

## 2.5 Expression von Domänen des rGNE-Proteins in *E. coli*

Da die Kristallisation des rGNE-Gesamtproteins erfolglos verlief (2.4.5), wurde alternativ die Expression, Reinigung und Kristallisation der einzelnen Domänen angestrebt. Als Expressionssystem wurde aufgrund der schnelleren und leichteren Handhabung *E. coli* gewählt. Bisher war es zwar gelungen, die UDP-GlcNAc-2-Epimerase- bzw. ManNAc-Kinase-Domäne in Insektenzellen separat zu exprimieren, jedoch konnten nur geringe Mengen an rekombinantem, löslichem Protein nachgewiesen werden (Blume *et al.*, 2004). Um eine höhere Ausbeute an löslichem Protein zu erhalten, wurden daher die Domänen mit den Löslichkeitsfördernden GST- bzw. MBP-Fusionsanteilen in dem prokaryontischen Expressionssystem *E. coli* exprimiert.

### 2.5.1 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne mit GST-Tag

Zunächst wurde die kodierende Sequenz der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne (Aminosäuren 1-403) der Ratte aus dem pBTM-K2-Vektor (Blume *et al.*, 2004) über die Endonukleasen *NotI* und *SaII* restringiert und mit pGEX-4T-2-Vektor ligiert, der zuvor mit den gleichen Enzymen linearisiert wurde. Anschließend wurde das Plasmid in BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3) pLysS *E. coli*-Zellen transformiert. Die Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien erfolgte durch die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol im Medium. Die BL21-*E. coli*-Zellen wurden mit dem pGEX-4T-2-UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Vektor zunächst bei 16 °C, 24 °C und bei 37 °C kultiviert und bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 mit 0,3 mM IPTG induziert. 0, 2, 4 und 20 h nach der IPTG-Induktion wurden Aliquots aus den Kulturen abgenommen. Nach Aufbrechen der Bakterien und Trennung der löslichen von unlöslichen Zellbestandteilen mittels Zentrifugation des Lysats wurden cytosolischer Überstand und resuspendiertes Pellet enzymatisch und gelelektrophoretisch analysiert. In allen Fällen wurde das rekombinante Protein lediglich im Pellet detektiert, welches eine geringe Epimeraseaktivität aufwies (Daten nicht gezeigt).

### 2.5.2 Expression der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne mit MBP-Tag

Das Maltose-bindende Protein (MBP) als Fusionsteil erhöht häufig die Löslichkeit von Proteinen, die in *E. coli* exprimiert werden. Daher wurde die kodierende Sequenz der UDP-GlcNAc-2-Epimerase der Ratte (Aminosäuren 1-403) aus dem pFASTBAC1-rGNE-Vektor (Effertz *et al.*, 1999) mittels der Endonukleasen *PstI* und *EcoRI* geschnitten und mit dem

linearisierten pMal-C2-Vektor ligiert. Analog zu 2.5.1 wurden erfolgreich transformierte BL21-Zellen mit dem pMal-C2-UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Vektor zunächst bei 16 °C, 24 °C und bei 37 °C kultiviert und bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 mit 0,3 mM IPTG induziert. 0, 2, 4 und 20 h nach der IPTG-Induktion wurden Aliquots aus den Kulturen abgenommen, Cytosol und Pellet präpariert und gelelektrophoretisch analysiert. Auch hier zeigte sich, dass das rekombinante Protein mit geringer Epimeraseaktivität nur im Pellet, jedoch nicht im cytosolischen Überstand nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

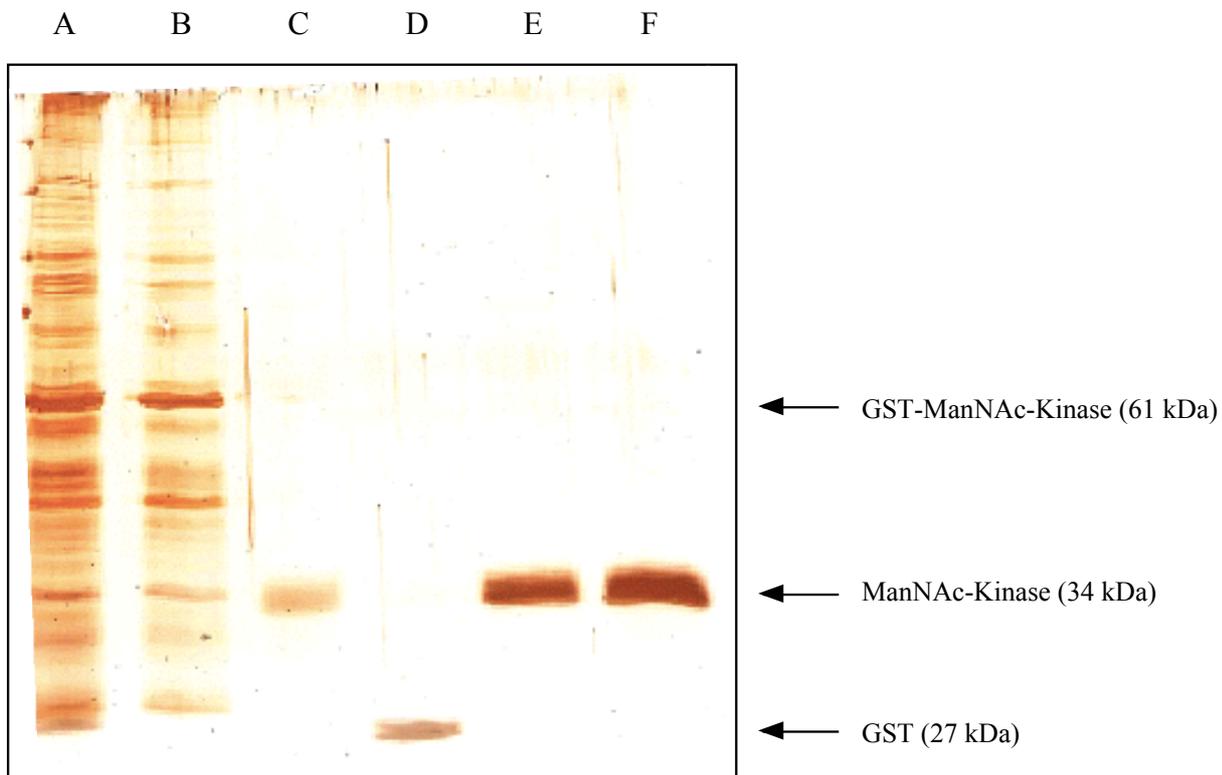
### 2.5.3 Expression der ManNAc-Kinase-Domäne mit GST-Tag

Neben der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Domäne wurde auch die ManNAc-Kinase-Domäne N-terminal mit einem GST-Fusionsteil in *E.coli* exprimiert. Dazu wurde der ManNAc-Kinase-Bereich des rGNE-Gens (Aminosäuren 407-722) aus dem Vektor pBTM-K3 (Blume *et al.*, 2004) mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NotI* und *SalI* geschnitten und mit dem linearisierten pGEX-4T-2-Vektor ligiert. Mit dem pGEX-4T-2-ManNAc-Kinase-Vektor erfolgreich transformierte BL21-Zellen wurden bei 16 °C, 24 °C und bei 37 °C kultiviert und bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,5 mit 0,3 mM IPTG induziert. 0, 2, 4 und 20 h nach der IPTG-Induktion wurden Aliquots aus den Kulturen abgenommen und analysiert. Dabei zeigte sich, dass bei einer Kultivierungstemperatur von 16 °C und 20 h bzw. von 37 °C und 4 h nach der Induktion maximale Mengen an löslichem rekombinantem Protein nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt). Unter diesen Bedingungen wurde im weiteren Verlauf die Expression durchgeführt.

### 2.5.4 Reinigung und Charakterisierung der GST-ManNAc-Kinase-Domäne

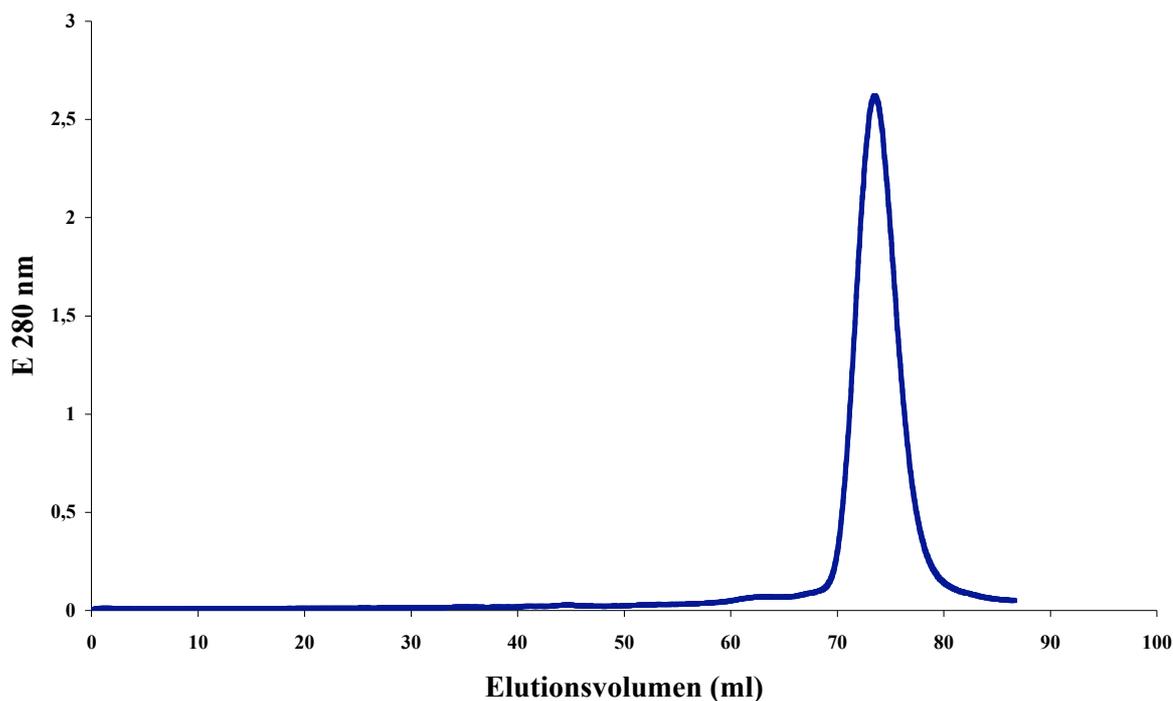
Zur Reinigung von GST-ManNAc-Kinase, welche rekombinant in BL21-Zellen exprimiert wurde, wurden die rekombinant exprimierenden Zellen einer 4 l Bakterienkultur geerntet, in Lysepuffer resuspendiert und anschließend lysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand auf eine mit PBS äquilibrierte Glutathion-Sepharose-Säule aufgetragen und 1 h schwenkend bei 4°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Säule mit PBS gewaschen. Das am Säulenmaterial gebundene Fusionsprotein wurde mit der Endopeptidase Thrombin in PBS über Nacht bei RT geschnitten. Die vom GST-Fusionsteil abgetrennte und somit nicht mehr gebundene ManNAc-Kinase-Domäne wurde anschließend mit PBS eluiert. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden zur weiteren Reinigung vereinigt, an die MonoQ-Säule

gebunden und mittels gradueller Steigerung der NaCl-Konzentration eluiert, wodurch die zuvor miteluierte Thrombin-Protease und andere Kontaminationen abgetrennt werden konnten. Die MonoQ-Fractionen, welche ManNAc-Kinase enthielten, wurden, nachdem sie vereinigt und mit Centriplus<sup>®</sup>-Gefäßen (Millipore) eingeeengt wurden, über die HighLoad16/60-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Schließlich wurde die gereinigte ManNAc-Kinase mittels einer PD-10 Säule (Amersham Bioscience) in 10 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, pH 7,5 umgepuffert und erneut in Centriplus<sup>®</sup>-Gefäßen konzentriert. Bei jeder Reinigung wurden nach einzelnen Reinigungsschritten Aliquots entnommen und gelelektrophoretisch analysiert (Abbildung 2.23).



**Abbildung 2.23: Reinigung der ManNAc-Kinase der Ratte.** Auf ein 10%-iges SDS-Gel wurde von jedem Reinigungsschritt Aliquots aufgetragen (A: Pellet 0,01 µl, B: Durchlauf 0,01 µl, C: ManNAc-Kinase nach Thrombin-Verdau 0,1 µl, D: Abgetrennter GST-Fusionsteil 0,1 µl, E: ManNAc-Kinase nach MonoQ-Säule 0,01 µl, F: ManNAc-Kinase nach HiLoad16/60-Gelfiltrationssäule 0,01 µl).

Die ManNAc-Kinase konnte bis zur Homogenität gereinigt werden. Dabei blieb sie hoch aktiv und löslich und zeigte auch bei mehrtägiger Lagerung bei 4°C keine Aggregation. Die spezifische Aktivität der gereinigten ManNAc-Kinase lag bei zu 13 U/mg. Zur Bestimmung des oligomeren Zustands wurde der Elutionsverlauf des Proteins über die HiLoad16/60-Gelfiltrationssäule analysiert. Das Elutionsprofil einer solchen Gelfiltration ist in Abbildung 2.24 dargestellt.



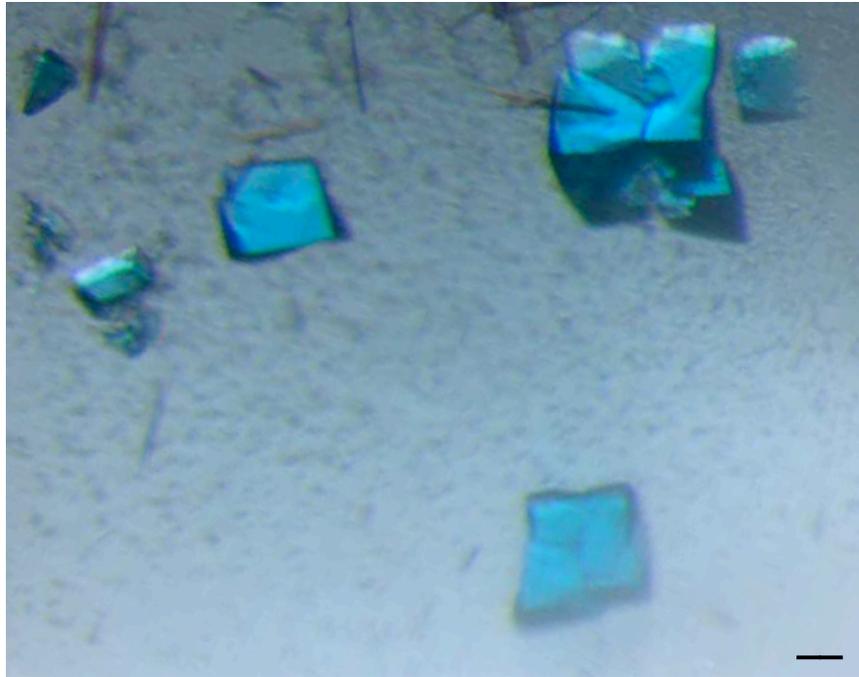
**Abbildung 2.24: Elutionsprofil der gereinigten ManNAc-Kinase.** Die Proteinlösung wurde über eine HiLoad16/60-Gelfiltrationssäule gegeben. Durch Absorptionmessung bei 280 nm wurde der Elutionsverlauf dokumentiert.

Das Protein wies wie bei der SDS-PAGE auch im Elutionsprofil der Gelfiltration eine hohe Reinheit auf. Das Absorptionsmaximum wurde bei einem Elutionsvolumen von 73,5 ml erreicht, was mittels eines Gelfiltrationsstandards einem Molekulargewicht von 72 kDa zugeordnet werden kann. Der Quotient aus dem berechneten Molekulargewicht eines ManNAc-Kinase-Monomers (34,2 kDa) und des ermittelten Molekulargewichts gibt den oligomeren Zustand des Proteins wieder, der in diesem Beispiel bei 2,1 lag. Demnach handelte es sich um eine monomodale Lösung, in der die ManNAc-Kinase als Dimer vorlag.

### 2.5.5 Kristallisation der ManNAc-Kinase-Domäne

Gereinigte ManNAc-Kinase (in 10 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, pH 7,5) diente als Proteinlösung für die Kristallisations-Screenings. Mit Hilfe von Centricon-Gefäßen wurde die Proteinkonzentration der Lösung auf bis zu 6,5 mg/ml erhöht. Das Screening wurde im Sitting-Drop-Verfahren mit dem Classic- bzw. Classic-Lite-Kit (Nextal), welches aus jeweils 98 Kristallisations-Puffern besteht, bei 4°C bzw. RT durchgeführt. Im Puffer 57 des Classic-Lite-Kits (beinhaltet 0,15 M NaCl; 0,05 M Na-Citrat pH 5,6; 10% PEG3350) konnten nach einer Woche bei 4°C erste Proteinkristalle detektiert werden, die eine Kantenlänge von etwa

0,02 mm besaßen. In Abbildung 2.25 sind die ersten erfolgreich gezüchteten ManNAc-Kinase-Kristalle dargestellt. Zur Unterscheidung von Salzkristallen wurde die Kristalle mit dem blauen Farbstoff Izit Crystal Dye<sup>®</sup> (Nextal) angefärbt.



**Abbildung 2.25: Mikroskopische Aufnahme von ManNAc-Kinase-Kristallen.** Der Kristallisationspuffer enthielt 0,15 M NaCl; 0,05 M Na-Citrat, pH 5,6; 10% PEG3350 bei 4°C, die eingesetzte Proteinlösung (10 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, pH 7,5) hatte eine Konzentration von 6,5 mg/ml. Die Kristalle wurden mit dem Sitting-Drop-Verfahren gezüchtet. Die kubischen Kristalle wurden mit Izit Crystal Dye angefärbt. Der Balken entspricht 10 µm.

Im Anschluss wurden die Kristalle in ersten Röntgenstrukturanalyse-Experimenten untersucht. Zwar konnte von den ManNAc-Kinase-Kristallen bisher kein auswertbares Röntgenbeugungsmuster generiert werden, jedoch ist durch weitere Optimierung der Kristallisationsbedingungen das Züchten eines auswertbaren ManNAc-Kinase-Kristalls wahrscheinlich.