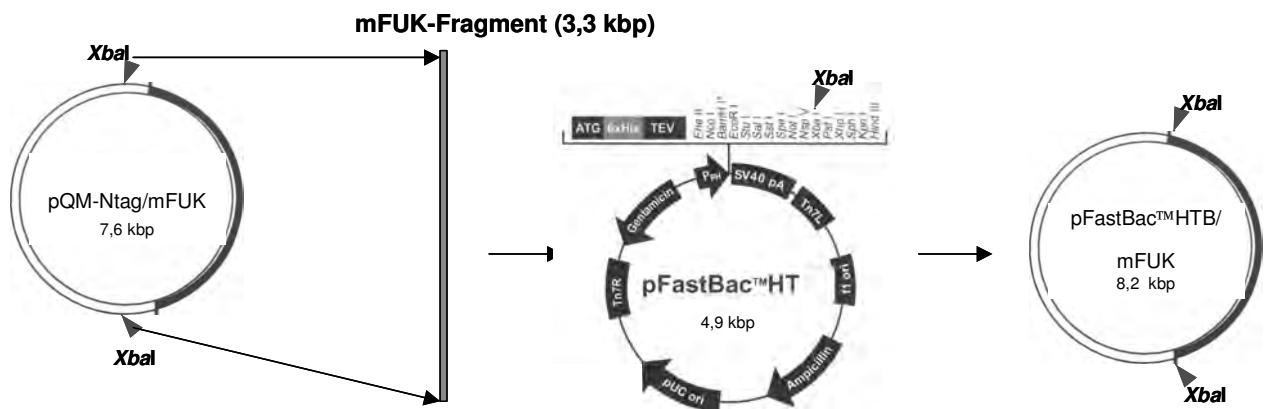
#### 4.2.2 Klonierung von *mFUK* in den pFastBac™HTb-Donor-Vektor

Zuerst wurde eine neuer Transfer von pQM/*mFUK* in *E. coli* TOP10-Zellen durchgeführt. Aus den positiven Klonen, die Ampicillin-Resistenz aufweisen, wurde die Plasmid-DNA präpariert und durch Restriktionsverdau mit *Xba*I überprüft. Mit der *Xba*I Restriktionsendonuclease wurde die *mFUK*-cDNA-Sequenz weiterhin in den pQM-Vektor einkloniert, so dass nach dem Restriktionsverdau des pQM/*mFUK*-Konstruktes zwei Fragmente zu erwarten sind: ein Fragment des linearisierten Vektors (ca. 4300 bp) und ein Fragment des *mFUK*-Gens (3276 bp). In Abb. 38 ist das Agarosegel nach der Analyse durch den Restriktionsverdau des pQM-NTag/A/*mFUK* dargestellt. Es sind zwei Fragmente, die nach der Spaltung mit *Xba*I entstanden, zu sehen. Ein Fragment hat die Größe von 3000 bp und das zweite 4000 bp. Da das *mFUK*-Fragment die erforderliche Größe hatte, wurde es für die weitere Klonierung eingesetzt.



**Abb. 38: Restriktionsanalyse des pQM-NTag/A/*mFUK* mit *Xba*I (Agarosegel).**

Spur M: DNA-Marker; Spur 1: pQM-NTag/A/*mFUK* nach dem Restriktionsverdau mit *Xba*I.



**Abb. 39: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für mFUK.**

Im nächsten Schritt wurde der pFastBac™HTB-Donor-Vektor und pQM-Ntag/A/mFUK mit *XbaI* verdaut, aus dem Agarosegel extrahiert und für die Ligation eingesetzt (Abb. 39). Die Ligation war trotz mehrerer Versuche erfolglos, so dass eine alternative PCR-Strategie entwickelt wurde. Dazu wurde das mFUK-Gen aus pQM-Ntag/A/mFUK mit den Primern mFK und mFKrc amplifiziert. In Primer mFK wurde gleichzeitig eine neue Schnittstelle für *EcoRI* eingefügt.

Der mit *EcoRI* linearisierte pFastBac™HTB-Donor-Vektor wurde nach der Extraktion aus dem Agrosegel zuerst dephosphoryliert, danach erneut auf das Agarosegel aufgetragen und aus dem Gel extrahiert. Dieser Vorgang ermöglichte eine zusätzliche Reinigung des linearisierten Vektors vor der Ligation. Nach der Ligation folgte der Transfer in kompetente TOP10-Zellen. Nach der Selektion der Klone mit Ampicillin wurde die Plasmid-DNA isoliert. Die Analyse wurde durch den Restriktionsverdau mit *XbaI* bzw. *KpnI* durchgeführt (Abb. 40). Nach dem Restriktionsverdau mit *XbaI* sind die erwarteten Banden von 3300 bp und von 4900 bp beobachtet worden (Daten nicht gezeigt). Der Verdau mit *KpnI* ergab ebenfalls die Banden mit den erwarteten Größen (5500 bp, 2700 bp; Abb. 41).

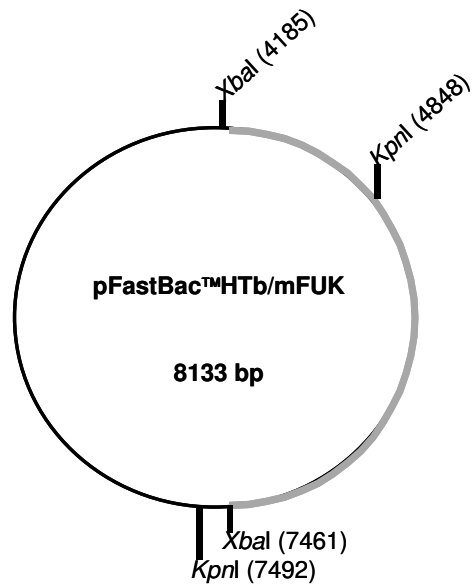


Abb. 40: pFastBac™HTb/mFUK mit Schnittstellen für *XbaI* und *KpnI*.

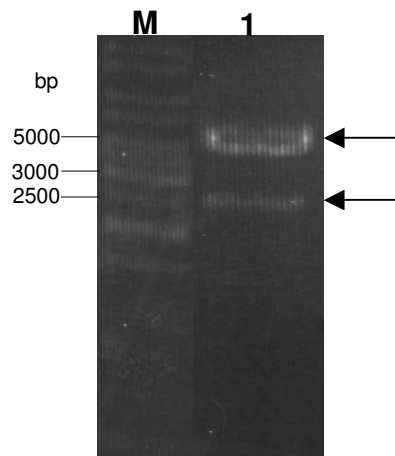
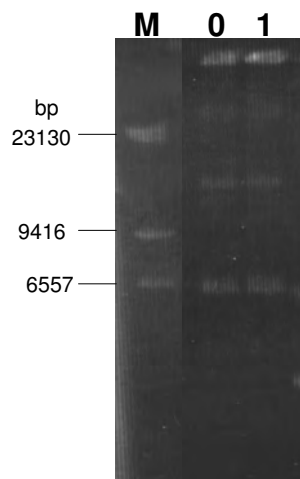


Abb. 41: Agarosegel nach der Analyse von pFastBac™HTb/mFUK durch den Restriktionsverdau mit *KpnI*.

Spur M: DNA-Marker; Spur 1: pFastBac™HTb/mFUK geschnitten mit *KpnI*. Die schwarzen Pfeile deuten auf die Banden, die nach der Restriktionsverdau entstanden sind.

Anschließend wurde die DNA des Konstruktes pFastBac™HTB/mFUK sequenziert. Für die Sequenzierung wurden folgende Primer verwendet: pFastBac-For IRD 800, Bacinfw IRD 700, Bac-infw2 IRD 800, Bac-inrv IRD 800, Bac-inrv2 800, Bac-inrv3 800 und Bac-rc IRD 700. Mit diesen Primern konnte der Vektor „upstream“ und „downstream“ jeweils komplett sequenziert werden. Das mutationsfreie Konstrukt wurde für die folgende Transformation in DH10Bac™-Zellen eingesetzt.

Mit den durchsequenzierten Plasmiden wurden DH10Bac™-Zellen transformiert. Diese Zellen enthalten Bacmid-DNA und ein Helfer-Plasmid, welches die für die homologe Rekombination notwendigen Proteine zur Verfügung stellt. Durch gerichtete Transposition zwischen den Tn7-Transposon-Elementen des Bacmids und des Donor-Plasmids entsteht rekombinante Bacmid-DNA, die das mFUK-Gen enthält. Dabei wurden die Gene durch homologe Rekombination in die Bacmid-DNA integriert. Nach der Selektion durch Antibiotika und blau-weiß-Screening, konnte von den positiven Klonen das Bacmid-DNA isoliert werden. Die rekombinante Bacmid-DNA/mFUK wurde schließlich nach der Isolation im Agarosegel analysiert (Abb. 42).



**Abb. 42: Agarosegelanalyse der Bacmid-DNA nach der Minipräparation.**

Spur M:  $\lambda$  DNA/*Hind*III-Fragmente, Spur 0: Bacmid-DNA; Spur 1: Bacmid-DNA/mFUK .

Im Agarosegel konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Bacmid-DNA und rekombinanten Bacmid-DNA festgestellt werden. Auf Grund der Größe der Bacmid-DNA (>135 kb) ist die Analyse des Inserts durch Größenunterschiede sehr schwierig, deshalb wurde eine weitere Analyse der Bacmid-DNA/mFUK durch PCR durchgeführt. Die PCR-Analyse wurde mit Hilfe der Primer FUKfw1, FUKfw2, Bacinv2 als *Sense*- und M13 Revers als *Antisense*-Primer durchgeführt. In einem Fall konnte die erwartete Bande beobachtet werden. Daher wurde mit diesem Klon weitergearbeitet.

### 4.2.3 Expression der mFUK in Insektenzellen

Für die Expression in Insektenzellen musste zu Beginn der Baculovirus gewonnen und vermehrt werden. Dazu wurden Sf9-Zellen mit der Bacmid-DNA transfiziert. Nach fünftägiger Inkubation konnte der Kulturüberstand, indem sich der Virus befand, geerntet werden. Um den Titer des Virus zu erhöhen, erfolgte eine zweimalige Amplifikation des Transfektionsüberstands. Schließlich wurden die optimalen Expressionsbedingungen (Viruskonzentration) ermittelt. Dazu wurden die Zellen mit unterschiedlichen Volumina an Erststock infiziert.

Die Pilotexpression wurde in Sf900-Zellen durchgeführt. Nach 3 Tagen Infektionszeit wurden die Zellen sedimentiert und aufgeschlossen. Durch Zentrifugieren wurde die unlösliche Fraktion von der löslichen Fraktion getrennt. Die lösliche Fraktion des Zelllysats wurde über eine Ni-NTA-Agarose-Säule gereinigt. Bei dieser Affinitätschromatographie bindet der spezifische Ligand der rekombinanten Proteine, der His-Tag, an die Ni-NTA-Agarose und die Proteine können so von unerwünschten Verunreinigungen getrennt werden. Nachdem die rekombinanten Proteine aus dem Überstand an der Säule gebunden waren, wurde die Säule noch einmal mit Waschpuffer versetzt und die Proteine anschließend eluiert. In den Fraktionen wurde die Proteinkonzentration bestimmt und die Fraktionen wurden im SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung analysiert. Durch Western-Blot sollten die einzelnen Proteine schließlich spezifisch mit Penta-His-Antikörpern nachgewiesen werden. Hierzu wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, mit Penta-His-Antikörper inkubiert und anschließend wurde der Blot über das Luminol-System entwickelt. Nach der Analyse des Sediments und des Überstands wurde nach der Coomassie-Färbung keine eindeutige Überexpression der mFUK erkannt (Daten nicht wiedergegeben). Im Western-Blot konnte ebenfalls keine Überexpression nachgewiesen werden, so dass dieser Expressionsansatz nicht erfolgreich war. Aus Zeitgründen konnten keine weiteren Expressionsversuche durchgeführt werden.



### 4.3 Herstellung von Peptid-Antikörpern

Die Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern ist eine wichtige Voraussetzung für die Identifizierung von Proteinen. Ein Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von Peptid-Antikörpern. Bei Nichtverfügbarkeit oder Instabilität des Proteins kann es sinnvoll sein, Antikörper gegen ein synthetisches Peptid zu erzeugen. Hierzu wird aus der bekannten Primärsequenz des Proteins ein Teilstück des Proteins von ca. 10-20 Aminosäuren ausgewählt. Dabei ist es sehr wichtig, dass die ausgesuchten Peptide eine ausreichende Reaktion des Immunsystems bewirken und die Antikörper später das Protein spezifisch erkennen können. Die Prognose darüber kann auf Grund der Aminosäurezusammensetzung des Peptids oder durch entsprechende Computerprogramme abgeschätzt werden. Eine weitere Anforderung für die Herstellung eines anti-Fucokinase-Antikörpers war die Kompatibilität mit Proteinen aus verschiedenen Spezies.

Antiseren gegen Peptide unterscheiden sich von Antiseren gegen Proteine. Die Spezifität der Peptid-Antikörper ist meist sehr gut und mit der von monoklonalen Antikörpern vergleichbar. Die Affinität ist leider häufig geringer als bei polyklonalen Antiseren gegen das vollständige Protein. Die Verwendung der Peptide als Standard oder „Tracer“ im quantitativen Test ist oft eingeschränkt, bedingt durch unterschiedliche Affinitäten von Peptidantiseren zu den Peptiden im Vergleich zu den nativen Proteinen.

Bei Gewinnung von Peptidantiseren müssen in der Regel längere Immunisierungszeiten eingeplant werden. Trotz der beschriebenen Nachteile sind Peptidantikörper ein sehr gutes und hochspezifisches biochemisches Werkzeug bei der Proteinreinigung und manchmal die einzige realistische Möglichkeit, einen Test für ein Protein herzustellen. Die Peptide werden in der Regel an Proteinträger kovalent gekoppelt, um deren Immunogenität zu erhöhen. Als Trägerprotein dient in der Regel KLH.

#### 4.3.1 Die Auswahl von homologen Fucokinase Peptid-Sequenzen als Antigen für die Herstellung von Peptidantikörpern

Die Aminosäuresequenzen des Fucokinase-Proteins des Menschen, von *Mus musculus* und *Rattus norvegicus* wurden verglichen und auf besonders konservierte Bereiche untersucht. Es folgte eine computergestützte Proteinepitop-Analyse zur Ermittlung der geeigneten Peptidsequenzen. Die potenziellen Peptid-Antikörper wurden aus unterschiedlichen Bereichen des N-Terminus, der Mitte und des C-Terminus des Proteins ausgewählt (Abb. 43). Die Kriterien für die endgültige Entscheidung waren die Homologie des Peptids mit den Peptiden aus mehreren Spezies und die Lokalisation des Peptids.

Fucokinase-human	15	C L P V E N P E A P V E A L V	(15 AS)
Fucokinase-Maus	109	C L P V E N P Q A P V E A L	(14 AS)
Fucokinase-Ratte	148	C L P V E N P Q A P V E A L	(14 AS)
Fucokinase-human	551	C M A E G R G G L R S G P A A N	(16 AS)
Fucokinase-Maus	587	C L R P L I R A A V G E G	(13 AS)
Fucokinase-Ratte	429	C H L R G P I H I G A G	(12 AS)
Fucokinase-Ratte	526	C L L S A R L F P V L H	(12 AS)
Fucokinase-human	925	C E P L T V R R M M D V L A P H V H	(18 AS)
Fucokinase-Maus	1099	C G A G P S E V G T T	(11 AS)
Fucokinase-Ratte	1122	C G A G P S E V G N T	(11 AS)

**Abb. 43: Aminosäuresequenzen unterschiedlicher ausgewählter Peptide des Fucokinase-Proteins nach der Proteinepitopanalyse mit homologen Regionen des Fucokinase-Proteins.**

Homologe Aminosäuren in jeder Spezies sind grün und die bei Maus und Ratte blau gekennzeichnet. Rot gekennzeichnete Aminosäuren sind nicht homolog.

Letztendlich wurden zwei Peptidsequenzen ausgewählt:

Fucokinase-Maus 15 CLPVENPQAPVEALV (15 AS)  
 Fucokinase-human 551 CMAEGRGGLRSGPAAN (16 AS)

Die Peptidsequenz CLPVENPQAPVEALV zeigt eine nahezu 100%-tige Homologie mit der Fucokinase des Menschen, der Maus und der Ratte. Diese Peptidsequenz wurde für die Herstellung der Peptid-Antikörper, die das Protein in dem Bereich der N-Terminus erkennen, eingesetzt. Die Peptidsequenz CMAEGRGGLRSGPAAN ist am besten geeignet für die Herstellung von Peptid-Antikörpern gegen die humane Fucokinase, Kreuzreaktionen mit den Proteinen aus Maus und Ratte sind jedoch gut möglich. Die Peptide wurden chemisch synthetisiert, über HPLC gereinigt und an KLH gebunden.

#### 4.3.2 Gewinnung und Charakterisierung der Peptid-Antikörper

Es wurden pro Peptid jeweils drei Kaninchen immunisiert. Nach der ersten Immunisierung folgten die „Boosterungen“ nach jeweils 2 Wochen. Das Blut der Kaninchen wurde nach dem in Tabelle 1 aufgeführten Schema gewonnen und die Antiseren wurden analysiert.

**Tabelle 2: Kennzeichnung der Antiseren.**

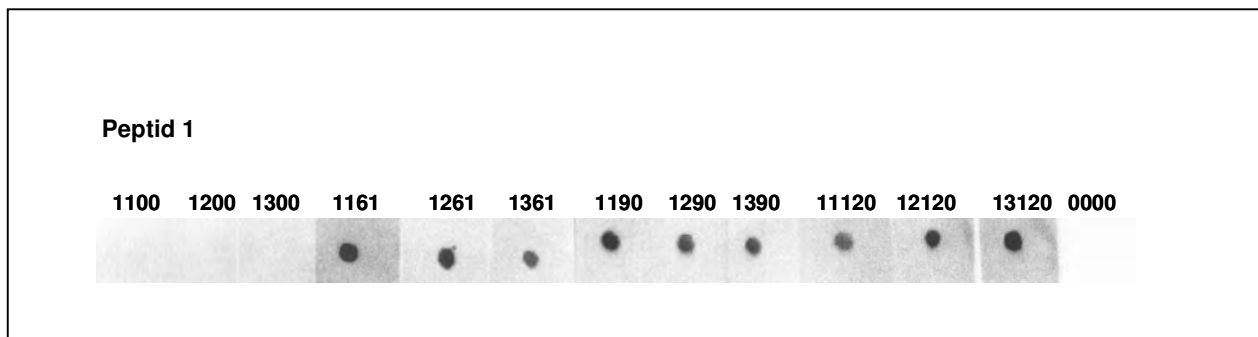
<b>Peptid-Antikörper</b>	<b>Tier Nr.</b>	<b>Tag 00</b>	<b>Tag 61</b>	<b>Tag 90</b>	<b>Tag 120</b>
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1100</b>	<b>1161</b>	<b>1190</b>	<b>11120</b>
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1200</b>	<b>1261</b>	<b>1290</b>	<b>12120</b>
<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1300</b>	<b>1361</b>	<b>1390</b>	<b>13120</b>
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2100</b>	<b>2161</b>	<b>2190</b>	<b>21120</b>
<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2200</b>	<b>2261</b>	<b>2290</b>	<b>22120</b>
<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2300</b>	<b>2361</b>	<b>2390</b>	<b>23120</b>

Zuerst wurde die Spezifität der Antiseren mit der Dot-Blot-Methode untersucht. Bei den Seren, die von immunisierten Tieren stammten, ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu erwarten. Mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpers kann der Komplex

durch Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Fucokinase-Peptid-Antikörper sollen auch im Western-Blot das Protein Fucokinase spezifisch erkennen können.

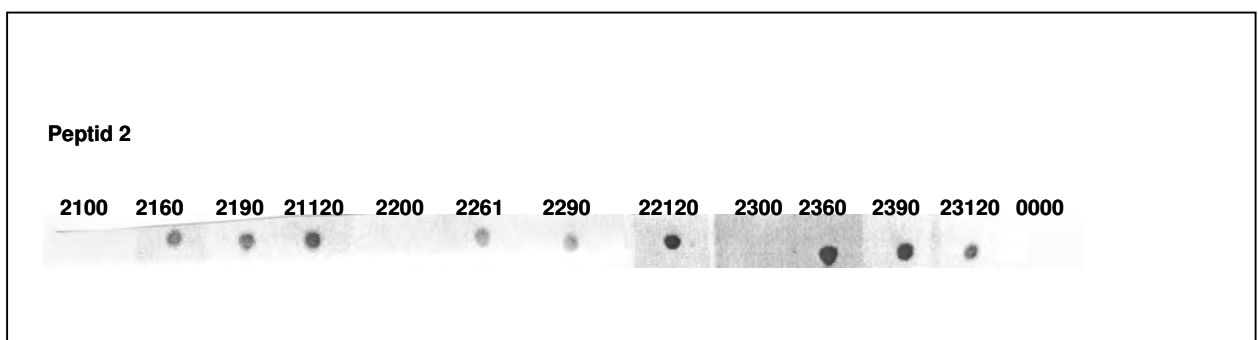
Derzeitige Kenntnisse über das Vorkommen von Fucokinase weisen daraufhin, dass das Enzym in einer größeren Menge in Gehirnen von Ratte und Maus vorkommt (Miller *et al.*, 2005). Deswegen wurde versucht, aus Gehirn von Ratte und Maus das Enzym im Proteingemisch (Gehirncytosol) sowie in einzelnen Fraktionen zu gewinnen. So gewonnenes Fucokinase-Protein sollte von Anti-Fucokinase-Peptid-Antikörpern, aus Seren der immunisierten Kaninchen ab dem 61. Tag, durch die Western-Blot-Methode erkannt werden.

In Abb. 44 und Abb. 45 sind die Ergebnisse nach der Dot-Blot-Methode der Anti-Peptid-Antiseren dargestellt.



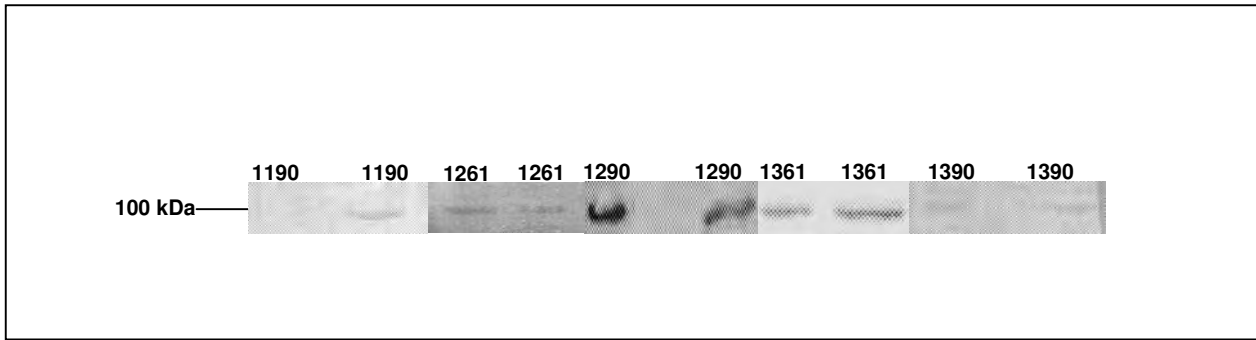
**Abb. 44: Dot-Blot-Analyse der Anti-Peptid 1-Seren.**

Die Kennzeichnung der Seren ist in Tabelle 2 dargestellt.



**Abb. 45: Dot-Blot-Analyse der Anti-Peptid 2-Seren**

Die Kennzeichnung der Seren ist in Tabelle 2 zusammengefasst.



**Abb. 46: Western-Blot-Analyse der Anti-Peptid 1-Seren.**

Die Western-Blot-Analyse wurde mit zwei Fucokinase-Protein-Fractionen, isoliert aus dem Ratten-Gehirn, durchgeführt. Die Kennzeichnung der Seren ist in Tabelle 2 dargestellt.

Nach der Inkubation der auf Nitrocellulose-Membran geblotteten Peptide konnten die Anti-Peptid 1- oder Anti-Peptid 2- Seren, die nach dem 61. Tag von Kaninchen gewonnen wurden, die Peptide im Dot-Blot-Verfahren erkennen. Die Antiseren die am Tag 90 und 120 gewonnen wurden, konnten die Peptide ebenfalls binden (Abb. 44) und (Abb. 45).

Für eine genauere Analyse wurden zwei Fucokinase-haltige Fraktionen aus dem Gehirn von Ratten in einem Western-Blot untersucht. Mit nahezu allen untersuchten Anti-Peptid 1-Seren aller drei immunisierten Tiere konnte die charakteristische Bande um 100 kDa identifiziert werden (Abb. 46). Im Western-Blot mit den Seren der Tiere, die mit Peptid 2 immunisiert wurden, konnte kein signifikantes Ergebnis erzielt werden (Daten nicht wiedergegeben). Zumindest die Seren gegen Peptid 1 scheinen somit spezifische Fucokinase-Antikörper zu enthalten, die durch eine Reinigung gegen das Peptid oder rekombinantes Protein angereichert werden könnten.

Eine weitere Möglichkeit für den Einsatz und auch für die Analyse der antigenen Wirkung der Peptidantikörper ist die Immunpräzipitation. Durch die Bindung von Peptid-Antikörpern an Protein A-Sepharose sollte eine affinitätschromatographische Reinigung des Fucokinase-Proteins aus dem Gehirnhomogenat erreicht werden. Das Fucokinase-Protein sollte spezifisch an den Fucokinase-Peptid-Antikörper binden, so dass eine Reduktion oder Eliminierung der Fucokinase-Enzymaktivität in den eingesetzten Proben zu erwarten ist. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht weitergegeben).

## 4.4 Expression der GDP-L-Fucose-Pyrophosphorylase in Insektenzellen

Es wurde versucht, ein weiteres Enzym des L-Fucose Stoffwechsels, die GDP-L-Fucose-Pyrophosphorylase (PP), zu exprimieren. Die cDNA-Sequenz der murinen GDP-L-Fucose-Pyrophosphorylase (mPP) von 1773 bp ist bekannt (Abb. 47) und konnte erfolgreich, aber nur in geringen Mengen in COS-Zellen exprimiert werden (Niittymaki *et al.*, 2004). Die Expression in Insektenzellen verspricht eine große Ausbeute an exprimiertem Protein und wurde aus diesem Grund ausgewählt.



**Abb. 47: Schematische Darstellung der GDP-L-Fucose-Pyrophosphorylase mit dem kompletten kodierenden Bereich.**

### 4.4.1 Klonierung der mPP in den pFastBac<sup>TM</sup>HTB-Donor-Vektor

Das mPP-Gen befand sich in dem pcDNA3.1-Vektor. Zuerst wurde ein neuer Transfer der pcDNA3.1/mPP in TOP10-Zellen durchgeführt. Aus den positiven Klonen, die Ampicillin-Resistenz aufwiesen, wurde die DNA präpariert und durch den Restriktionsverdau mit *KpnI* und *BamHI* analysiert.

Nach dem Restriktionsverdau des pcDNA3.1/mPP-Konstruktes mit *KpnI* und *BamHI* (Abb. 49) sind zwei Fragmente zu erwarten: ein Fragment des linearisierten Vektors von 5400 bp und ein Fragment des mPP-Gens von ca. 1800 bp. Dies wurde auch beobachtet (Abb. 48). Der pFastBac<sup>TM</sup>HTB-Vektor wurde anschließend mit *KpnI/BamHI* linearisiert und mit dem mPP-Gen ligiert. Nach der Einschleusung in TOP10-Zellen und Selektion mit Ampicillin ist die Plasmid-DNA aus dem Konstrukt pFastBac<sup>TM</sup>HTB/mPP präpariert worden (Schema s. Abb. 49).

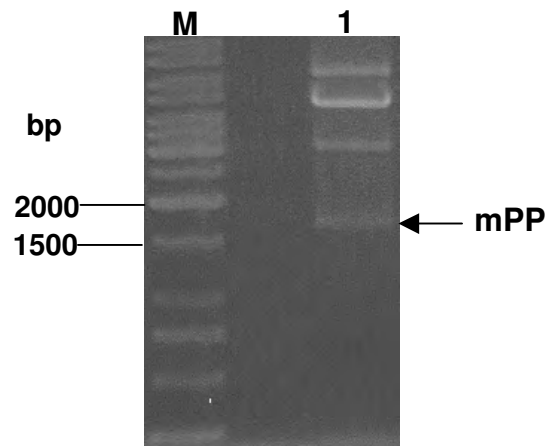


Abb. 48: Agarosegel nach dem Restriktionsverdau des pcDNA3.1/mPP-Plasmids mit *KpnI*/*Bam*HI.

Spur M: DNA-Marker; Spur 1: pcDNA3.1/mPP verdaut mit *KpnI*/*Bam*HI

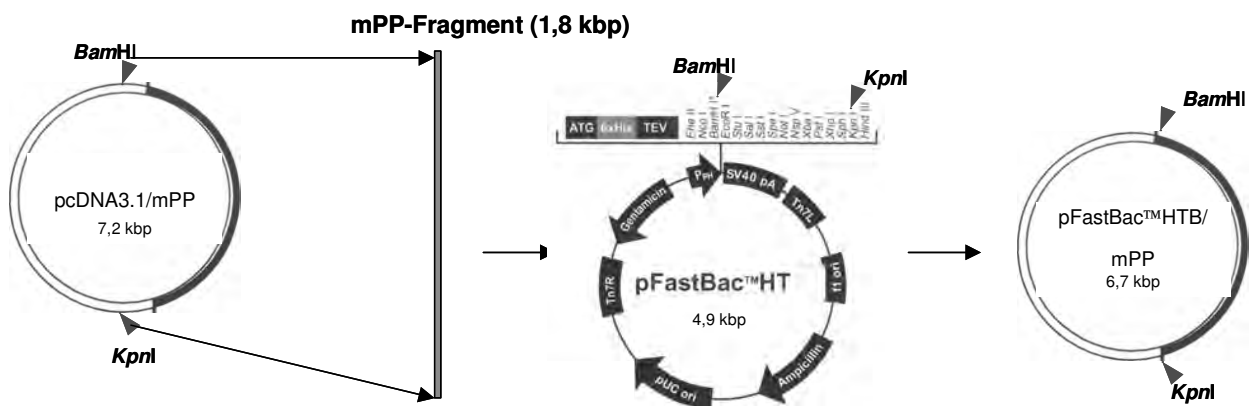
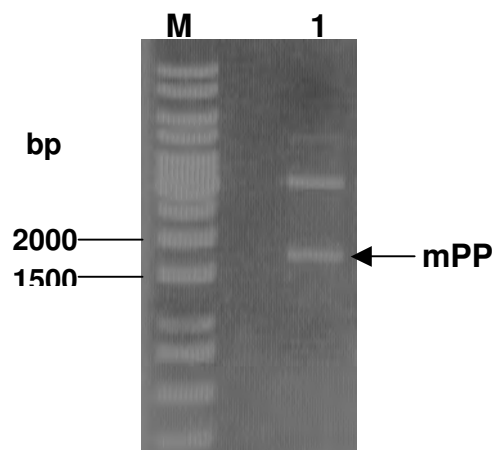


Abb. 49: Schematische Darstellung des Klonierungsvorgangs des pFastBac™HTB/mPP-Konstruktes.

Die Analyse des pFastBac™HTB/mPP-Plasmides wurde durch den Restriktionsverdau mit *KpnI* und *BamHI* durchgeführt. Der Restriktionsverdau erfolgte in 2 Schritten. Zuerst wurde das pFastBac™HTB/mPP-Plasmid mit *BamHI* linearisiert, aus dem Agarosegel extrahiert und anschließend mit *KpnI* geschnitten (Abb. 50). Nach der erfolgreichen Analyse des pFastBac™HTB/mPP-Konstruktes, wobei eine Bande von mPP-Sequenz im Agarosegel in der Größe von 1800 bp zu sehen war, wurde die DNA-Sequenz überprüft. Das Plasmid wies dabei keinerlei Mutationen auf.

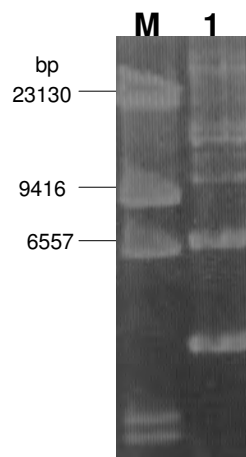


**Abb. 50: Kontroll-Agarosegel des pFastBac™HTB/mPP-Plasmids nach Restriktionsverdau mit *BamHI* und *KpnI*.**

Spur M: DNA-Marker; Spur 1: pFastBac™HTB/mPP nach Restriktionsverdau in 2 Schritten mit *BamHI* und *KpnI*.

Das mutationsfreie Konstrukt pFastBac™HTB/mPP wurde für die Transposition in DH10Bac™-Zellen eingesetzt. Die rekombinante Bacmid-DNA wurde nach dem blau-weiß-Screening von den positiven Klonen präpariert und im Agarosegel kontrolliert (Abb. 51). Nach dem Agarosegel konnte bestätigt werden, dass sich nach der Präparation die Bacmid-DNA in der Probe befindet.



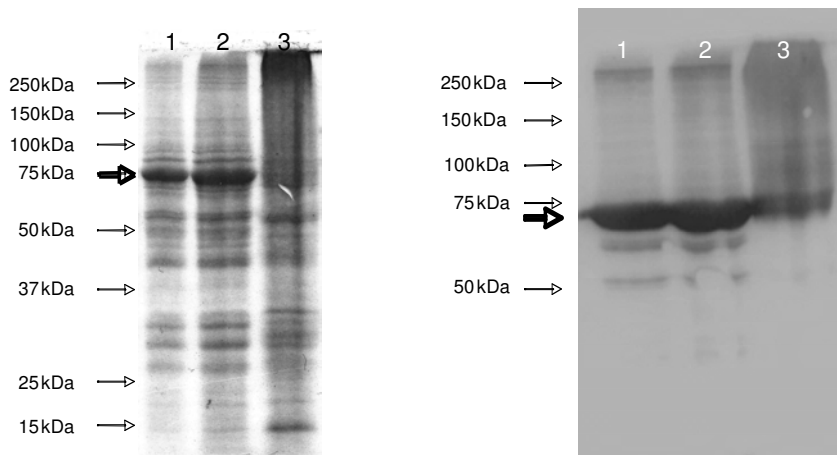


**Abb. 51: Bacmid-DNA/mPP in Agarosegel.**

Spur M:  $\lambda$ -DNA-Marker; Spur 1: Bacmid-DNA/mPP.

Für die Expression des rekombinanten mPP-Proteins in Insektenzellen musste der Baculovirus durch die Transfektion von Sf9-Zellen hergestellt werden. Dafür wurden die Insektenzellen mit unterschiedlichen Mengen an Bacmid-DNA transfiziert. Nach fünftägiger Inkubation konnte der Kulturüberstand, indem sich der Virus befand, geerntet werden. Um den Titer des Virus zu erhöhen, erfolgte eine zweimalige Amplifikation des Transfektionsüberstands. Schließlich wurden die optimalen Expressionsbedingungen (Viruskonzentrationen) nach einer Pilotexpression ermittelt.

Die Proteinexpression des mPP-Proteins wurde in Sf900-Zellen durchgeführt. Nach 3 Tagen Infektionszeit wurden die Zellen sedimentiert und aufgeschlossen. Durch Zentrifugation wurde die lösliche Fraktion (Überstand) von der unlöslichen Fraktion (Sediment) abgetrennt. Die lösliche Fraktion des Zelllysats wurde über eine Ni-NTA-Agarose-Säule chromatographisch gereinigt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung (Abb. 52 links) und im Western-Blot mit Penta-His-Antikörpern (Abb. 52 rechts) analysiert.



**Abb. 52: SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung (links) und Western-Blot (rechts) der Expression der mPP in Sf9-Zellen.**

Spur 1: Überstand Verdünnung 1:4 (25 µl); Spur 2: Überstand Verdünnung 1:2; Spur 3: Überstand unverdünnt.

Nach der Expression in Insektenzellen konnte die Überexpression im Überstand in SDS-PAGE und im Western-Blot nachgewiesen werden. Die Bande des überexprimierten rekombinanten mPP-Proteins hat die Molmasse von 75 kDa. Eine anschließende Ni-NTA-Affinitätschromatographie zur Reinigung der rekombinanten Proteins war jedoch wenig erfolgreich.