

**RHEINISCH-WESTFÄLISCHE TECHNISCHE
HOCHSCHULE AACHEN**

INSTITUT FÜR BIOLOGIE I (MOLEKULARGENETIK UND BOTANIK)

**EXPRESSION REKOMBINANTER, VON
HIV-1 GP41 ABGELEITETER PROTEINE FÜR
DIE ANALYSE DER IMMUNPATHOGENESE**

DIPLOMARBEIT

vorgelegt von

Stephan Binder

Matrikelnr. 254472

Aachen, Juni 2009

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Aachen, den 10. Juni 2009

.....

Die vorliegende Arbeit wurde am Robert Koch-Institut (Berlin) in der Arbeitsgruppe P13 (Retrovirus induzierte Immunsuppression) unter Leitung von Dr. Joachim Denner und direkter Betreuung von Dr. Magdalena Eschricht angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. Reinhard Kurth
Robert Koch-Institut, Berlin

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Fritz Kreuzaler
RWTH, Aachen

FÜR MEINE MUTTER

I EINLEITUNG

I.1 AIDS UND HIV

I.1.1	AIDS.....	1
I.1.2	Das humane Immundefizienzvirus 1 (HIV-1).....	2
I.1.3	Genomstruktur und retrovirale Proteine	3
I.1.3.1	Das <i>gag</i> -Gen und dessen Genprodukte	4
I.1.3.2	Das <i>pol</i> -Gen und dessen Genprodukte	4
I.1.3.3	Akzessorische und regulatorische Proteine.....	4
I.1.3.4	Das <i>env</i> -Gen und die Glykoproteine gp120 und gp41.....	5
I.1.3.5	Die Isu-Domäne von gp41.....	6
I.1.4	Membranfusion und Viruseintritt.....	8
I.1.5	Replikationszyklus und Pathogenese	9

I.2 HETEROLOGE EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE

I.2.1	Rekombinante Proteine.....	11
I.2.2	Auswahl des Wirtsorganismus.....	11
I.2.3	Art der Expression.....	13
I.2.3.1	Plasmid-basierte Expression	13
I.2.3.2	Stabile Integration in das Wirts-Genom	14
I.2.4	Proteinlokalisierung	14
I.2.5	Codon usage.....	15

I.3	ZIELSETZUNGEN	16
-----	---------------------	----

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 INSTRUMENTE UND CHEMIKALIEN

II.1.1	Geräte	17
II.1.2	Chemikalien und Enzyme	17
II.1.3	Verbrauchsmaterialien und Kits	18
II.1.4	Antikörper.....	18
II.1.5	Antibiotika.....	18

II.2 NÄHRMEDIEN UND PUFFER

II.2.1	Nährmedien für <i>Hansenula polymorpha</i>	19
II.2.2	Nährmedien für <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus megaterium</i>	19
II.2.3	Medien zur Protoplastenherstellung und -transformation	20

II.2.4	Puffer	21
II.2.4.1	Agarose Gelelektrophorese	21
II.2.4.2	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese	21
II.2.4.3	Herstellung RbCl kompetenter Bakterien	22
II.2.4.4	Western Blot	22
II.2.4.5	Native Ni-NTA Affinitätschromatographie.....	22
II.2.4.6	Denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie	23
II.2.4.7	<i>Strep</i> -Tactin Affinitätschromatographie	23
II.2.4.8	Aufschluss von <i>Hansenula polymorpha</i>	23
II.3 MIKROORGANISMEN, PLASMIDE UND PRIMER		
II.3.1	Bakterien- und Hefestämme	23
II.3.1.1	<i>Bacillus megaterium</i>	24
II.3.1.2	<i>Hansenula polymorpha</i>	24
II.3.2	Plasmide	25
II.3.2.1	pSTREP-HIS1525	25
II.3.2.2	pC-HIS1622	26
II.3.2.3	pSSTA-ITLN2	26
II.3.2.4	pUC19	27
II.3.2.5	pFPMT121	27
II.3.3	Klonierungs- und Sequenzierprimer	28
II.4 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN (UMGANG MIT BAKTERIEN)		
II.4.1	Sterilisation und steriles Arbeiten	29
II.4.2	Kultivierung auf Agarplatten	29
II.4.3	Flüssigkulturen von <i>Escherichia coli</i>	29
II.4.4	Flüssigkulturen von <i>Bacillus megaterium</i>	29
II.4.5	Bestimmung der Zelldichte	29
II.4.6	Lagerung von Bakterien	30
II.5 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN (UMGANG MIT HEFEN)		
II.5.1	Kultivierung auf Agarplatten	30
II.5.2	Flüssigkulturen von <i>Hansenula polymorpha</i>	30
II.5.3	Bestimmung der Zelldichte	30
II.5.4	Lagerung von Hefen	30
II.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN		
II.6.1	Präparation genomischer DNA aus <i>Hansenula polymorpha</i>	31
II.6.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
II.6.3	Agarose Gelelektrophorese	32

II.6.4	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	32
II.6.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
II.6.6	Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen.....	33
II.6.7	Ligation von DNA.....	33
II.6.8	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	33
II.6.9	Transformation von <i>E. coli</i> mittels RbCl-Methode	34
II.6.10	Colony PCR.....	35
II.6.11	Mini Präparation von Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i>	35
II.6.12	Mini Präparation von Plasmiden aus <i>Bacillus megaterium</i>	35
II.6.13	Maxi Präparation von Plasmiden aus <i>Escherichia coli</i>	35
II.6.14	Sequenzierung von DNA	36
II.6.15	<i>Bacillus megaterium</i> Protoplastenherstellung	36
II.6.16	Protoplastentransformation	37

II.7 PRODUKTION REKOMBINANTER PROTEINE

II.7.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>Bacillus megaterium</i>	37
II.7.1.1	Analyse der intrazellulären Proteinfraction.....	37
II.7.1.2	Analyse der extrazellulären Proteinfraction	38
II.7.2	Aufreinigung von intrazellulären Proteinen aus <i>B. megaterium</i>	38
II.7.2.1	Native Ni-NTA Affinitätschromatographie.....	38
II.7.2.2	Denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie.....	39
II.7.2.3	<i>Strep</i> -Tactin Affinitätschromatographie	39
II.7.3	Aufreinigung der extrazellulären Fusionsproteine	39
II.7.3.1	Ammoniumsulfatfällung: Konzentrierung von sekretierten Proteinen	39
II.7.3.2	Dialyse.....	41
II.7.4	Expression von HERV-K TM in <i>Hansenula polymorpha</i>	41
II.7.5	Denaturierende Aufreinigung von HERV-K TM aus <i>Hansenula polymorpha</i>	41
II.7.6	Diskontinuierliche SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE).....	42
II.7.7	Western Blot / ECL-Detektion	43
II.7.8	BCA Test: Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	43
II.7.9	Eiskalte Aceton-Methanol Fällung.....	43
II.7.10	IL-10 spezifischer ELISA.....	44

III ERGEBNISSE

III.1 HETEROLOGE EXPRESSION IN BACILLUS MEGATERIUM

III.1.1	Konstruktion und Amplifikation der gp41 Verkürzungsmutanten	46
III.1.2	Codon-Optimierung der Sequenz von Δ NHR 4K.....	47
III.1.3	Klonierung der gp41 Verkürzungsmutanten in pSTREP-HIS1525 und pC-HIS1622.....	49

III.1.4	Optimierte Herstellung transformationskompetenter Protoplasten.....	50
III.1.5	Transformation von <i>B. megaterium</i> MS941 mit den Isu-Konstrukten	51
III.1.6	Screenen der Klone auf Produktion der gp41 Verkürzungsmutanten.....	51
III.1.7	Ermittlung der Kultivierungsbedingungen zur Produktion von <i>StrepII-ΔNHR</i> 4-His.....	52
III.1.8	Intrazelluläre Produktion von <i>StrepII-ΔNHR</i> 4K-His	55
III.1.8.1	Pufferoptimierung für die native Ni-NTA Affinitätschromatographie.....	55
III.1.8.2	Native 2-Schritt-Aufreinigung: Ni-NTA und <i>Strep</i> -Tactin Affinitätschromatographie	56
III.1.8.3	Denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie.....	58
III.1.9	Extrazelluläre Produktion von <i>StrepII-ΔNHR</i> 4K-His.....	59
III.1.9.1	Aufreinigung unkonzentrierter Proteine aus dem Kulturmedium	59
III.1.9.2	Aufreinigung konzentrierter Proteine aus dem Kulturmedium	59
III.2	PRODUKTION VON HERV-K TM IN HANSENULA POLYMORPHA	
III.2.1	Nachweis der genomischen Integration von HERV-K TM.....	61
III.2.2	Optimierung der HERV-K TM Produktion in <i>Hansenula polymorpha</i> RB11.....	62
III.2.3	Optimierter Hefeaufschluss und Aufreinigung von HERV-K TM.....	64
III.2.4	Untersuchung der immunsuppressiven Eigenschaften von HERV-K TM.....	67
IV	DISKUSSION	
IV.1	HETEROLOGE EXPRESSION IN BACILLUS MEGATERIUM	
IV.1.1	Herstellung rekombinanter HIV-1 gp41 Verkürzungsmutanten	69
IV.1.2	Optimierte Protoplastenherstellung und Transformation von <i>B. megaterium</i>	71
IV.1.3	Einfluss der Codon-Optimierung auf das Expressionslevel von <i>StrepII-ΔNHR</i> 4K-His.....	72
IV.1.4	Optimierte Kultivierungsbedingungen für die Expression von <i>StrepII-ΔNHR</i> 4K-His.....	72
IV.1.5	Aufreinigung von rekombinant hergestelltem <i>StrepII-ΔNHR</i> 4K-His.....	74
IV.2	PRODUKTION VON HERV-K TM IN HANSENULA POLYMORPHA	
IV.2.1	Herstellung von rekombinantem HERV-K TM in <i>Hansenula polymorpha</i>	78
IV.2.2	Optimierte Bedingungen zur Produktion von HERV-K TM in <i>Hansenula polymorpha</i>	78
IV.2.3	Aufschluss von Hefen und Aufreinigung von rekombinantem HERV-K TM.....	81
IV.2.4	Auswirkungen von HERV-K TM auf die IL-10 Sekretion humaner PBMCs.....	83
V	ZUSAMMENFASSUNG	84
VI	LITERATURVERZEICHNIS	85

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1:	Globale Übersicht der HIV-Infektionen im Jahr 2007	1
Abb. 1.2:	Die Morphologie reifer HIV-1 Viruspartikel	2
Abb. 1.3:	Organisation des proviralen Genoms von HIV-1	3
Abb. 1.4:	Schematischer Aufbau des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1	6
Abb. 1.5:	Sequenzhomologien zwischen der immunsuppressiven Domäne verschiedener Retroviren und Interferonen.....	7
Abb. 1.6:	Schematische Darstellung der Konformationsänderung von gp41 während der Fusion	8
Abb. 2.1:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>B. megaterium</i> und <i>E. coli</i>	24
Abb. 2.2:	Elektronenmikroskopische Abbildung einer knospenden <i>H. polymorpha</i> Zelle	25
Abb. 2.3:	Die Shuttlevektoren pSTREPHIS1525 und pC-HIS1622	26
Abb. 2.4:	Darstellung von pFPMT121.....	27
Abb. 3.1:	Übersicht der allgemeinen Strategie zur Etablierung des <i>Bacillus megaterium</i> Expressionssystems.....	45
Abb. 3.2:	Schematische Darstellung der von gp41 abgeleiteten Konstrukte	46
Abb. 3.3:	1,2 % Agarose Gele der erfolgreich mittels PCR amplifizierten von HIV-1 gp41 abgeleiteten Fragmente	47
Abb. 3.4:	Codon Qualitätsverteilung	48
Abb. 3.5:	Codon Qualitäts Plot	48
Abb. 3.6:	GC-Gehalt von Δ NHR 4K	48
Abb. 3.7:	Transformationeffizienz bei Einsatz unterschiedlicher Lysozymkonzentrationen und Inkubationszeiten	50
Abb. 3.8-A:	Western Blot Analyse der intra- und extrazellulären Proteinfractionen	51
Abb. 3.8-B:	Coomassie Blue gefärbtes SDS Polyacrylamid Gel der Testexpressionen	51
Abb. 3.9:	Vergleich der Expressionstärke zwischen zwei, das gleiche Konstrukt exprimierenden Klone	52
Abb. 3.10:	Expression von <i>StreptII</i> - Δ NHR 4K-His in Klon pSB4 (#18)	52
Abb. 3.11:	Ermittlung optimaler Versuchbedingungen zur Expression von <i>StreptII</i> - Δ NHR 4K- His bei 30 °C	53
Abb. 3.12:	Ermittlung optimaler Versuchbedingungen zur Expression von <i>StreptII</i> - Δ NHR 4K- His bei 37 °C	53
Abb. 3.13-A:	Ermittlung des optimalen Induktionszeitpunktes für die Expression von <i>StreptII</i> - Δ NHR 4K-His in Klon pSB4 (Western Blot Analyse)	54
Abb. 3.13-B:	Ermittlung des optimalen Induktionszeitpunktes für die Expression von <i>StreptII</i> - Δ NHR 4K-His in Klon pSB4 (Coomasie Blue gefärbtes Polyacrylamid Gel)	54

Abb. 3.14:	Western Blot Analyse der Testexpressionen in LB und TB Medium	54
Abb. 3.15:	Wachstumskurven der Expressionskulturen in LB und TB Medium	54
Abb. 3.16:	Native Ni-NTA Affinitätschromatographie einer 2 l Expression von <i>StreptII-ΔNHR</i> 4K-His	55
Abb. 3.17:	Pufferoptimierung zur verbesserten Bindung von <i>StreptII-ΔNHR</i> 4K-His an Ni-NTA Agarose	56
Abb. 3.18:	Native Ni-NTA Affinitäts-chromatographie von <i>StreptII-ΔNHR</i> 4K-His	57
Abb. 3.19:	Coomassie Blue gefärbtes SDS Polyacrylamid Gel (12 %) der nativen Aufreinigung von <i>StreptII-ΔNHR</i> 4K-His	57
Abb. 3.20:	<i>Strep</i> -Tactin Affinitätschromatographie von <i>StreptII-ΔNHR</i> 4K-His	57
Abb. 3.21:	Übersicht der angewandten Strategie zur Aufreinigung von <i>StreptII-ΔNHR</i> 4K-His	58
Abb. 3.22:	Denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie von <i>StreptII-ΔNHR</i> 4K-His	58
Abb. 3.23:	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	60
Abb. 3.24:	Nachweis der Integration des Gens für HERV-K TM in das Genom von <i>Hansenula polymorpha</i> RB11	61
Abb. 3.25:	Aminosäuresequenz von HERV-K TM	61
Abb. 3.26:	Testexpression von HERV-K TM in <i>Hansenula polymorpha</i> RB11	62
Abb. 3.27:	Testexpressionen zur Ermittlung der optimalen Kultivierungstemperatur und optischen Dichte zur Induktion der HERV-K TM Expression	63
Abb. 3.28:	Testexpressionen zur Ermittlung der optimalen Induktorkonzentration	63
Abb. 3.29:	Erprobung unterschiedlicher Fermentationsarten zur Herstellung von HERV-K TM ...	64
Abb. 3.30:	Vergleich verschiedener Puffer zur Erhöhung der Löslichkeit von rekombinantem HERV-K TM aus <i>H. polymorpha</i>	65
Abb. 3.31:	Auswirkung von Triton-X 100 und SDS auf die Löslichkeit von HERV-K TM	66
Abb. 3.32:	Aufreinigung von HERV-K TM mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie	66
Abb. 3.33:	IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit rekombinantem HERV-K TM aus <i>Hansenula polymorpha</i>	67

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1:	Sequenzvergleich der immunsuppressiven Domäne verschiedener Vertreter der Retroviren	6
Tab. 1.2:	Vergleich verschiedener pro- und eukaryotischer Wirtsorganismen zur Expression rekombinanter Proteine	12
Tab. 2.1:	Antibiotika und verwendete Stock- und Arbeitskonzentrationen	18
Tab. 2.2:	In dieser Arbeit verwendete Bakterien- und Hefestämme	23
Tab. 2.3:	Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide	27
Tab. 2.4:	Übersicht über alle verwendeten <i>primer</i>	28
Tab. 2.5:	<i>Primer</i> zum Nachweis von HERV-K TM in <i>Hansenula polymorpha</i> RB11	28
Tab. 2.6:	Übersicht über alle verwendeten Sequenzierprimer	28
Tab. 2.7:	Tabelle zur Ermittlung der benötigten (NH ₄) ₂ SO ₄ -Menge	40
Tab. 3.1:	Übersicht über die hergestellten gp41 Fragmente	47
Tab. 3.2:	Vergleich verschiedener Bedingungen für die Ligation der restringierten, PCR-amplifizierten Fragmente mit dem Shuttlevektor pSTREP-HIS1525	49
Tab. 3.3:	Übersicht der genetischen Konstrukte zur Transformation von <i>B. megaterium</i>	49
Tab. 3.4:	Ermittlung der optimalen Lysozymkonzentration und Inkubationszeit zur Herstellung von Protoplasten	50
Tab. 3.5:	Versuchsparameter zur Ermittlung optimaler Kultivierungsbedingungen	52
Tab. 3.6:	Übersicht über getestete Lysepuffer zur verbesserten Bindung der rekombinanten Proteine an die Ni-NTA Agarose	56
Tab. 3.7:	Zusammensetzung verwendeter Puffer zur Erhöhung der Löslichkeit von HERV-K TM	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ad.	addieren auf ein Gesamtvolumen von
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar
BP	Bindepuffer
BSA	bovines Serumalbumin
CA	Capsidprotein
CAI	<i>codon adaption index</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cfu	<i>colony forming unit</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary cells</i>
CHR	C-terminale Helix (Heptad) Region
dest.	destilliert
DF	Durchfluss
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiotritol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
env	<i>envelope</i>
EP	Elutionspuffer
FDA	Food and Drug Administration
FeLV	Felines Leukämie Virus
FP	Fusionspeptid
gag	<i>group specific antigen</i>
gp	Glykoprotein
GST	Glutathion-S-Transferase
HAART	<i>highly active anti-retroviral therapy</i>
HARS1	<i>Hansenula polymorpha autonomously replicating sequence 1</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HERV-K	Humanes endogenes Retrovirus K
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HTLV	<i>human t-lymphotrophic virus</i>

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	Integrase
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
Isu	immunsuppressiv
lat.	Latein
LB	Luria Broth
LP	Lysepuffer
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MA	Matrixprotein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MF α	<i>mating factor α</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MOX	Methanoloxidase
MPER	Membranproximale externe Region
MuLV	Murines Leukämie-Virus
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NC	Nucleokapsidprotein
Nef	<i>negative factor</i>
NHR	N-terminale Helix (Heptad) Region
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
OD	Optische Dichte
orf	<i>open reading frame</i>
ori	<i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polythylenglycol
PR	Protease
prim.	primär
Pol	<i>polymerase</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
P _{xylA}	Promotor der Xylase A aus <i>B. megaterium</i>
rev	<i>regulator of expression of virion proteins</i>
RKI	Robert Koch-Institut, Berlin
rpm	<i>rotations / rounds per minute</i>

RRE	<i>Rev-responsive element</i>
RT	Reverse Transkriptase
S-S	Disulfidbrücke (Cystein-Cystein)
SA	Spleißakzeptor
SD	Spleißdonor
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sek.	sekundär
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> Ovarienzellen 9
SU	Hüllprotein
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
tat	<i>transactivator of transcription</i>
TB	Terrific Broth
TBF	<i>transformation buffer</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCS	<i>thrombin cleavage site</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
T _m	<i>melting temperatur</i>
TM	Transmembranes Hüllprotein
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TP	Trophoblastenprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tx	Triton-X
ÜN	über Nacht
vif	<i>viral infectivity factor</i>
vpr	<i>viral protein rapid</i>
v/v	<i>volume to volume</i> (Volumenanteil bezogen auf das Gesamtvolumen)
w/v	<i>weight to volume</i> (Gewichtsanteil bezogen auf das Gesamtvolumen)
WP	Waschpuffer
xyIR	Repressor des Xylose-Operons
YPD	<i>yeast-peptone-dextrose</i> (Vollmedium für Hefen)
YPM	<i>yeast-peptone-methanol</i> (Induktionsmedium für Hefen)

EINBUCHSTABENCODES FÜR AMINOSÄUREN

A	Alanin
B	Asparagin oder Asparaginsäure
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
X	Beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin
Z	Glutamin oder Glutaminsäure

EINBUCHSTABENCODES FÜR NUKLEINSÄUREN

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

I EINLEITUNG

I.1 AIDS UND HIV

I.1.1 AIDS

Nach dem Auftreten erster Todesfälle 1981 wurde eine neue Krankheit diagnostiziert, die, wie einige Jahre später beschrieben, durch das humane Immundefizienz Virus (HIV) ausgelöst wird. Die Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) hat bis heute mehr als 25 Millionen Todesopfer gefordert und ist damit eine der schlimmsten Pandemien in der Geschichte der Menschheit. Im Jahr 2007 belief sich die Zahl HIV-infizierter Menschen weltweit auf rund 33 Millionen, bei einer Neuinfektionsrate von knapp 2,5 Millionen Menschen. Rund 67 % der Menschen lebten in der Sub-Sahara, wobei sich in diesem Gebiet mehr als zwei Drittel der Neuinfektionen ereigneten. Im Jahr 2007 starben ca. 2 Millionen Menschen an den Folgen der Immunschwächekrankheit AIDS (UNAIDS, 2008). Anhand dieser dramatisch hohen Zahlen wird deutlich, dass nicht nur die Gesundheit von Millionen Menschen bedroht ist, sondern in manchen Regionen auch die Gefahr besteht, dass innerhalb von wenigen Jahren soziale und ökonomische Strukturen zusammenbrechen könnten. Nach wie vor stellt AIDS weiterhin eine tödliche Krankheit dar, gegen die es keinen wirksamen Impfstoff gibt. Die Kombinationstherapie für bereits Infizierte, bekannt unter dem Namen HAART (*highly active antiretroviral therapy*), kann den Verlauf der Krankheit zwar hinauszögern, wird aber in den Entwicklungsländern aus Kostengründen derzeit nicht breit genug eingesetzt. Daher muss die Entwicklung eines Impfstoffes vorrangig betrieben werden (UNAIDS, 2008).

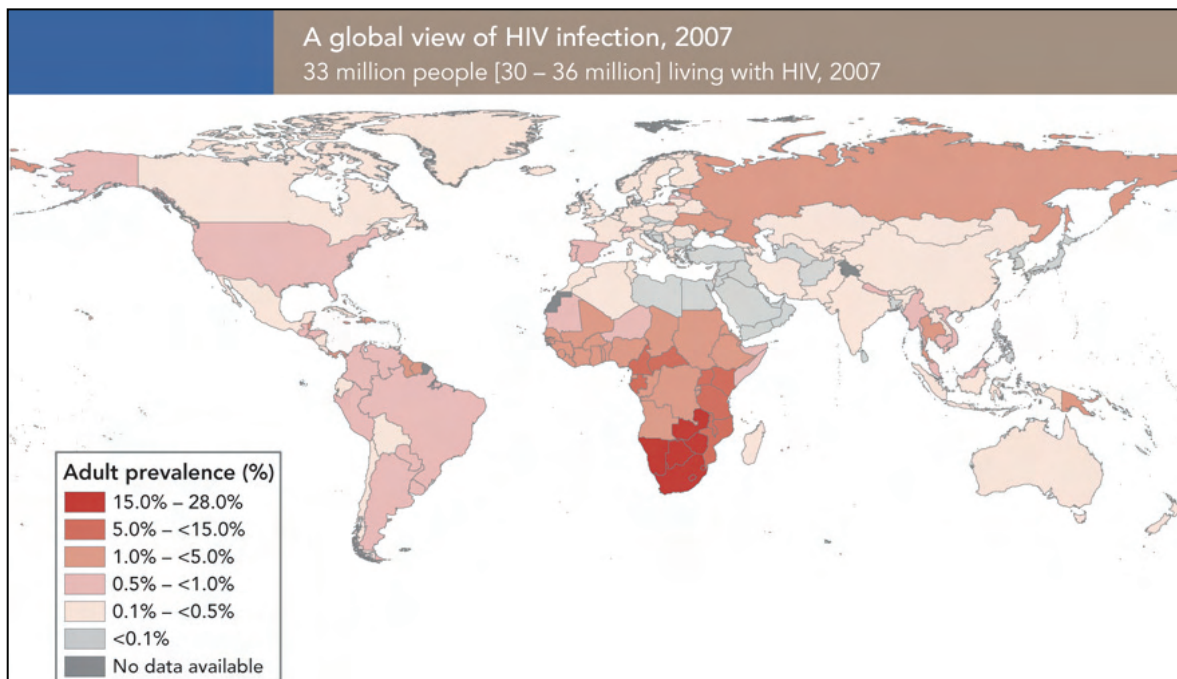


Abb.1.1: Globale Übersicht der HIV-Infektionen. Im Jahr 2007 lebten weltweit ca. 33 Millionen mit HIV infizierte Menschen. Etwa 67 % davon lebten in der Sub-Sahara. (UNAIDS 2008)

I.1.2 Das humane Immundefizienz Virus 1 (HIV-1)

Im Jahr 1983 wurde von der Forschungsgruppe um Luc Montagnier (Barre-Sinoussi *et al.* 1983) die Entdeckung des LAV (*lymphoadenopathy associated virus*) publiziert, von dem zunächst angenommen wurde, dass es der Erreger von AIDS sei. Allerdings wurde bereits kurze Zeit später der Zusammenhang von LAV und AIDS bezweifelt. 1984 publizierte Robert Gallo das von ihm erstmals beschriebene HTLV-III (*human T-lymphotrophic virus*) (Gallo *et al.* 1984) und galt zunächst als Entdecker des Erregers von AIDS. Nachdem 1986 offiziell bestätigt wurde, dass beide gefundenen Viren identisch sind, bekam der Erreger die Bezeichnung HIV (*human immunodeficiency virus*). HIV wird der Familie der Retroviren und der Gattung Lentiviren (lat. *lentus*: langsam) zugeordnet. Eine Ansteckung führt nach einer unterschiedlich langen, meist mehrjährigen Latenzphase zu AIDS. Retroviren erhielten ihren Namen aufgrund der Reversen Transkriptase, welche zur Integration des viralen Genoms die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umschreibt (Baltimore 1992). Anschließend erfolgt mit Hilfe der Integrase die Integration ins Wirtszellgenom.

Es existieren zwei verschiedene Typen von HIV (HIV-1 und HIV-2), die sich im Sequenzvergleich der beiden Genome zu 40 % voneinander unterscheiden. HIV-1 ist in der Mehrzahl aller humanen HIV-Infektionen der Erreger und lässt sich weiter in die Gruppen M (*major*), O (*outlier*) und N (*new*) unterteilen. Für das Auftreten von AIDS als weltweite Pandemie ist die Gruppe M verantwortlich (Gurtler *et al.* 1994, Loussert-Ajaka *et al.* 1995, Vanden Haesevelde *et al.* 1994, Simon *et al.* 1998), welche durch Sequenzvergleiche in elf weitere Subtypen (A bis K) unterteilt werden (Moore *et al.* 2001). Die Gruppen O und N hingegen kommen lediglich in einigen Teilen Afrikas vor.

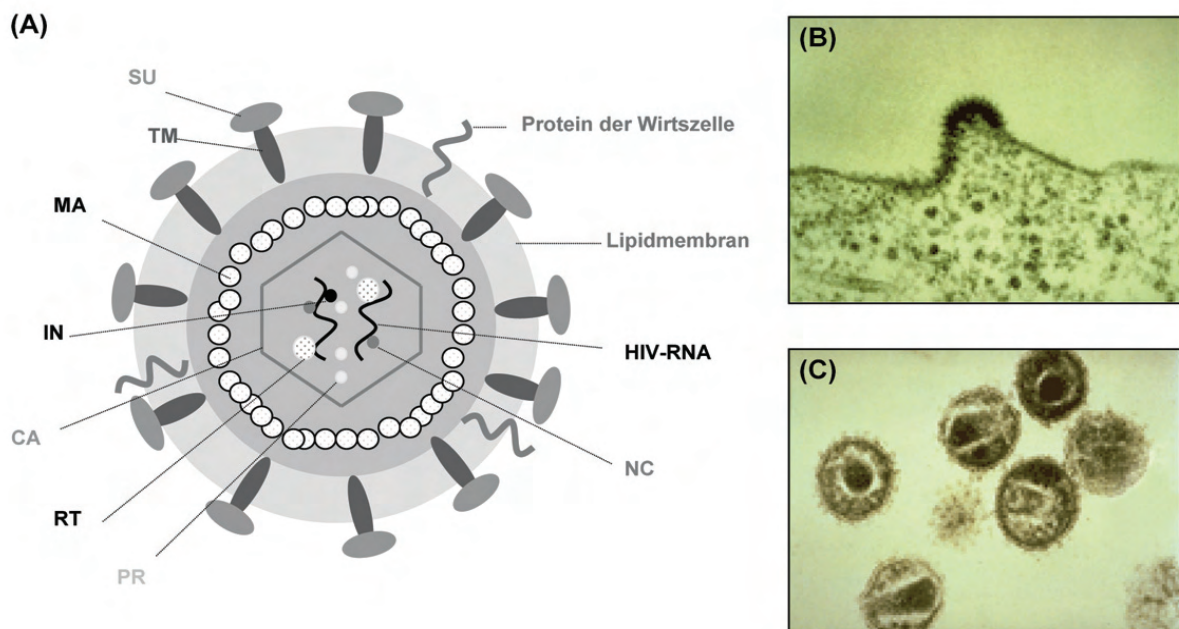


Abb. 1.2: Die Morphologie reifer HIV-1 Viruspartikel (Hammer 2006). **(A)** Schematische Darstellung des reifen HI-Virions. (MA: Matrixprotein p17, CA: Kapsidprotein p24, NC: Nukleokapsidprotein p7, RT: Reverse Transkriptase p51, PR: Protease p11, IN: Integrase p32, TM: Transmembranprotein gp41, SU: Hüllprotein gp120 **(B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines HI-Virions beim *budding*. **(C)** In der elektronenmikroskopischen Aufnahme infektiöser Viruspartikel ist deutlich das von einer Hüllmembran umgebene, konische Kapsid zu erkennen.

Das reife HI-Virion (Abb. 1.2A) hat eine sphärische Morphologie mit einem Durchmesser von etwa 100 nm. Im konisch geformten Kapsid (p24, CA) befinden sich neben den beiden identischen RNA Molekülen die Reverse Transkriptase (RT), die virale Protease (PR), die Integrase (IN), die Proteine Vif (*viraler Infektiösitätsfaktor*), Vpu (*virales Protein U*) und Nef (*negativer Faktor*), sowie einige Wirtszell Faktoren (Hirsch *et al.* 1990). Die beiden identischen, ungespleißten RNA Moleküle werden von einem Ribonukleoprotein-Komplex, bestehend aus etwa 2000 Nucleokapsidproteinen (p7, NC), umgeben und somit stabilisiert (Stryer *et al.* 1996). Das Linkerprotein (p6) stellt eine Verbindung zwischen dem Kapsid und den Matrixproteinen (p17, MA), welche durch ihre N-terminale Myristilierung mit der Hüllmembran verankert sind, her. Die äußere Hülle des Virions besteht aus einer Lipid-Doppelschicht der Wirtszelle und enthält daher diverse wirtseigene Strukturen, wie MHC-Proteine, Zelladhäsionsproteine (z.B. ICAM-1) und Glykolipide. Außerdem enthält sie etwa 72 Trimere des integralen Proteins gp41, wobei an jedes gp41 ein peripheres gp120 nichtkovalent gebunden ist (Turner und Summers 1999).

I.1.3 Genomstruktur und retrovirale Proteine

Das Genom von HIV-1 besteht aus zwei identischen, 9,2 kb langen, einzelsträngigen RNA Molekülen, wohingegen die persistierende Form des HIV-1 Genoms in infizierten Zellen in Form proviraler (also in das Wirtsgenom integrierter), doppelsträngiger DNA vorliegt. Das Genom ähnelt mit seiner 5'-Cap-Struktur und 3'-Polyadenylierung einer eukaryotischen messenger RNA und enthält 9 offene Leseraster (*open reading frames*, ORF). Drei dieser Leseraster kodieren für die Proteine Gag (*group specific antigen*), Pol (*polymerase*) und Env (*envelope*). Bei diesen Genprodukten handelt es sich um Polyproteine, die proteolytisch in Einzelproteine gespalten werden und in den folgenden Kapiteln noch näher beschrieben werden. Neben den viralen Enzymen und Strukturproteinen sind auf dem komplexen RNA-Genom des Weiteren auch regulatorische (Tat und Rev) und akzessorische (Nef, Vpr, Vif und Vpu) Proteine kodiert.

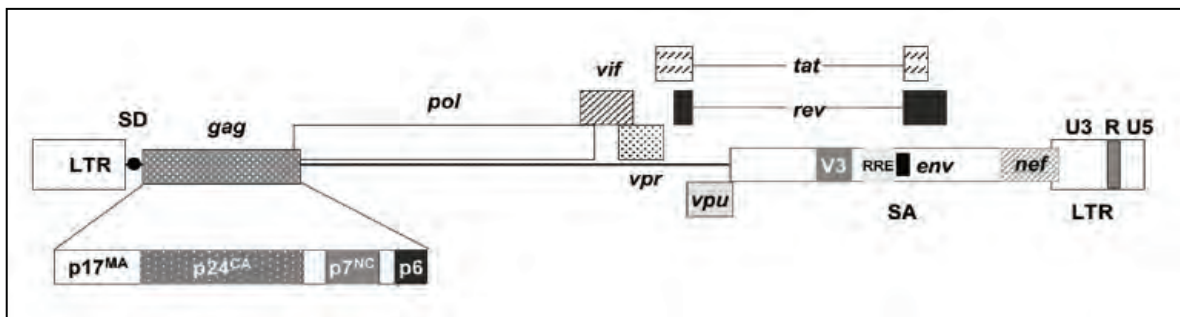


Abb. 1.3: Organisation des proviralen Genoms von HIV-1. *gag* = gruppenspezifisches Antigen, *pol* = Polymerase, *vif* = viraler Infektiösitätsfaktor, *vpr* = virales Protein R, *vpu* = virales Protein U, *tat* = Transaktivator der Transkription, *rev* = Regulator der Expression viraler Proteine, *env* = envelope, *nef* = negativer Faktor, RRE = Rev-responsive element, LTR = long terminal repeat, SD = 5'-Spleißdonor, SA = 3'-Spleißakzeptor. (Hammer 2006)

I.1.3.1 Das *gag*-Gen und dessen Genprodukte

Das *gag*-Gen wird zunächst als 55 kDa großes Vorläuferprotein exprimiert, welches zur Zelloberfläche transportiert und erst im bereits abgeschnürten Virion durch die virale Protease in die Proteine p17 (Matrixprotein), p24 (Kapsidprotein), p7 (Nukleoprotein), p6 (Linkerprotein), sowie die beiden Spacerpeptide p2 und p1 gespalten wird. Durch die proteolytische Spaltung wird eine Umstrukturierung des Virions zum reifen und infektiösen Viruspartikel induziert (Bryant und Ratner 1990). Die Gag-Proteine erfüllen Aufgaben beim Zusammenbau (*assembly*) und Abknospen (*budding*) der neuen Viruspartikel. Das Matrixprotein p17, welches ein Bestandteil des Präintegrationskomplex ist, enthält für den aktiven Transport der viralen DNA in den Zellkern einer infizierten Wirtszelle ein Kernlokalisierungssignal. Somit können Retroviren auch „ruhende“ Zellen infizieren (Valentin *et al.* 1990, Von Schweder *et al.* 1994). Das Gag-Vorläuferprotein ist zur Verankerung in der Lipid-Doppelschicht aminoterminal myristyliert.

I.1.3.2 Das *pol*-Gen und dessen Genprodukte

Das *pol*-Gen wird zusammen mit dem *gag*-Gen als gemeinsame *Gag/Pol*-Vorläuferprotein exprimiert. In etwa 5 % aller Translationsvorgänge kommt es bei der Translation vom *Gag*-Vorläuferprotein zur Verschiebung des Leserasters um +1, wodurch das Stopcodon für die *gag*-Genprodukte überlesen wird. In den übrigen 95 % kommt es zur Translation von *Gag*-Vorläuferproteinen. Verantwortlich hierfür ist eine Pyrimidin-reiche Haarnadelstruktur in der mRNA, welche die Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese erniedrigt und zur fehlerhaften Erkennung des Leserasters durch die Ribosomen führt. Das *pol*-Gen kodiert für die drei Proteine Integrase (IN), Protease (PR) und Reverse Transkriptase (RT). Während der Virusreifung kommt es zur Autokatalyse der Protease, welche anschließend die Spaltung des *Gag*-Vorläuferproteins katalysiert. Die Integrase ist eine als Endonuklease und Ligase agierende Nukleotidyltransferase. Sie restringiert doppelsträngige DNA und ist für die Integration des proviralen Genoms (Abb. 1.3) in das Genom der infizierten Wirtszelle zuständig (Fields und Howley 1996). Die Reverse Transkriptase fungiert als RNA- und DNA-abhängige DNA-Polymerase und besitzt darüber hinaus Ribonuklease H-Aktivität, welche während der viralen Replikation für den Abbau des RNA-Anteils aus der RNA-DNA-Heteroduplex verantwortlich ist. Da es der Reversen Transkriptase an einer Korrekturlesefunktion (*proof reading*) fehlt, werden pro Replikationsrunde in etwa 10 neue Fehler generiert (entspricht einer Wahrscheinlichkeit von etwa 10^{-3} bis 10^{-4}). Dies ist die Hauptursache für die hohe Mutationsrate von HIV, die zu einer gesteigerten Populationsdynamik und zur gleichzeitigen Existenz von Quasispezies in einem Wirt führt (Ho *et al.* 1995). Zudem liegt durch ständige Mutationen der Hüllproteine eine Antigendiversität vor, welche die Entwicklung eines Impfstoffes gegen AIDS erheblich erschwert (Dehwurst und Whetter 1997).

I.1.3.3 Akzessorische und regulatorische Proteine

Neben den *gag*-, *pol*- und *env*-Genen besitzt das HIV-1 Genom noch sechs weitere Gene. Die beiden regulatorischen Gene *tat* und *rev*, sowie die akzessorischen Gene *nef*, *vpr*, *vif* und *vpu*. Die

vier zuletzt genannten werden den akzessorischen Genen zugeordnet, da sie *in vitro* für die Virusreplikation nicht unbedingt erforderlich sind. Die regulatorischen Proteine Tat und Rev stimulieren die Transkription der proviralen DNA in RNA und deren Elongation, fördern den Transport von HIV-RNA vom Zellkern ins Zytoplasma und sind notwendig für die Translation. Der nukleäre Exportfaktor Rev ist wichtig für die Umstellung der Expression früher regulatorischer Proteine zu den später synthetisierten Strukturproteinen. Die Rolle der beiden regulatorischen Proteine Tat und Rev bei der Expression viraler Proteine wird in Kapitel I.1.5 noch einmal ausführlicher erörtert.

Nef wird ebenso, wie Tat und Rev, als regulatorisches Protein früh während des viralen Replikationszyklus produziert. Nef induziert eine Herabregulation von CD4 Molekülen und HLA Klasse-I Antigenen (Collins *et al.* 1998) auf der Oberfläche infizierter Zellen, was ein „Entkommen“ vor dem Angriff zytotoxischer T-Zellen begünstigt. Vpr (*viral protein r*) ist am nukleären Transport des Präintegrationskomplexes in den Zellkern beteiligt und kann in höheren Konzentrationen Apoptose induzieren (Heinzinger *et al.* 1994). Vpu (*viral protein unique*) erhöht die Rate der Virusausschleusung aus der Wirtszelle und ist an der Degradation von CD4-gp160-Komplexen im endoplasmatischen Retikulum beteiligt. Vif (*virion infectivity factor*) ist essentiell für die Infektion *in vivo*. Durch Vif wird in der späten Phase der Virusproduktion die angeborene Immunantwort von T-Zellen und Makrophagen unterbunden. Ohne Vif ist HIV in humanen T-Zellen nicht infektiös (Frankel und Young 1998).

I.1.3.4 Das *env*-Gen und die Glykoproteine gp120 und gp41

Das *env*-Gen kodiert für die Glykoproteine gp120 und gp41, die zusammen die sogenannten *spikes* (Gelderblom *et al.* 1987) auf der Oberfläche des Virions bilden. Die Glykoproteine liegen auf der Zelloberfläche als Komplex, bestehend aus einem externen (gp120, SU) und einem transmembranen Hüllprotein (gp41, TM), vor (Chan *et al.* 1997). Die Glykoproteine bilden zwei Homotrimerie, die nichtkovalent miteinander verbunden und verantwortlich für die Anheftung des Virus an seine Zielzelle und für die Fusion der viralen mit der zellulären Membran sind (D'Souza *et al.* 2000). Die Synthese und Glykosylierung von gp120 und gp41 erfolgt am Rauen endoplasmatischen Retikulum in Form eines Vorläuferproteins gp160 (Stein und Engleman 1990). Etwa 80 % der Glykosylierungen am Vorläuferprotein entfallen auf den gp120 Proteinanteil, während gp41 mit nur fünf Glykosylierungsstellen eher schwächer glykosyliert wird (Leonard *et al.* 1990, Poignard *et al.* 2001). Während des vesikulären Transportes von gp160 zur Zelloberfläche erfolgt durch Golgi- assoziierte Furinproteasen die Spaltung in gp120 und gp41 (Weissmann 1998), sowie die weitere Trimerisierung.

Das Glykoprotein gp120 besitzt eine Masse von 120 kDa, von der etwa 50 % auf den Kohlenhydratanteil entfallen. Das bedeutet, dass die Oberfläche vom gp120 zu einem großen Teil mit Kohlenhydratstrukturen bedeckt ist (24 bis 26 potentielle N-Typ Glykosylierungsstellen), die aus der wirtseigenen Glykosylierungsmaschinerie stammen und dadurch für das menschliche Immunsystem schwierig zu erkennen sind (Moore *et al.* 1994). Gp120 setzt sich aus fünf relativ konstanten Regionen (C1-C5) und fünf hypervariablen Bereichen (V1-V5) zusammen. Die ersten

vier variablen Bereiche bilden exponierte *Loops*, wobei die dritte hypervariable Schleife (*V3-Loop*) maßgeblich an der gp120-Corezeptor-Wechselwirkung beteiligt ist (Papandreou und Fenouillet 1998). Das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1 (Abb. 1.4) setzt sich aus einer Ekto-, einer Transmembran- (TM) und einer Endodomäne zusammen und ist im Gegensatz zu gp120 hochgradig konserviert (Benit *et al.* 2001). Die Ektodomäne besteht aus dem N-terminalen Fusionspeptid (FP) und einer N-terminalen Helixregion (NHR), welche über einen Cysteinloop (S-S) mit der C-terminalen Helixregion (CHR) verbunden ist. Innerhalb der NHR befindet sich die immunsuppressive (ISU) Domäne (Denner *et al.* 1994), die in Kapitel I.1.3.5 genauer beschrieben wird. Eine membranproximale externe Region (MPER) schließt sich C-terminal an die CHR an. In Kapitel I.1.4 wird die Membranfusion vermittelnde Funktion von gp41 genauer erörtert.

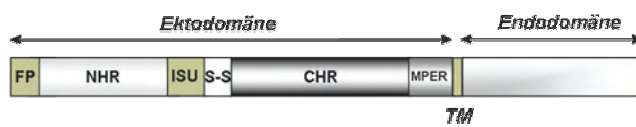


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1. FP: Fusionspeptid, NHR: aminotermine Heptad Region, ISU: Immunsuppressive Domäne, S-S: Cystein-Cystein-Loop, CHR: carboxyterminale Heptad Region, MPER: membranproximale externe Region, TM: Transmembrandomäne

I.1.3.5 Die Isu-Domäne von gp41

Innerhalb der NHR verschiedener Retroviren konnte eine 17 Aminosäuren lange Subdomäne lokalisiert werden (bei HIV-1 gp41: Aminosäuren 583-599), welche aufgrund der inhibierenden Effekte auf die Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten als Immunsuppressive (Isu) Domäne bezeichnet wird (Cianciolo *et al.* 1985, Ruegg *et al.* 1989, Denner *et al.* 1994). Sequenz- und Strukturanalysen der transmembranen Hüllproteine weiterer Retroviren, wie z.B. PERV (*porcines endogenes Retrovirus*), KoRV (*Koala Retrovirus*) oder auch MuLV (*murines Leukämievirus*) haben gezeigt, dass dieser Bereich relativ konserviert ist. Durch Cianciolo konnte 1985 eine Konsensussequenz abgeleitet und ein Peptid synthetisiert werden, welche als CKS-17 Peptid bezeichnet wurde.

CKS-17	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
PERV-A	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
KoRV	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
MuLV	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
FeLV-A	L	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	L	K	E	G	G	L
HTLV-1	A	Q	N	R	R	G	L	D	L	L	F	W	E	Q	G	G	L
HIV-1	L	Q	A	R	I	L	A	V	A	R	Y	L	K	D	Q	Q	L
HERV-K10	L	A	N	Q	I	N	D	L	R	Q	T	V	I	W	M	G	D

Tabelle 1.1: Sequenzvergleich der immunsuppressiven Domäne verschiedener Vertreter der Retroviren (Cianciolo 1985). Die von der CKS-17 abweichenden Sequenzen sind **fett** dargestellt und grau unterlegt. PERV: porcines endogenes Retrovirus, KoRV: Koala-Retrovirus, MuLV: murines Leukämievirus, FeLV: felines Leukämievirus, HTLV: humanes T-Zell-Leukämie-Virus, HIV: humanes Immundefizienzvirus, HERV: Humanes Endogenes Retrovirus.

Neben der inhibierenden Wirkung auf Lymphozyten konnten *in vitro* noch weitere inhibierende Effekte auf den *respiratory burst* von humanen Monozyten (Harrell *et al.* 1986), auf die IL-1 Aktivität (Kleinemann *et al.* 1987) und die IFN- γ Produktion (Ogasawara *et al.* 1990), auf die Immunglobulin Sekretion (Mitani *et al.* 1987), sowie auf die durch NK-Zellen vermittelte Zytotoxizität (Harris *et al.* 1987) festgestellt werden. Außerdem konnten weitere immunsuppressive Effekte durch eine Aktivierung von MAP-Kinasen, durch Phosphorylierung von Phospholipasen (Raf-1, MEK, ERK1/2, PLC- γ 1), sowie durch Veränderung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen (Fan *et al.* 2005) beschrieben werden. Für das Isu-Peptid von HIV-1 gp41 und CKS-17 konnten Modulationen in der Cytokinproduktion von PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) nachgewiesen werden (Denner 1998, Tacke 2000). CKS-17 zeigte inhibierende Effekte auf die IL-2, IL-12, TNF- α und INF- γ Expression und stimulierende Effekte auf die Expression von IL-10 und IL-6 (Kleinemann *et al.* 1987). Allerdings konnten die oben beschriebenen Effekte nur nachgewiesen werden, wenn das Isu-Peptid an ein Carrier-Protein (z.B. Bovines Serumalbumin) gebunden war. Für das Isu-Peptid als Monomer konnten diese Effekte nicht gezeigt werden (Denner *et al.* 1994, Haraguchi *et al.* 1995). Die immunsuppressiv aktive Domäne des gp41 von HIV-1 erstreckt sich von AS 583-599 (Denner *et al.* 1994, GeneBank Accession Number K03455). Das HIV-1 Isu-Peptid hemmt *in vitro* die Mitogen- und Lymphokin-abhängige Proliferation von humanen und murinen Lymphozyten (Ruegg *et al.* 1989, Denner *et al.* 1996) und moduliert ebenfalls die Cytokinantwort. Auch für das Isu-Peptid von z.B. HIV-1 gp41 konnte eine Inhibition der IL-2 und TNF- α Expression und eine verstärkte IL-6 und IL-10 Expression gezeigt werden (Takeshita *et al.* 1996, Denner *et al.* 1998).

Eine weitere Auffälligkeit bei der genauen Betrachtung der Isu-Domäne ist die Homologie zu den Domänen der Klasse-I Interferone (Abb. 1.5) (Denner 1998, Chen *et al.* 1999).

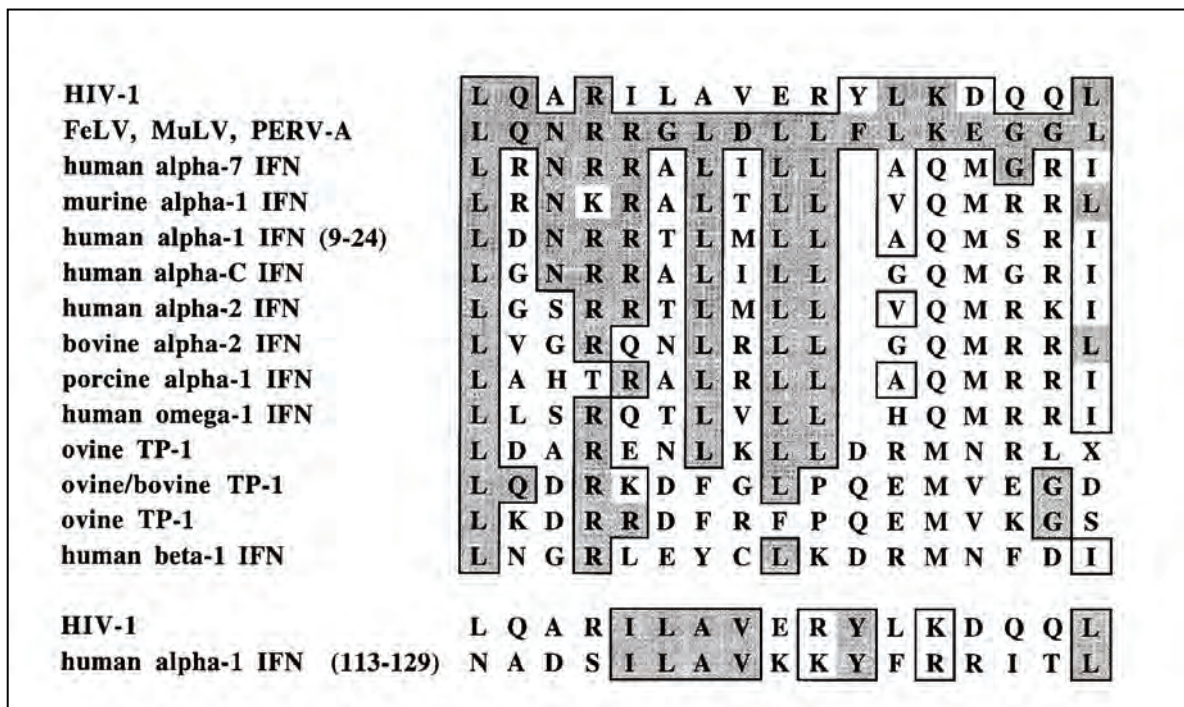


Abb. 1.5: Sequenzhomologien zwischen der immunsuppressiven Domäne verschiedener Retroviren und Interferonen (Denner 1998). Umrandete und grau unterlegte Aminosäuren sind identisch mit denen der Isu-Domäne von FeLV, MuLV und PERV-A. Umrandete Aminosäuren zeigen konservierte Aminosäureaustausche (R=K, L=I=V, F=Y). FeLV: felines Leukämievirus, MuLV: murines Leukämievirus, PERV: porcines endogenes Retrovirus, TP: Trophoblastenprotein.

14 Interferon- α , ein Interferon- β und ein Interferon- ω Molekül bilden zusammen die Klasse-I Interferone, wobei jedes den gleichen Rezeptor, bestehend aus den zwei Untereinheiten IFN α R1 und IFN α R2, bindet. Auch für Interferon- α konnte durch Hemmung der B- und T-Zell Proliferation eine immunsuppressive Wirkung festgestellt werden (Ruegg *et al.* 1990). Weiterhin konnten für gegen das Isu-Peptid gerichtete Antikörper Wechselwirkungen mit Interferon- α festgestellt werden (Chen *et al.* 1999).

I.1.4 Membranfusion und Viruseintritt

HIV infiziert Zellen, die den CD4-Rezeptor und einen passenden Corezeptor aus der Familie der Chemokinrezeptoren auf ihrer äußeren Membran präsentieren (Alkhatib *et al.* 1996). Zu diesen Zellen zählen hauptsächlich T-Helferzellen, aber auch einige Makrophagen und Monocyten.

Der Eintritt von HIV in Immunzellen findet auf molekularer Ebene nach folgendem Mechanismus statt. Das Glykoprotein gp120 bindet über seine konstante Region C4 an den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche der Wirtszelle (Robey *et al.* 1995), wobei die Domänen C2 und C3 ebenfalls bei der Interaktion von gp120 mit CD4 mitzuwirken scheinen (Olshevsky *et al.* 1990). Die daraus resultierende Konformationsänderung des gp120 Protein ermöglicht die Bindung an die Corezeptoren CXCR4 bzw. CCR5. Es wird angenommen, dass diese Wechselwirkung zum größten Teil mit der V3-Region stattfindet (Moore *et al.* 1994). Aufgrund dieser Bindung kommt es zu einer Destabilisierung des gp120-CD4-Komplexes mit der Konsequenz einer Konformationsänderung des gp41 und zur Penetration der Plasmamembran der Zielzelle durch das hydrophobe Fusionspeptid. Durch hydrophobe Wechselwirkung der NHR- mit der CHR-Region kommt es zu weiteren Konformationsänderungen von gp41 und zur Ausbildung des sogenannten Sechs-Helix-Bündels (*six-helix-bundle*) (Chan *et al.* 1997, Weissenhorn *et al.* 1997, Sackett und Shai 2003). Hierbei bilden je drei N-Helices eine *coiled-coil*-Struktur, um die sich die drei C-Helices antiparallel gruppieren. Dieser Übergangszustand bringt die Membranen zusammen und führt so zur Membranfusion.

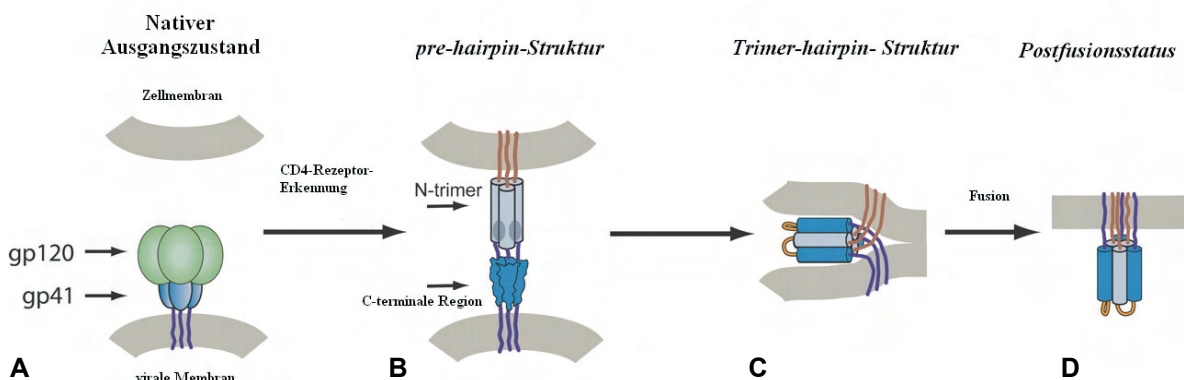


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Konformationsänderung von gp41 während der Fusion (Chan *et al.* 1998). (A) gp120 bindet mittels der C4-Domäne an CD4, wodurch es nach einer (B) Konformationsänderung zum Freilegen des Fusionspeptides kommt, welches die Membran der Zielzelle penetriert. Durch weitere strukturelle Umlagerungen kommt es daraufhin zur Ausbildung des (C) Sechs-Helix-Bündels (*Trimer-hairpin*) und schließlich (D) zur Membranfusion.

I.1.5 Replikationszyklus und Pathogenese

Die HIV-Infektion beginnt mit dem Anheften (*attachement*) der viralen Hüllproteine an die Oberfläche der Wirtszelle und wird durch die Interaktion zwischen der extrazellulären Domäne von HIV-1 gp120 und den zellulären Rezeptoren vermittelt (Moore und Sattentau 1993). Der Hauptrezeptor für HIV-1 ist CD4, wobei die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 *in vivo* die wichtigsten Korezeptoren für HIV-1 sind (Clapham und McKnight 2001). Nach erfolgter Rezeptorvermittelter Endozytose (siehe I.1.4) gelangt das virale Kapsid in das Cytoplasma der Wirtszelle (*uncoating*) und das einzelsträngige RNA Genom wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA transkribiert (Hirsch *et al.* 1990). Zur Integration der viralen DNA wird ein sogenannter Präintegrationskomplex, bestehend aus dem viralen RNA-Genom, den Enzymen Reverse Transkriptase und Integrase, sowie dem Matrixprotein p17 und Vpr, gebildet (Farnet und Haseltine 1991), und aktiv über eine Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization signal, NLS*) in den Zellkern importiert (Popov *et al.* 1998, Le Rouzic und Benichou 2005, Haffar und Bukrinsky 2005). Anschließend vermittelt die virale Integrase die unspezifische Integration des HIV-Genoms in die Wirts-DNA (Allan *et al.* 1987).

Zunächst findet durch Bindung zellulärer Transkriptionsfaktoren wie, z.B. NFκB (*nuclear factor b*) und SP1, an die entsprechenden Elemente der LTR (*long terminal repeats*) der integrierten proviralen DNA eine basale Transkription der Gene *tat* (*transactivator of transcription*), *rev* (*regulator of expression of viral proteins*) und *nef* (*negative elongation factor*) statt (Jordan *et al.* 2001). Da zu diesem Zeitpunkt lediglich mehrfach gespleißte mRNA-Moleküle transkribiert und in das Cytosol transportiert werden, sind sie essentiell für den Übergang von der frühen zur späten Phase der Infektion. Die nukleäre Degradation ungespleißter, viraler RNA-Transkripte wird auf bislang noch unbekannte Weise durch A/U-reiche Sequenzen oder Sequenzmotive (*inhibitory sequences, INS*) vermittelt (Freed 2001, Kofman *et al.* 2003). Das regulatorische Protein *Tat* (Rabson *et al.* 1988) bindet an das TAR-Element (*transactivation response*) (Harrich *et al.* 1996, Harrich und Hooker 2002) am 5' Ende einer naszierenden viralen RNA und rekrutiert weitere zelluläre Faktoren (Wei *et al.* 1995, Isel und Karn 1999). Eine durch CDK9 vermittelte Hyperphosphorylierung der RNA-Polymerase II erhöht die Aktivität des Transkriptionskomplexes und gewährleistet somit eine effiziente Elongation der viralen Transkription (Isel und Karn 1999), wodurch es zur Steigerung der Transkriptionsrate um das 100-fache kommt (Jones und Peterlin 1994). *Rev* hingegen fördert die Expression struktureller (*gag, env*) und enzymatischer (*pol*) Gene durch Bindung an eine ausgeprägte RNA-Sekundärstruktur (*rev responsive element, RRE*), die innerhalb der für die viralen Hüllproteine kodierenden Region *env* liegt (Pollard und Malim 1998) und in allen einfach- und ungespleißten HIV RNA Transkripten vorhanden ist (Tiley und Cullen 1992, Battiste *et al.* 1996). Durch Bindung von *Rev* an transkribierte mRNA wird der nukleäre Export aller RNAs mit einer RRE aktiviert (Nilsson *et al.* 2002) und die Zusammenlagerung des Spleißapparates am Spleißdonor (SD) verhindert, wodurch auch einfach- und ungespleißte mRNAs translatiert werden können (Konforti *et al.* 1993). Somit begünstigt *Rev* die Ausreifung viraler Partikel durch Förderung der Expression struktureller und enzymatischer Gene und gleichzeitiger Inhibition der Produktion regulatorischer Proteine.

Die Produkte der Gene *gag* und *pol* formieren den Kern der reifenden HIV Partikel, die *env* Genprodukte hingegen bilden die, in die Hüllmembran eingebetteten, „*spikes*“. Diese werden als gp160-Vorläuferprotein im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, glykosyliert, über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert. Die Gag-Proteine werden ebenfalls als Vorläufermolekül mit einer molaren Masse von 53 kDa translatiert. Nach proteolytischer Spaltung entstehen die Proteine p24, p17, p9 und p7. Ohne diesen Schritt können keine infektiösen Viruspartikel entstehen (Kohl *et al.* 1988). Wie bereits unter I.1.3.2 beschrieben findet in etwa 5 % der Translationsereignisse ein +1 Leserastersprung statt, welcher zur Expression des Gag/Pol-Polyproteins, bestehend aus Protease, Reverse Transkriptase und Integrase, führt. Die Bildung neuer Viruspartikel erfolgt schrittweise: zunächst formieren HIV-1-RNA, Gag-Proteine und die verschiedenen Pol-Enzyme den *core* und bewegen sich in Richtung der Zelloberfläche. Die beim *budding* von der Wirtszelle erworbene Lipidhülle des Virus zeigt gegenüber der Plasmamembran eine Anreicherung bestimmter Phospholipide und Cholesterol, zudem werden zelluläre Proteine selektiv integriert. Sowohl Zellproteine (HLA), die auf der Virusoberfläche präsentiert werden, als auch die intensive Glykosylierung der gp120 Moleküle durch das zelleigene Glykosylierungssystem erschweren die Erkennung durch das Immunsystem des infizierten Menschen (Wyatt und Sodroski 1998). Alternativ zur Produktion neuer Viren kann das HIV Genom auch nach seiner Integration in eine Art Ruhephase fallen. Dadurch kann das Virus mehrere Jahre ohne Replikation überdauern und ist in dieser Zeit auch weder vom Immunsystem noch von Chemotherapeutika zu erreichen.

Bei der Replikation von HIV wird die Wirtszelle auf mehrere Arten geschädigt. Durch Einbau viraler Glykoproteine und durch die anschließende Virusabknospung wird die Membran der Wirtszelle permeabel, was schließlich zur osmotischen Lyse der Zelle führt. Durch die Präsentation der viralen Glykoproteine können an die Wirtszelle viele weitere CD4-Rezeptor tragende Zellen zu großen, vielkernigen Zellhaufen gebunden werden. Weiterhin wird die eigentliche Funktion der T-Helferzellen beeinträchtigt, indem durch gp120 blockierte CD4-Rezeptoren nicht mehr mit Peptid-MHC-Klasse-II Komplexen wechselwirken können. Durch all diese Vorgänge wird die Zahl funktionstüchtiger Lymphozyten im Organismus stark reduziert und das Immunsystem immens geschwächt (Stryer *et al.* 1996). Das Immunsystem ist somit besonders empfänglich für Erreger wie Pilze oder Viren.

I.2 HETEROLOGE EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE

I.2.1 Rekombinante Proteine

Seit dem Beginn der Entwicklung der Gentechnik wurde eine Vielzahl bakterieller Organismen, Hefen oder tierischer Zellen für die Herstellung von Fremdproteinen genutzt. Hierzu werden in diese die Gene (*gene of interest*) mit den Informationen der herzustellenden Proteine eingebracht und die Proteinproduktion induziert. Aufgrund der jahrzehntelangen Erforschung von *E. coli* als Modellorganismus für Gram-negative Bakterien und dem damit einhergehenden breiten Methodenspektrum zur genetischen Manipulation und Kultivierung, spielt dieses Bakterium eine prominente Rolle bei der heterologen Expression rekombinanter Proteine (Palomares *et al.* 2002). Eine notwendige Voraussetzung für eine adäquate Proteinproduktion ist die Effizienz der Expression des *gene of interest*. Diese ist abhängig von einer Vielzahl an Parametern, deren Optima für jedes Protein neu ermittelt werden müssen. Die Planung eines Expressionsexperiments erfordert unter Anderem folgende Überlegungen:

1. Auswahl eines geeigneten Wirtsorganismus (*host*)
2. Auswahl eines geeigneten Expressionsvektors
3. Art der Expression (Plasmid-basierte Expression oder stabile Integration in das Wirtsgenom)
4. Proteinlokalisierung (intrazelluläre oder extrazelluläre Produktion)
5. Kultivierungsbedingungen (Induktionszeitpunkt, Induktorkonzentration, Kultivierungszeitraum, Temperatur u.a.)

I.2.2 Auswahl des Wirtsorganismus (*host*)

Bakterielle Expressionssysteme werden sehr häufig verwendet, da der Kosten- und Zeitaufwand im Vergleich zu anderen Systemen relativ gering und die Ausbeute an rekombinantem Protein sehr hoch ist. Der wohl meist genutzte Vertreter für die bakterielle Expression ist das Gram-negative Darmbakterium *E. coli*. Aber auch andere Bakterien, wie z.B. *Bacillus megaterium* oder *Bacillus subtilis*, eignen sich für den Einsatz zur Proteinproduktion (Palomares *et al.* 2002). Allerdings haben all diese Expressionssysteme den entscheidenden Nachteil, dass die rekombinanten Proteine nicht, oder nur teilweise, posttranslational modifiziert werden können (Baneyx 1990). Da eine Vielzahl eukaryotischer Proteine zur korrekten Ausübung ihrer Funktion korrekte posttranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierung oder Acetylierung) benötigen, müssen gegebenenfalls andere Organismen verwendet werden. Hefen können einige dieser Modifikation korrekt durchführen und eignen sich deshalb für eine Vielzahl von Anwendungen. Werden korrekt glykosylierte humane Proteine benötigt, so müssen diese Proteine in Insekten- (z.B. Sf9-Zellen) oder Säugerzellen (z.B. CHO-Zellen) angereichert werden. Allerdings sind diese Zellkulturverfahren schwieriger in der Handhabung und erfordern einen deutlich höheren Arbeits- sowie Kostenaufwand.

Eine weitere Einschränkung für den Gebrauch von *E. coli* als Produktionssystem stellt die Kontamination der Endprodukte durch bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharid) dar. Endotoxine sind Bestandteile der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien und werden zu den Pyrogenen gezählt, da sie bei Kontakt mit Schleimhäuten und bei Übertritt ins Blut von Menschen und manchen Tierarten Fieber erzeugen (Raetz und Whitfield 2002). Außerdem aktivieren sie eine Reihe von Signalwegen immunkompetenter Zellen, die entweder zu einer Entzündungsreaktion oder Apoptose führen. In Makrophagen beispielsweise bewirken Lipopolysaccharide durch Bindung an den Toll-like receptor 4 die Expression verschiedener proinflammatorischer Cytokine (TNF- α , IL-1 β) (Beutler und Cerami 1988, Dinarello 1991). Endotoxine werden nicht von lebenden Bakterien ins umgebende Medium sekretiert, allerdings führt der Aufschluss der Bakterien zur Aufreinigung rekombinanter Proteine unweigerlich zur Kontamination.

Für die Herstellung Endotoxin-freier Proteine bietet sich die Verwendung von *Bacillus megaterium* oder auch *Hansenula polymorpha* an. Beide Organismen produzieren keine Endotoxine und verfügen darüber hinaus über eine hohe Sekretionskapazität.

Tabelle 1.2: Vergleich verschiedener pro- und eukaryotischer Wirtsorganismen zur Expression rekombinanter Proteine

Wirtsorganismus	Vorteile	Nachteile
Bakterien, (<i>Escherichia coli</i>)	Viele Referenzen und viel Erfahrung vorhanden	Keine posttranslationalen Modifikationen
	Große Auswahl an Klonierungs vektoren	Die biologische Aktivität und Immunogenität kann vom natürlichen Protein abweichen
	Leichte Kontrolle der Expression	Hoher Gehalt an Endotoxinen in Gram-negativen Bakterien
	Leichte Kultivierung, hohe Ausbeuten (bis zu 50 % des gesamten Zellproteins)	Bildung von <i>inclusion bodies</i>
Bakterien, (<i>Bacillus megaterium</i>)	Hohe Sekretionskapazität	Keine posttranslationalen Modifikationen
	Keine Endotoxine	Die biologische Aktivität und Immunogenität kann vom natürlichen Protein abweichen
Hefen, (<i>Hansenula polymorpha</i>)	Hohe Sekretionskapazität	Kontrolle der Proteinexpression schwieriger als bei Bakterien
	Keine Endotoxine	Glykosylierung nicht identisch mit der von Säugerzellen
	Von der FDA als <i>generally recognized as safe (GRAS)</i> eingestuft	
	Günstige Fermentation	
	Erlaubt Glykosylierung und Bildung von Disulfidbrücken	
Insektenzellen, (<i>Baculovirus als Vektor</i>)	Ähnliche posttranslationalen Modifikationen, wie bei Säugerzellen	Hoher Zeitaufwand
	Biologisch sicher, da nur wenige Arthropoden geeignete Wirtstiere für das Baculovirus sind	Geringe Unterschiede in der Funktion und Antigenizität zwischen dem rekombinanten und dem natürlichen Protein
	Das Virus stoppt die Proteinherstellung der Wirtszellen. Gute Ausbeute an rekombinanten Protein	

Tabelle 1.2: Fortsetzung

Wirtsorganismus	Vorteile	Nachteile
Säugerzellen (z.B. CHO-Zellen)	Gleiche biologische Aktivität wie bei natürlichen Proteinen Vielzahl an Expressionsvektoren erhältlich Können in großen Mengen kultiviert werden	Anspruchsvolle und teure Kultivierung Langsames Wachstum Manipulierte Zellen können genetisch instabil sein Geringe Ausbeute im Vergleich zu Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Wirtsorganismen (*Bacillus megaterium* und *Hansenula polymorpha*) und Expressionsvektoren werden im Abschnitt Material und Methoden in den Kapiteln II.2.1.1, II.2.1.2, sowie II.2.2 ausführlich dargestellt.

I.2.3 Art der Expression

I.2.3.1 Plasmid-basierte Expression

Plasmide sind extrachromosomale, selbst-replizierende, zytoplasmatische DNA-Elemente, welche in Pro- und Eukaryoten vorzufinden sind. Zur Produktion rekombinanter Proteine in Prokaryoten stellen Plasmid-basierte Expressionssysteme die wohl populärste Methode dar. Die Genkopienzahl ist dabei proportional zur Plasmidkopienzahl (*plasmid copy number*), welche wiederum abhängig ist vom verwendeten Plasmid, Organismus und den Kulturbedingungen (Margaritis und Bassi 1991). Plasmidkopienzahlen reichen von einigen wenigen (*low copy plasmids*) bis zu 200 (*high copy plasmids*) Plasmiden pro Wirtszelle. Hierdurch ist die Genkopienzahl in Plasmid-basierten Systemen in der Regel weitaus höher, als bei der stabilen Integration in das Wirtsgenom und somit auch die Expressionsrate. Da zusätzliche zelluläre Ressourcen für die Replikation der Plasmide und für die Expression der Plasmid-kodierten Gene aufgewendet werden müssen, erhöht sich der *metabolic load* der Wirtszelle, welcher mit der Temperatur, dem Expressionslevel, der Toxizität des Proteins und der Größe des *inserts* zunimmt (Corchero und Villaverde 1998, Summers 1998). Das damit korrelierende langsamere Wachstum führt sehr schnell zum Plasmidverlust aus der Expressionskultur und stellt somit den häufigsten Grund für eine verminderte Proteinproduktivität in Plasmid-basierten Systemen dar. Der Grund hierfür liegt in der ungleichmäßigen Verteilung der Plasmide auf die Tochterzellen während der Zellteilung (Paulsson und Ehrenberg 2001). Je niedriger die *plasmid copy number*, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass Plasmid-freie Tochterzellen entstehen (Summers 1998), welche durch ihre höhere Wachstumsgeschwindigkeit die eigentlichen, Plasmid-tragenden Produzenten verdrängen. Um diesen Effekt zu vermeiden werden Expressionsvektoren mit einem Selektionsmarker versehen (z.B. Resistenzgen gegen ein Antibiotikum), um das Wachstum Plasmid-loser Zellen unter Selektionsdruck zu unterbinden.

I.2.3.2 Stabile Integration in das Wirts-Genom

Alternativ zur Plasmid-basierten Expression besteht die Möglichkeit der chromosomalen Integration des *gene of interest* in das Wirtsgenom. Hierdurch wird das Problem der in Kapitel I.2.4.1 beschriebenen Plasmidinstabilität umgangen und zusätzlich der *metabolic load* durch das Fehlen extrachromosomaler Plasmide verringert. Ein weiterer Vorteil ist, dass Expressionskulturen zur Erhöhung der Plasmidstabilität nicht mehr unter ständigem Selektionsdruck kultiviert werden müssen. Für das *Bacillus megaterium* Expressionssystem konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung in antibiotikahaltigen Medien zu einer starken Senkung der Proteinproduktion führen kann (Biedendieck 2006). Allerdings ist die Integration fremder Gene sehr arbeits- und zeitaufwändig und resultiert häufig in einer niedrigeren Expressionsrate. Zurückzuführen ist dies auf eine niedrigere Kopienzahl des rekombinanten Genes (Balbás 2001). Zur Steigerung der Produktivität existieren diverse Strategien zur Integration multipler Gene. Eine Möglichkeit ist die Aneinanderreihung mehrerer identischer Gene zu einem sogenannten *tandem array*, sodass nach erfolgreicher Integration mehrere Genkopien im Chromosom vorliegen (Olson *et al.* 1998). Ein weiteres, die Produktivität stark senkendes Problem ist die mögliche Integration in eine inaktive Chromatinregion.

I.2.4 Proteinlokalisierung

Bei der intrazellulären Produktion werden in der Regel große Mengen an rekombinantem Protein produziert, welches nach Aufschluss der Zellen aufgereinigt werden kann. Bei zu hohen Expressionsraten oder auch starker Hydrophobizität der Proteine kommt es häufig zur Akkumulation der Proteine und Bildung von *inclusion bodies* (Carrio und Villaverde 2002), die nur unter stark denaturierenden Bedingungen mit Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid aufgereinigt werden können. Die Proteine besitzen nach dieser Prozedur keine native Konformation mehr und können nur schwer zurück gefaltet werden. Vor allem bei der industriellen Produktion rekombinanter Proteine kann diese Art der Proteinlokalisierung nachteilig sein, da der Zellaufschluss abhängig vom Produktionsmaßstab sehr kosten- und energieintensiv sein kann.

Das Gram-positive Bakterium *Bacillus megaterium* oder auch die Hefe *Hansenula polymorpha* verfügen darüber hinaus über die Möglichkeit der Sekretion von Proteinen in das Kulturmedium. Bei der Sekretion in das Medium kommt es zu einer starken Ausverdünnung der Proteine. Hierbei ist die Transporteffizienz der rekombinanten Proteine in erster Linie von dem verwendeten Signalpeptid abhängig, welches dem Organismus entsprechend gewählt werden muss. Eine nicht-optimale Wahl des Signalpeptides resultiert häufig in intrazellulärer Proteinakkumulation und –aggregation (Ailor und Betenbaugh 1999). Ein großer Vorteil besteht darin, dass das Kulturmedium in der Regel sehr Protein-arm ist, bzw. das rekombinante Protein lediglich aus einem Gemisch weniger Protein aufgereinigt werden muss. Des Weiteren sind sekretierte Proteine besser vor proteolytischem Abbau geschützt (vorausgesetzt es werden keine Proteasen sekretiert). Zur Aufreinigung werden die Proteine erst durch Fällung oder Ultrafiltration konzentriert und anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

I.2.5 Codon usage

Insgesamt existieren $4^3 = 64$ mögliche Codons, wobei drei als Nonsens-Codons zur Termination der Translation genutzt werden. Die restlichen 61 codieren für die insgesamt 20 proteinogenen Aminosäuren. Für viele Aminosäuren gibt es daher mehrere verschiedene Kodierungen. Unterschiedliche Organismen zeigen häufig eine unterschiedliche Präferenz für die Nutzung eines der unterschiedlichen Codons (Bennetzen und Hall 1982, Sharp *et al.* 1986), die alle die gleiche Aminosäure kodieren (*codon usage bias*). Grundsätzlich ist eine unterschiedliche *codon usage* auf die Häufigkeit der im Organismus vorkommenden unterschiedlichen tRNAs zurück zu führen.

Der sogenannte CAI (*codon adaption index*) eines Genes erlaubt die Berechnung eines vergleichbaren Wertes für die *codon usage*. Anhand von Sequenzvergleichen verschiedener, stark exprimierter Gene eines Organismus (Referenzgene) lässt sich für jede Aminosäure eine prozentuale Nutzung der entsprechenden Codons berechnen und erlaubt somit die Quantifizierung der *codon usage* (Carbone 2003). Ein optimal an einen Wirtsorganismus angepasstes Gen zeigt einen CAI von 1. Bei einem CAI kleiner 0,3 wird häufig sehr wenig bis gar kein rekombinantes Gen exprimiert (Jia und Li 2005) und stellt somit häufig einen limitierenden Faktor bei der heterologen Expression rekombinanter Proteine dar.

Zur Codonoptimierung werden alle selten verwendeten Codons auf DNA-Ebene durch die vom Wirtsorganismus bevorzugten Codons ersetzt und die erhaltene Sequenz synthetisch hergestellt. Bei der Optimierung muss allerdings beachtet werden, dass die später transkribierte mRNA keine Sekundärstrukturen ausbildet, wodurch beispielsweise die Ribosomenbindungsstelle oder die Promotorregion verdeckt werden könnten.

I.3 ZIELSETZUNGEN

Für das transmembrane Hüllprotein, sowie ein synthetisches Peptid, welches einer hochkonservierten Domäne in der N-terminalen Helix Region des gp41 entspricht (Isu-Peptid), konnte *in vitro* die Hemmung der Proliferation humaner Immunzellen sowie die Modulation der Zytokinproduktion gezeigt werden (Ruegg *et al.* 1989, Denner *et al.* 1994). Somit besteht die Möglichkeit, dass das transmembrane Hüllprotein bei der von HIV vermittelten Immunpathogenese eine Rolle spielt. Die immunsuppressiven Eigenschaften der Isu-Domäne konnten mittels ELISA nach Inkubation humaner PBMCs mit synthetischen Isu-Peptiden anhand der Hochregulation und erhöhter Sekretion von IL-10 in das Kulturmedium nachgewiesen werden (Denner 1998). Die synthetisch hergestellten monomeren Isu-Peptide weisen, wie in Kapitel I.1.3.5 beschrieben, keinen Einfluss auf die Cytokinmodulation auf und müssen daher unter großem Proteinverlust chemisch gekoppelt werden. Da die Herstellung der synthetischen Peptide ausgesprochen hohe Kosten produziert, sollte ein Expressionssystem etabliert werden, welches ausreichende Mengen rekombinanter Proteine für weitere Untersuchungen zur Verfügung stellt. *E. coli* als Wirtsorganismus ist in diesem Fall ungeeignet, da es als Gram-negatives Bakterium nicht unerhebliche Mengen an Endotoxinen produziert, die in den weiteren Untersuchungen zur Immunsuppression zu verfälschten Ergebnissen führen. Das Gram-positive Bodenbakterium *Bacillus megaterium* produziert nahezu keine Endotoxine und verfügt darüber hinaus über ein effizientes Sekretionssystem. Zahlreiche Proteine, wie z.B. β -Galactosidase (Rygus und Hillen 1991), Levansucrase (Malten *et al.* 2006) oder Dextransucrase (Wang *et al.* 2005), wurden bereits erfolgreich in *B. megaterium* überexprimiert, wodurch es als potentiell geeignetes Expressionssystem in Frage kommt.

Weiterhin wurde bereits durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe das Gen für HERV-K TM in das Genom von *Hansenula polymorpha* RB11 stabil integriert (Dao Thi 2006). Allerdings ist es bisher noch nicht möglich gewesen ausreichende Mengen an reinem HERV-K TM zu gewinnen. Aus diesem Grund sollten die Expression und die affinitätschromatographische Aufreinigung des transmembranen Hüllprotein des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K TM) optimiert werden und *H. polymorpha* als geeignetes Expressionssystem bestätigt werden.

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 INSTRUMENTE UND CHEMIKALIEN

II.1.1 Geräte

Agarose Gelkammer Mini Sub Cell GT	Biorad, München, Deutschland
Branson Sonifier II 250	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Langensebold, Deutschland
Curix 60	Agfa, Köln, Deutschland
Gel Doc 2000	Biorad, Hercules, USA
LF Werkbank	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Mastercycler eppgradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power Pac 200 bzw. 300	Biorad, München, Deutschland
Schüttelinkubator Innova 4330	New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland
Schüttelinkubator Multitron II	Infors, Basel, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
VF2 (Vortex)	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG; Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro, Langensebold, Deutschland

II.1.2 Chemikalien und Enzyme

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Applied Biosystems, New Jersey, USA
Antibiotic medium No. 3 (Difco)	BD Bioscience, San Jose, USA
Bacto Pepton	BD Bioscience, San Jose, USA
BCA Protein Assay Reagent A+B	Pierce, Illinois, USA
Benzonase	Merck, Darmstadt, Deutschland
BigDye-Mastermix	Applied Biosystems, New Jersey, USA
Complete, EDTA-free	Roche, Mannheim, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Desthiobiotin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
dNTP Mix (10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
ECL Western Blotting Reagent	Pierce, Illinois, USA

Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FireTaq ("house taq")	Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland
Gel Dry – Drying Solution	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glaskugeln (Ø 0,5 mm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	Roth, Karlsruhe, Germany
MgCl ₂ (25 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
TEMED	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England
Restriktionsenzyme <i>SacI</i> , <i>SphI</i>	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
NEB Puffer	New England Biolabs, Frankfurt a.M., Deutschland
O'GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Orange G	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PCR-Puffer 10x	Applied Biosystems, New Jersey, USA
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
T4 Ligase und Ligasepuffer	Roche, Mannheim, Deutschland
Zymolyase	Seikagaku America, Falmouth, USA

II.1.3 Verbrauchsmaterialien und Kits

CL-XPosure Film	Pierce, Illinois, USA
Immobilon Transfer Membranes	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Invitek, Berlin, Deutschland
OptEIA Human IL-10 Set	BD Biosciences, San Jose, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Strep</i> -Tactin Superflow	Qiagen, Hilden, Deutschland

II.1.4 Antikörper zum spezifischen Nachweis von His-tag Proteinen

monoclonal mouse anti-his immunoglobulin	Qiagen, Hilden, Deutschland
polyclonal goat anti-mouse immunoglobulin/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

II.1.5 Antibiotika

Antibiotikum	Stockkonzentration	Arbeitskonzentration	Wirkweise
Ampicillin	100 mg ml ⁻¹	100 µg ml ⁻¹	bakterizid
Tetracyclin (Festmedium)	10 mg ml ⁻¹	10 µg ml ⁻¹	bakteriostatisch
Tetracyclin (Flüssigmedium)	12,5 mg ml ⁻¹	12,5 µg ml ⁻¹	bakteriostatisch

Tabelle 2.1: Antibiotika und verwendete Stock- und Arbeitskonzentrationen. Die bakterizide Wirkung des β -Lactam-Antibiotikum Ampicillin beruht auf der Blockierung der D-Alanin-Transpeptidase, ein für die Ausbildung neuer Zellwände notwendiges Enzym, durch Anlagerung des β -Lactamrings. Tetracyclin hingegen unterdrückt bakterielles Wachstum durch Hemmung der Translation. Tetracyclin verhindert die Anlagerung der Aminoacyl-tRNA an die Akzeptorstelle der ribosomalen 30S-Untereinheit und somit die Proteinbiosynthese. Vor Gebrauch wurden Antibiotika steril filtriert (Ø 0,45 µm).

II.2 NÄHRMEDIEN UND PUFFER

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Puffer in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ angesetzt und für 21 min bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Zur Lagerung wurden alle Nährmedien bei 4 °C aufbewahrt.

II.2.1 Nährmedien für *Hansenula polymorpha*

YPD Vollmedium (pH 6,5)	1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Bakto Pepton 2 % (w/v) Glucose
YPM Induktionsmedium (pH 6,5)	1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Bakto Pepton 2 % (w/v) Methanol
YNB Minimalmedium (pH 6,5)	0,64 % (w/v) Yeast nitrogen base 2 % (w/v) Glucose
BMGY Medium (pH 6,0)	1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Bakto Pepton 1,34 % (w/v) Yeast nitrogen base 0,1 M KHPO_4 2% (w/v) Glyzerin
BMMY Induktionsmedium (pH 6,0)	1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Bakto Pepton 1,34 % (w/v) Yeast nitrogen base 0,1 M (w/v) KHPO_4 2 % (v/v) Methanol

Die Zugabe von Glucose, Methanol und Glyzerin erfolgte unmittelbar vor Gebrauch der Medien in Form einer 40 % (w/v) steril filtrierten (\varnothing 0,45 μm) Stammlösung.

II.2.2 Nährmedien für *Escherichia coli* und *Bacillus megaterium*

LB Medium	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton 10 g/l NaCl
LB Agar Platten	15 g/l Agar in LB Medium

2YT Medium	10 g/l Hefeextrakt 16 g/l Trypton 5 g/l NaCl
------------	--

TB Medium	24 g/l Hefeextrakt 12 g/l Trypton 4 ml Glycerin 0,1 M KHPO ₄
-----------	--

II.2.3 Medien zur Protoplastenherstellung und –transformation

SMMP Medium	2x AB3 und 2x SMM
-------------	-------------------

2x AB3 Medium	35 g/l Antibiotic medium No. 3 (Difco)
---------------	--

2x SMM (pH 6.5)	40 mM Maleinsäure 40 mM MgCl ₂ 80 mM NaOH 1 M Sucrose
-----------------	---

PEG P Lösung	40 % (w/v) PEG 6000 (in 1x SMM pH 6,5 gelöst)
--------------	---

cR5 Top Agar (2,5 ml)	1,25 ml Lösung A 713 µl Lösung B 288 µl 8x cR5 Salze 125 µl L-Prolin [12 % (w/v)] 125 µl D-Glukose [20 % (w/v)]
-----------------------	---

Lösung A (pH 7.3)	0,6 M Sucrose 58 mM MOPS 30 mM NaOH
-------------------	---

Lösung B	4 % (w/v) Agar-Agar 0,2 % (w/v) Casamino acids 10 % (w/v) Hefeextrakt
----------	---

8x cR5 Salze	11 mM K ₂ SO ₄ 0,4 M MgCl ₂ 3 mM KH ₂ PO ₄ 0,16 M CaCl ₂
--------------	---

Medien zur Herstellung von Protoplasten wurden wie folgt sterilisiert.

2x AB3	für 15 min bei 121 °C und 1 bar autoklavieren
2x SMM und Solution A	steril filtrieren (Ø 0,45 µm)
PEG P	für 12 min bei 121 °C und 1 bar autoklavieren
Solution B und 8x cR5 Salze	für 20 min bei 121 °C und 1 bar autoklavieren

II.2.4 Puffer

II.2.4.1 Agarose Gelelektrophorese

50x TAE Puffer	2 M Tris 1 M Acetat 50 mM EDTA
10x Gel Ladepuffer	50 % (w/v) Glyzerin 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA 0,3 % (w/v) Bromphenolblau 0,3 % (w/v) Xylencyanol

II.2.4.2 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese

Gelpuffer	3 M Tris-HCl (pH 8,4) 0,3 % SDS
Anodenpuffer	0,2 M Tris-HCl (pH 8,9)
Kathodenpuffer	0,1 M Tris-Base (pH 8,25) 100 mM Tricin 0,1 % SDS
2x SDS Ladepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 6,8) 12 % (w/v) Glyzerin 4 % (w/v) SDS 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,02 % Coomassie Brilliant Blue G250
Färbelösung	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250

Entfärbelösung	20 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
----------------	--

II.2.4.3 Herstellung RbCl kompetenter Bakterien

TBF I (pH 5,8)	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin
TBF II (pH 6,8)	10 mM RbCl 10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin

II.2.4.4 Western Blot

Transferpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 20 % Methanol 3,75 g/l SDS
Waschpuffer	0,1 % Tween 20 in PBS
Blockierungspuffer	5 % Milchpulver 0,1 % Tween 20 in PBS

II.2.4.5 Native Ni-NTA Affinitätschromatographie

Lysepuffer (pH 8)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol
Waschpuffer (pH 8)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
Elutionspuffer (pH 8)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 250 mM Imidazol

II.2.4.6 Denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie

Bindepuffer B (pH 8)	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-HCl 8 M Harnstoff
Waschpuffer C (pH 6,3)	identisch mit Bindepuffer B
Elutionspuffer D (pH 4,5)	identisch mit Bindepuffer B

II.2.4.7 Strep-Tactin Affinitätschromatographie

Puffer NP (pH 8)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl
Puffer NPD (pH 8)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 2,5 mM Desthiobiotin

II.2.4.8 Aufschluss von *Hansenula polymorpha*

Sorbitolpuffer	1,2 M Sorbitol
Zymolyasepuffer (pH 7,4)	1,2 M Sorbitol 100 mM NaH ₂ PO ₄ 14 mM β-Mercaptoethanol 10 mg ml ⁻¹ Zymolyase

II.3 MIKROORGANISMEN, PLASMIDE UND PRIMER

II.3.1 Bakterien- und Hefestämme

Bezeichnung	Bemerkung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> One Shot [®] TOP10		Invitrogen, Karlsruhe
<i>Bacillus megaterium</i> MS941	Mutante von DSM319, $\Delta nprM$	(Wittchen und Meinhardt 1995)
<i>Bacillus megaterium</i> WH320	Mutante von DSM319, <i>lacZ</i>	(Rygus und Hillen 1991)
<i>Hansenula polymorpha</i> RB11	HERV-K TM stabil in Genom integriert	(Dao Thi 2006)

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Bakterien- und Hefestämme.

II.3.1.1 *Bacillus megaterium*

B. megaterium ist ein Gram-positives, Sporen-bildendes, apathogenes Bodenbakterium mit einem Volumen von mehr als $60 \mu\text{m}^3$. Verglichen mit *E. coli* ($0,5 \mu\text{m}^3$) besitzt *B. megaterium* ein ca. 100-fach größeres Volumen. Die Vorteile der breiten Anwendung von *B. megaterium* zur industriellen Produktion verschiedenster Enzyme, Vitamine etc. sind vielfältig. Er wird bereits heute in einer Vielzahl von industriellen Anwendungen eingesetzt, wie z.B. der Produktion von Amylase, Penicillin-Amidase, dem Aufbereiten toxischer Abfälle oder der aeroben Vitamin B12-Produktion.

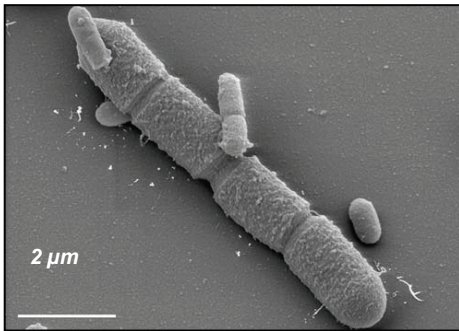


Abb. 2.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *B. megaterium* und *E. coli*. *B. megaterium* besitzt mit ca. $60 \mu\text{m}^3$ ($2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) ein etwa 100-fach größeres Volumen als *E. coli* ($0,5 \mu\text{m}^3$), Vergrößerung: 15000-fach (Vary *et al.* 2007).

B. megaterium besitzt im Vergleich zu *E. coli* vielfache Vorteile als Protein Produktionssystem. Es besitzt keine Endotoxine and verfügt über ein effizientes Sekretionssystem (Vary 1994). Besonders im industriellen Maßstab ist die Sekretion rekombinanter Proteine im Vergleich zur zytoplasmatischen Produktion vorteilhaft. Durch die Einsparung teurer und energieaufwändiger Verfahren zum Aufschluss der robusten Bazillen wird das *Downstream Processing* erheblich vereinfacht. Im Vergleich zu *Bacillus subtilis* besitzt *B. megaterium* die Eigenschaften einer höheren Plasmidstabilität und niedrigeren Proteaseaktivitäten, welche wichtige Vorteile für sekretorische Protein Produktionssysteme darstellen. Darüber hinaus existieren ein effizientes Transformations-system sowie stabile und frei-replizierende Plasmide (Barg *et al.* 2005).

Für Experimente mit dem Ziel der Sekretion rekombinanter Proteine wurden in dieser Arbeit der *B. megaterium* Stamm MS941, sowie der Expressionsvektor pSTREPHIS1525 (siehe II.3.2), verwendet. *B. megaterium* MS941 ist eine Mutante des Stammes DSM319, bei der die extrazelluläre Protease NprM deletiert wurde und sekretierte Proteine somit stabiler im Kulturmedium vorliegen (Wittchen Meinhardt 1995).

II.3.1.2 *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*)

Mikroorganismen stellen heutzutage die meist genutzten Expressionsplattformen zur Produktion von hetero-, sowie auch homologen Proteinen dar. Prokaryotische Mikroorganismen besitzen gegenüber eukaryotischen Zellen höhere Wachstumsraten und damit einhergehend höhere Expressionsraten. Es existieren standardisierte und bewährte Methoden zur genetischen Veränderung und die Kultivierung von Prokaryoten ist im Vergleich zu Eukaryoten wesentlich anspruchsloser und preiswerter. Allerdings fehlt es prokaryotischen Systemen teilweise an der Möglichkeit zur korrekten posttranslationalen Modifizierung. In vielen Fällen kommt es zur Aggregation von Proteinen in *inclusion bodies*, die nur unter stark denaturierenden Bedingungen

mit Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid aufgeschlossen werden müssen. Hefen können die Vorteile von Prokaryoten (hohe Expressionsraten) und Eukaryoten (Proteinfaltung, Zusammenbau von funktionalen Unterheiten, posttranslationale Modifikationen), zusammen mit der Nicht-Existenz von Endotoxinen und onkogener oder auch viraler DNA, vereinen. Die von der US Food and Drug Administration als sicherer Organismus (generally regarded as safe GRAS) eingestufte methylotrophe Hefe *H. polymorpha* verfügt über eine hohe Sekretionskapazität und ist in der Lage Methanol als Kohlenstoffquelle zu verwerten (Gelissen 2000).

Zur Expression von HERV-K TM wurde mir für diese Arbeit *H. polymorpha* RB11 zur Verfügung gestellt, welche bereits das Plasmid pFPMT121-HERV-K TM stabil im Genom integriert hatten. Diese Arbeiten wurden bereits durch die Arbeitsgruppe P13 am Robert Koch-Institut, Berlin durchgeführt.

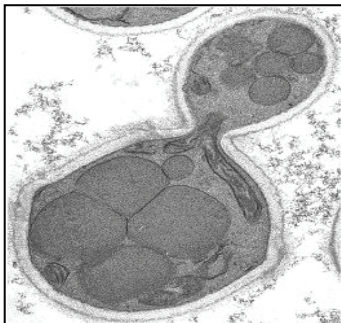


Abb. 2.2: Elektronenmikroskopische Abbildung einer knospenden *H. polymorpha* Zelle, die im Chemostaten mit Methanol als Kohlenstoffquelle kultiviert wurde. Sie enthält große Peroxisomen, die das Zellinnere ausfüllen (Gelissen 2005).

II.3.2 Plasmide

DNA wurde zur Lagerung in TE Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,4) bei -20 °C aufbewahrt.

II.3.2.1 pSTREP-HIS1525 – Plasmid zur extrazellulären Proteinproduktion in *B. megaterium*

Durch die beiden Replikationsursprünge (*ori*, *origin of replication*) ist es möglich, Klonierung und Plasmidamplifikation in *E. coli* durchzuführen und *B. megaterium* mit dem entsprechenden Konstrukt zur Expression zu transformieren. Selektion erfolgt in *E. coli* durch Einsatz von Ampicillin und in *B. megaterium* durch Tetracyclin. Alle Konstrukte wurden über die Schnittstellen *Sac* I und *Sph* I in die *multiple cloning site* (*MCS*) kloniert und stehen somit unter Kontrolle des streng regulierten Promotor P_{xyIA} . In Abwesenheit von Xylose bindet der *Repressor* (*xyIR*) an den Operator und verhindert wirksam Transkription. Durch Zugabe von Xylose [0,5 bis 1 % (w/v)] wird eine Konformationsänderung des Repressors bewirkt, welcher als Folge vom Operator dissoziiert und somit der RNA-Polymerase den Zugang zum Promotor ermöglicht. Nach erfolgter Transkription wird ein Fusionsprotein translatiert, welches N-terminal einen *Strep*-tag II (8 Aminosäuren) und C-terminal einen RBS-6xHis-tag (9 Aminosäuren) enthält. Unmittelbar vor dem *Strep*-tag II ist ein Signalpeptid (SP_{lipA}) lokalisiert, welches die Sekretion rekombinanter Proteine bewirkt und somit die weitere Aufreinigung erheblich erleichtern soll. Rekombinante Proteine können mittels Affinitätschromatographie (*Strep*-Tactin oder Ni-NTA) aufgereinigt werden.

II.3.2.2 pC-HIS1622 – Plasmid zur intrazellulären Proteinproduktion in *B. megaterium*

Bei pC-HIS1622 handelt es sich wie bei pSTREPHIS1525 um einen Shuttlevektor. pC-HIS1622 besitzt ebenfalls den Promotor P_{xylA} und die gleiche *multiple cloning site* wie pSTREPHIS1525. Zur Aufreinigung translatierter Proteine besitzt pC-HIS1622 einen RBS-6xHis-tag stromabwärts der MCS. Das Gen β-Lactamase verleiht *E. coli* Resistenz gegen Ampicillin und das Tetracyclinresistenzgen (Tet^R) *B. megaterium* Resistenz gegen Tetracyclin.

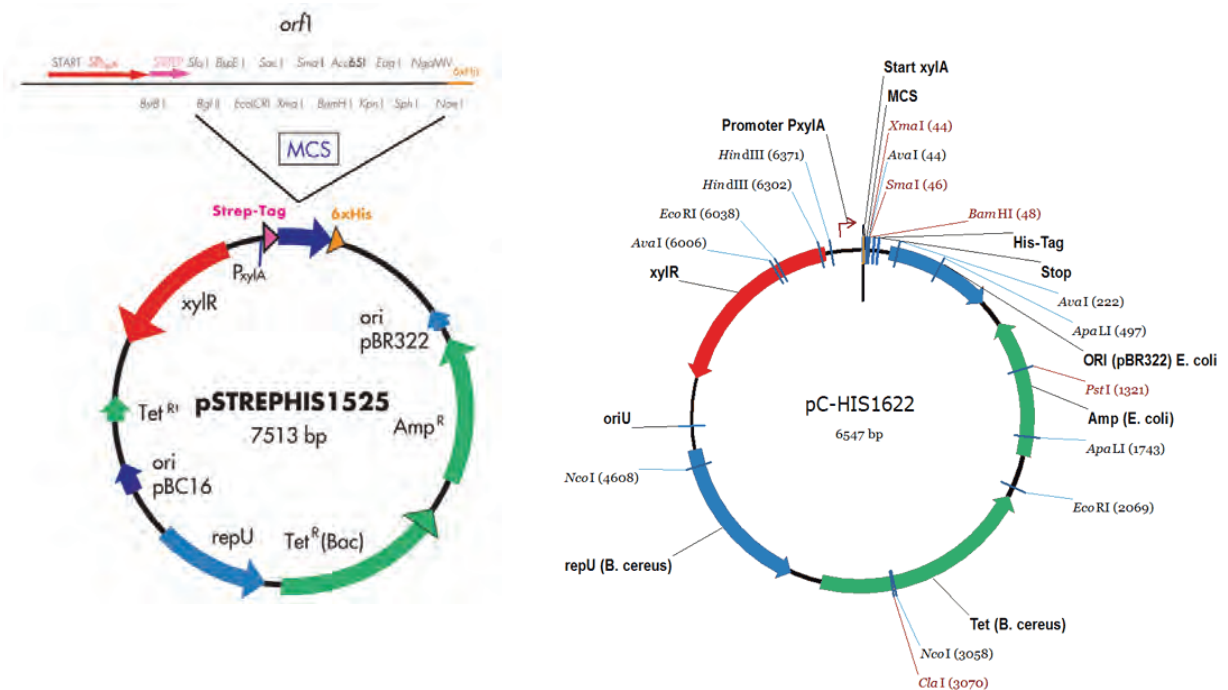


Abb. 2.3: Darstellung der Shuttlevektoren pSTREPHIS1525 (links) und pC-HIS1622 (rechts). Beide Vektoren besitzen zur Replikation in *E. coli* und *B. megaterium* die oris pBC16 und pBR322. Die Gene β-Lactamase, sowie das Tetracyclinresistenzgen ermöglichen Selektion durch Ampicillin (*E. coli*) und Tetracyclin (*B. megaterium*). Expression wird durch den Xylose-induzierbaren Promotor P_{xylA} reguliert. Durch das Signalpeptid SP_{lipA} vermittelt, können in pSTREPHIS1525 kodierte Proteine sekretiert werden, während pC-HIS1622 kodierte Proteine zytoplasmatisch exprimiert werden. Zur Aufreinigung stehen ein N-terminaler Strep-tag II (pSTREPHIS1525) und ein C-terminaler 6xHis-tag (pSTREPHIS1525 und pC-HIS1622) zur Verfügung.

II.3.2.3 pSSTA-ITLN2

Beim Plasmid pSSTA-ITLN2 handelt es sich um einen TA-Klonierungsvektor zur Klonierung von PCR-Fragmenten. Bei der Synthese von komplementären DNA-Strängen fügen Taq-Polymerasen in der Regel 3' terminal mindestens ein Adenin an, sodass mit Taq-Polymerasen amplifizierte DNA-Fragmente in pSSTA-ITLN2 über „sticky-end Ligation“ kloniert werden können. Nach erfolgreicher Transformation und Plasmidextraktion können klonierte Fragmente mit den gewünschten Restriktionsenzymen (*Sac I* und *Sph I*) behandelt und in einen Expressionsvektor (pSTREPHIS1525 oder pC-HIS1622) subkloniert werden. Diese Prozedur wurde angewandt, wenn die sofortige Klonierung in beide erwähnten Expressionsvektoren nicht unmittelbar funktionierte.

II.3.2.4 pUC19

pUC19 wurde bei Transformationen von *E. coli* als Positivkontrolle und zur Berechnung der Transformationseffizienz verwendet. Als Selektionsmarker verfügt es, wie auch alle anderen verwendeten Plasmide, über das Gen β -Lactamase, welches den transformierten Bakterien Wachstum auf ampicillinhaltigen Medien ermöglicht.

II.3.2.5 pFPMT121

Zur Expression von HERV-K TM wurde mir *H. polymorpha* RB11 zur Verfügung gestellt, welches bereits pFPMT121-HERV-K-TM in seinem Genom integriert hatte (RKI, Berlin, Diplomarbeit Viet Loan Dao Thi, 2006). Die Expressionskassette beinhaltet den Promotor MOX-P (Methanol Oxidase), welcher durch Zugabe von Methanol [1 bis 2 % (v/v)] die Transkription des Fusionsprotein HERV-K TM-TCS-6xHis-MF α induziert. Durch die *thrombin cleavage site* (TCS) ist es möglich den 6xHis-tag (*His6*) und den *mating factor a* (MF α) vom aufgereinigten Protein abzuspalten. Bei MF α handelt es sich um ein Signalpeptid, welches die Sekretion des Fusionsproteins bewirken soll. Die Integration des Vektors erfolgte über eine zum Hefegenom homologe Sequenz mit der Bezeichnung *HARS1* (*Hansenula polymorpha* autonomously replicating sequence 1).

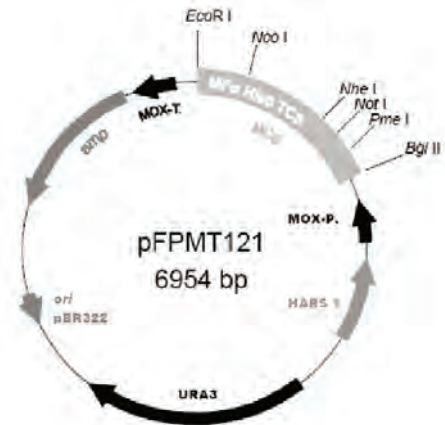


Abb. 2.4: Darstellung von pFPMT121

Bezeichnung	Größe [bp]	Beschreibung
pSTREP-HIS1525	7513	Shuttlevektor mit P _{xyIA} , Strep-tag II, SP _{LipA} , MCS, 6xHis-tag
pC-HIS1622	6547	Shuttlevektor mit P _{xyIA} , MCS, 6xHis-tag
pUC19	2686	Plasmid zur Bestimmung der Transformationseffizienz
pSSTA-ITLN2	3580	TA-Klonierungsvektor
pFPMT121	6954	MOX-P, MCS, TCS, MF α , 6xHis-tag und <i>HARS1</i>

Tabelle 2.3: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Die Plasmide pSTREP-HIS1525, pC-HIS1622, pUC19 und pSSTA-ITLN2 enthalten alle einen *origin of replication* und das Gen β -Lactamase zur Vermehrung in *E. coli* auf ampicillinhaltigem Medium. Die Shuttlevektoren pSTREP-HIS1525 und pC-HIS1622 besitzen zusätzlich ein *ori* für *B. megaterium* sowie ein Tetracyclinresistenzgen. pFPMT121 wurde in den mir zur Verfügung gestellten Hefen bereits stabil in das Genom integriert. Abkürzungen: P_{xyIA}: Promotor der Xylose A, induzierbar durch Zugabe von 1 % (w/v) Xylose; Strep-tag II: Tag zur spezifischen Aufreinigung mittels Strep-Tactin Affinitätschromatographie; SP_{LipA}: Signalpeptid der Lipase A zur Sekretion; MCS: multiple cloning site; 6xHis-tag: zur Aufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie; MOX-P: Promotor der Methanol Oxidase, induzierbar durch Zugabe von 2 % (v/v) Methanol, MF α : mating factor α , Signalpeptid; HARS1: *Hansenula polymorpha* autonomously replicating sequence 1.

II.3.3 Klonierungs- und Sequenzierprimer

Untenstehende primer wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen. Die Schmelztemperaturen (T_m) wurden auf Grundlage der zur amplifizierenden DNA homologen Basen (**fett** dargestellt) mit folgender Formel berechnet: $T_m = 2 \text{ }^\circ\text{C} \cdot (A+T) + 4 \text{ }^\circ\text{C} \cdot (G+C)$

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T_m [°C]
Bac_1_for	TT <u>GAGCT</u> CCCGCAGCAGGAAGCACTATG	56
Bac_2_for	TT <u>GAGCT</u> CCCAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAG	66
Bac_3_for	TT <u>GAGCT</u> CCCACGCTGACGGTACAGGCCAGA	68
Bac_4_for	TT <u>GAGCT</u> CCCTGGAATGCTAGTTGGAGT	52
Bac_1_rev	TTGCATGCGGACCCCAATCCCCAGGAG	58
Bac_2_rev	TTGCATGCGGTTTCTTTTTCTTACCCCAATCCCCAGGAG	58
Bac_3_rev	TTGCATGCGGGTGTATTAAGCTTGTGTAATT	54
Bac_4_rev	TTGCATGCGGTTTCTTTTTCTTGTGTATTAAGCTTGTGTAATT	54
Bac_5_rev	TTGCATGCGGATACCACAGCCAATTTGT	50
Bac_6_rev	TTGCATGCGGTTTCTTTTTCTTATACCACAGCCAATTTGT	50

Tabelle 2.4: Übersicht über alle zur Amplifikation der in III.1.1 beschriebenen Konstrukte verwendeten primer. *Kursiv und unterstrichen* dargestellte Basen kennzeichnen Restriktionsschnittstellen. Alle forward-primer besitzen am 5' Ende eine Sac I (GAGCTC) und alle reverse-primer eine Sph I (GCATGC) Restriktionsschnittstelle. **Fett** dargestellt sind die zur amplifizierenden DNA homologen Basen. Die Schmelztemperatur T_m eines DNA-Doppelstranges ist als die Temperatur definiert, bei der 50% der DNA dissoziiert vorliegt.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	T_m [°C]
Herv_forward	CGAT <u>GCGGCCGCG</u> TAGCAGGAGTTGCATTGCAC	51
Herv_reverse	GCTA <u>AGATC</u> TTTACGTAGTACTTCCAATGGTCTTA	48

Tabelle 2.5: Primer zum Nachweis von HERV-K TM in *Hansenula polymorpha* RB11. *Kursiv und unterstrichen* dargestellte Basen kennzeichnen Restriktionsschnittstellen. Im Fall von Herv_forward ist diese eine Not I (GCGGCCGC) und eine Bgl II (AGATC) Restriktionsschnittstelle bei Herv_reverse. **Fett** dargestellt sind die zur amplifizierenden DNA homologen Basen.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Sequenzierprimer für Plasmid
Bac_seq_for1	CGTGATTCTATCTGTTTTAGCC	pSTREPHIS1525
Bac_seq_for2	TTGGACCGGTTAGTGATGGT	pSTREPHIS1525
Bac_seq_for3	AAATCAAAAAGGGGGAAATGT	pC-HIS1622
Bac_seq_rev1	TATGGAAAAACGCCAGCAAC	pSTREPHIS1525 und pC-HIS1622
Bac_seq_rev2	GGGGGAAATGTACAATGGTC	pSTREPHIS1525 und pC-HIS1622
Bac_seq_rev3	CAGTTCTCCGCAAGAATTGA	pSTREPHIS1525 und pC-HIS1622

Tabelle 2.6: Übersicht über alle verwendeten Sequenzierprimer. Schmelztemperaturen sind nicht dargestellt, da Sequenzierungen erfolgreich mit allen primern bei einer annealing-Temperatur von 55 °C durchgeführt wurden.

II.4 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN (UMGANG MIT BAKTERIEN)

II.4.1 Sterilisation und steriles Arbeiten

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Medien, Puffer und Verbrauchsmaterialien für 21 min bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Temperatursensitive Lösungen und Substanzen wurden steril filtriert (\varnothing 0,45 μm). Genutzte Arbeitsflächen wurden stets vor und nach Nutzung mit alkoholhaltigem Desinfektionsmittel desinfiziert. Nach Durchführung von Arbeiten mit Bazillen kam ein sporizides, auf Sauerstoffradikalen basierendes, Desinfektionsmittel (Dismozon pur, Bode) zum Einsatz. Mikrobiologische Arbeiten wurden stets unter einer Sterilbank ausgeführt.

II.4.2 Kultivierung auf Agarplatten

Bakterien wurden direkt aus einem Glycerinstock auf LB Agar Platten ausplattiert. LB Medien wurden mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ oder Tetracyclin in einer Endkonzentration von 12,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ sublimiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit von Tetracyclin wurden diese Platten stets in Aluminiumfolie aufbewahrt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30 °C bzw. 37 °C.

II.4.3 Flüssigkulturen von *E. coli*

Aerobe Flüssigkulturen wurden mittels einer einzelnen Kolonie (*cfu*, *colony forming unit*) von einer LB Platte inokuliert. Das Medium wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (siehe II.1.4) und bei 230 rpm und 37 °C in einem Erlenmeyerkolben inkubiert. Die Inkubationszeiten variierten entsprechend der gewünschten optischen Dichte.

II.4.4 Flüssigkulturen von *B. megaterium*

Aerobe Flüssig-Vorkulturen wurden ebenfalls mittels einer einzelnen *cfu* von einer LB Agar Platte inokuliert. Zur Selektion wurde auch diesen Medien das entsprechende Antibiotikum zugesetzt (siehe II.1.4) und die Vorkultur über Nacht bei 37 °C und 230 rpm in einem Erlenmeyerkolben inkubiert. Flüssig-Hauptkulturen wurden am nächsten Morgen in einem Verhältnis von 1:100 aus den Vorkulturen angeimpft. Das Kulturvolumen variierte zwischen 50 und 300 ml in Schikane-Kolben bei 260 rpm und 30 °C bzw. 37 °C. Die Inkubationszeiten variierten entsprechend der gewünschten optischen Dichte.

II.4.5 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gemessen. Für Zelldichten mit einer OD_{600} größer als 0.8 wurden Verdünnungen zur korrekten Messung angefertigt. Als „Blank“ wurde jeweils das entsprechende Medium verwendet.

II.4.6 Lagerung von Bakterien

Bakterienstämme wurden für maximal 7 Tage (*B. megaterium*) oder 4 Wochen (*E. coli*) auf, von Parafilm umschlossene, LB Agar Platten bei 4 °C gelagert. *B. megaterium* MS941 wurde aufgrund seiner Sporen-bildenden Eigenschaft stets in einem separaten Bakterienaufbewahrungsbehälter gelagert. Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden Glycerinstocks angelegt. Hierzu wurde eine frische, von einer einzelnen *cfu* ausgehende Vorkultur mit 30% (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C aufbewahrt.

II.5 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN (UMGANG MIT HEFEN)

II.5.1 Kultivierung auf Agarplatten

H. polymorpha wurde aus einem Glycerinstock auf YPD Agar Platten ausgestrichen und 20 bis 36 h bei 37 °C inkubiert.

II.5.2 Flüssigkulturen von *Hansenula polymorpha*

Zur Anzucht von Vorkulturen wurde Vollmedium (YPD) mit einer einzelnen Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Zur Proteinexpression wurde am nächsten Morgen Expressionsmedium (YPM) mit der Vorkultur auf die gewünschte optische Dichte (OD_{600} zwischen 0,3 und 2) eingestellt und bei 30 °C bzw. 37 °C und 180 rpm 16 bis 48 h inkubiert.

II.5.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte bei den Hefen wie unter II.4.5 beschrieben.

II.5.4 Lagerung von Hefen

Hefen wurden für maximal 7 Tage bei 4°C auf YPD Agar Platten gelagert. Mittelfristige Lagerung für einige wenige Wochen erfolgte in YPD Medium. Für eine langfristige Lagerung wurden 30% (v/v) Glycerin mit einer frischen Vorkultur gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

II.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

II.6.1 Präparation genomischer DNA aus *H. polymorpha*

Die Präparation genomischer DNA aus Hefezellen wurde nach dem Protokoll von Hoffmann und Winston (1987) durchgeführt. Hierzu wurden 10 ml einer Vorkultur mehrfach in einem 2 ml Eppendorf tube für 1 min bei 13300 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 500 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Nach Zugabe von 200 μl Lysepuffer, 200 μl Glaskugeln (\varnothing 0,5 mm) und 200 μl Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol (25:24:1) wurde der Ansatz 1 min stark gevortext und für 2 min bei 13300 rpm zentrifugiert. Nukleinsäuren verbleiben aufgrund ihrer negativen Ladung in der oberen (wässrigen), Proteine hingegen in der Interphase. Die untere (organische) Phase beinhaltet Membranen und andere zelluläre Bestandteile. Zur weiteren Aufkonzentrierung wurden die Nukleinsäuren einer Ethanol-fällung unterzogen. Hierzu wurde die wässrige Phase mit 0,1 Volumen Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol (99 %) versetzt. Nach 20 min Inkubation bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ wurde der Ansatz für 20 min in einer Tischzentrifuge bei 13300 rpm und $4\text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Zum Entfernen des Natriumacetat wurde das DNA-Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50 μl nukleasefreiem Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

II.6.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA mittels PCR wurden für jedes Fragment Primer-Paare designed. An diese wurden jeweils am 5' Ende Restriktionsschnittstellen (*SacI* bzw. *SphI*) angefügt über welche die amplifizierten Fragmente in die Shuttlevektoren pSTREPHIS1525 bzw. pC-HIS1622 inkloniert wurden. Alle verwendeten primer sind unter II.3.3 angeführt.

PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 μl bestehend aus

1 bis 10 ng DNA	
0,5 μl primer forward (10 μM)	
0,5 μl primer reverse (10 μM)	
2,5 μl Reaktionspuffer (10x)	
0,5 μl dNTP Mix (10 mM)	
0,25 μl MgCl_2 (25 mM)	
0,25 μl AmpliTaq Gold	ad. 25 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

angesetzt.

Folgendes Temperaturprofil wurde in einem Thermocycler für 30 Zyklen durchgeführt.

Initiale Denaturierung	95 $^\circ\text{C}$	3 min
Denaturierung	95 $^\circ\text{C}$	45 sec
Annealing	($T_m - 5\text{ }^\circ\text{C}$)	45 sec
Elongation	72 $^\circ\text{C}$	45 sec
Finale Elongation	72 $^\circ\text{C}$	7 min

Die Annealing-Temperatur (2) wurde für jedes Fragment anhand der Schmelztemperaturen (T_m) der eingesetzten Primer Paare bestimmt. Der T_m -Wert lässt sich durch folgende Formel (1) annähernd bestimmen:

$$(1) \quad T_m = 2 \text{ °C} * (A+T) + 4 \text{ °C} * (G+C)$$

$$(2) \quad T_{\text{annealing}} = T_m - 5 \text{ °C}$$

Bei zwei stark abweichenden T_m pro Primer Paar wurde zur Berechnung der annealing-Temperatur der niedrigere T_m -Wert herangezogen. Nach erfolgter Amplifikation wurden die DNA-Fragmente auf einem Agarosegel entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt (siehe II.6.3).

II.6.3 Agarose Gelelektrophorese

Für die analytische Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele mit 0,7 bis 1,5% (w/v) Agarose (gemäß der erwarteten Fragmentgröße) in TAE Puffer hergestellt. Vor dem Gießen wurde dem Gel 2 µl Ethidiumbromid pro 30 ml Agarose Gel hinzu gegeben. Die DNA Proben wurden zur vereinfachten Beladung des Gels und Indikation der Lauffront mit 6x DNA Ladepuffer gemischt. Als Größenstandard wurden jeweils 5 µl GeneRuler DNA Ladder Mix eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 bis 120 V. Aufgrund ihres negativ geladenen Phosphat-Rückgrates migrieren DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Migrationsgeschwindigkeit ist dabei proportional zum negativen Logarithmus ihrer Größe. Nach erfolgter Elektrophorese wurde die DNA mit Hilfe des Gel Doc 2000 anhand der Fluoreszenz von Ethidiumbromid unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) sichtbar gemacht und dokumentiert.

II.6.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach erfolgter PCR oder Restriktion wurde das Reaktionsgemisch mittels Agarose Gelelektrophorese analysiert. Wenn die gewünschte Bande auf dem Gel detektierbar war, wurde diese mit Hilfe eines sauberen, scharfen Skalpells unter UV-Licht der Wellenlänge 312 nm ausgeschnitten und in ein sauberes 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt erfordert schnelles Vorgehen, da eine zu lange UV-Einwirkung DNA-Schäden wie z.B. Pyrimidindimere oder Strangbrüche hervorrufen kann. Die Extraktion der DNA aus dem Agarose Gel wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

II.6.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Plasmidpräparationen wurden die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (siehe II.3.2) mit *EcoRI* linearisiert und auf einem Agarose Gel visuell geprüft. Konzentrationen konnten annähernd durch den Vergleich mit Markerbanden bekannter Konzentration abgeschätzt werden. Zur genaueren Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurde

die Absorbtion bei 260 nm und zusätzlich bei 280 nm mit Hilfe des Spektralphotometers Nano Drop ND-1000 gemessen.

Für eine reine DNA-Lösung gilt:

$$A_{260} = 1 \quad \text{Entspricht } 50 \mu\text{g ml}^{-1} \text{ doppelsträngiger DNA.}$$

Die Reinheit von DNA-Lösungen kann aus dem Quotienten zwischen A_{260} zu A_{280} abgeleitet werden. $A_{260} / A_{280} = 1,8 - 2,0$ Die Lösung kann als relativ rein angesehen werden.

II.6.6 Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

DNA wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *SacI* und *SphI* restringiert. Die eingesetzten Mengen von DNA, Enzym und Reaktionspuffer wurden entsprechend den Herstellerangaben (New England Biolabs) ausgewählt. Das Gesamtvolumen eines Restriktionsansatzes betrug zwischen 10 und 50 μl . Restriktionen erfolgten bei 37 °C für mindestens 1 Stunde. Nach Angaben des Herstellers weisen beide Restriktionsendonukleasen keine Star-Aktivität auf, wodurch Inkubationszeiten bis zu 16 Stunden (über Nacht) möglich waren. Das DNA-Enzym-Gemisch wurde anschließend über eine Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt.

II.6.7 Ligation von DNA

Zur Ligation der mittels PCR amplifizierten und *SacI* bzw. *SphI* restringierten DNA-Fragmente mit den Vektoren pSTREPHIS1525 und pC-HIS1622 (*SacI* und *SphI* restringiert) wurden pro Ligationsansatz 200 U T4 DNA Ligase (Roche), dem Gesamtvolumen entsprechend 10x Ligasepuffer und 25 bis 200 ng Plasmid verwendet. Insert DNA wurde in einem molaren Verhältnis von 5:1 (Insert zu Vektor) eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 10 bis 30 μl . Zur Berechnung der einzusetzenden Menge an Insert-DNA wurde folgende Formel benutzt:

$$(3) \quad m_{\text{insert}} [\text{ng}] = 5 \times m_{\text{Plasmid}} [\text{ng}] \times \text{Größe}_{\text{insert}} [\text{bp}] / \text{Größe}_{\text{Plasmid}} [\text{bp}]$$

Die Reaktion erfolgte bei 25 °C für 2 Stunden gefolgt von weiteren 10 Stunden bei 16 °C. Ligationsansätze wurden zur Transformation von kompetenten *E. coli* benutzt.

II.6.8 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die Elektroporation ist eine sehr effiziente Methode zur Transformation von Bakterienzellen. Durch ein elektrisches Feld, das in der Regel durch eine schnelle Kondensatorentladung erzeugt wird, werden mikroskopisch kleine Poren in der Bakterienmembran erzeugt, die sich innerhalb von Millisekunden wieder schließen. In diesem kurzen Zeitraum erfolgt vermutlich die DNA-Aufnahme. Durch Elektroporation können Transformationseffizienzen von bis 10^{10} cfu μg^{-1} DNA erreicht werden. (Alberts *et al.* 2002)

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden 50 ml LB Medium mit einer einzelnen *E. coli* Kolonie inokkultiert und über Nacht bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 1 l LB Medium im Verhältnis 1:100 aus der Vorkultur angeimpft und wieder bei 37 °C und 230 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 inkubiert. Nach mindestens 30 min auf Eis wurden die Bakterien pelletiert (10 min, 1850 x g, 4 °C) und in 10 ml Glyzerin 10% (w/v) resuspendiert, mit H₂O_{bidest} auf 250 ml aufgefüllt und erneut pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml Glyzerin 10% (v/v) wurde das Pellet schließlich in 5 ml Glyzerin 10% (v/v) resuspendiert, zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die elektrokompetente Zellen bei -80 °C gelagert. Zur Qualitätskontrolle (Bestimmung der Transformationseffizienz) wurde eine Testtransformation mit 1 ng pUC19 durchgeführt.

Zur Elektroporation wurden die gefrorenen elektrokompetenten Bakterien ca. 30 min auf Eis aufgetaut, 1 ng DNA bzw. 1 µl eines Ligationsansatz hinzu gegeben und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Nach erfolgter Elektroporation (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω) wurden zügig 400 µl 2YT-Medium in die Küvette gegeben und die Bakterien 60 min bei 37 °C und 480 rpm im Thermomixer comfort inkubiert. Die regenerierten Bakterien wurden auf LB Ampicillin Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

II.6.9 Transformation von *E. coli* mittels RbCl Methode

Die Rubidiumchlorid Methode ist eine bewährte Standardmethode zur Transformation von Bakterien. Transformationseffizienzen von 10⁶ bis 10⁸ cfu µg⁻¹ DNA können erreicht werden.

Zur Herstellung RbCl kompetenter Zellen wurde eine Flüssigvorkultur bestehend aus 25 ml 2YT Medium mit einer einzelnen Kolonie *E. coli* One Shot[®] TOP10 angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Hauptkultur (500 ml 2YT Medium) im Verhältnis 1:100 aus der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wurde die Kultur für mindestens 10 min auf Eis gekühlt und für 15 min bei 2000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml eiskaltem TBF I Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Pellet erneut in 4 ml eiskaltem TBF II Puffer resuspendiert und Glyzerin in einer Endkonzentration von 10 % (w/v) hinzugefügt. Die Bakteriensuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bis zum weiteren Gebrauch bei - 80 °C gelagert. Nach Herstellung einer neuen Charge kompetenter Bakterien wurde eine Testtransformation, bestehend aus einer Positiv- und einer Negativkontrolle, zur Bestimmung der Transformationseffizienz durchgeführt. Diese wurde nach unten stehendem Protokoll mit 1 ng pUC19 durchgeführt.

Zur Transformation wurden die kompetenten Bakterien für 30 min auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 10 ng DNA bzw. 5 bis 20 µl Ligationsansatz durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42 °C wurden die Bakterien für 60 min bei 37 °C und 230 rpm inkubiert und anschließend auf LB Ampicillin Platten ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

II.6.10 Colony PCR

Um transformierte Bakterien auf Vorhandensein des gewünschten Genes zu überprüfen wurde je ein Klon gepickt, in ein PCR Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit der gleichen Impföse die gepickte Kolonie auf eine neue LB Ampicillin (*E. coli*) bzw. LB Tetracyclin Platte (*B. megaterium*) ausgestrichen. Die PCR wurde mit den Sequenzierprimern Bac_seq_for und Bac_seq_rev (für pSTREPHIS1525) bzw. Bac_seq_for3 und Bac_seq_rev3 (pC-HIS1622) wie unter II.6.2 durchgeführt und mittels Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe II.6.3). Von positiven Klonen wurden je 2 ml LB Ampicillin bzw. LB Tetracyclin angeimpft und zwei Glycerinstocks zur langfristigen Lagerung angefertigt (siehe II.4.6).

II.6.11 Mini Präparation von Plasmiden aus *Escherichia coli*

Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde nach Herstellerangaben mit dem Spin Plasmid Mini Two-Kit (Invitex) durchgeführt. Generell basiert dieses auf der alkalischen Lyse der Bakterien und anschließender Bindung der Plasmid-DNA an einen Anionenaustauscher. Als Ausgangsmaterial für die Mini Präparation wurden jeweils 4 ml einer frischen Übernachtskultur eingesetzt. Die Elution erfolgte mit 50 µl H₂O_{bidest.} Es gilt zu beachten, dass der Lyseschritt nicht länger als 5 Minuten erfolgen darf und ab diesem Zeitpunkt die Proben mit Sorgfalt zu behandeln sind. Nichtbeachtung kann zu Kontaminationen mit genomischer DNA führen.

II.6.12 Mini Präparation von Plasmiden aus *Bacillus megaterium*

Da Gram-positive Bakterien im Gegensatz zu Gram-negativen einen weit aus dickeren Mureinsacculus besitzen, reicht der alleinige Schritt der alkalischen Lyse nicht zum Aufschluss der Bakterien aus. Aus diesem Grund wurde das Herstellerprotokoll des Plasmid Mini Two-Kit (Invitex) durch einen weiteren Schritt ergänzt. Nach Ernten der Zellen aus einer 4 ml Übernachtskultur wurde das Pellet in 200 µl Lösung A resuspendiert. Erst nach Zugabe von 50 µl Lysozym (5 mg / ml) und einer anschließenden Inkubation von 10 Minuten bei 37 °C erfolgte die alkalische Lyse durch Zugabe von 200 µl Lösung B. Hierbei bewirkt Lysozym die Spaltung der β-1,4-glycosidische Bindung zwischen N-Acetyl-D-muraminsäure und 2-Acetylamino-2-desoxy-D-glucose in den Zuckerketten des Peptidoglycangerüsts des bakteriellen Mureinsacculus. Alle weiteren Schritte wurden gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

II.6.13 Maxi Präparation von Plasmiden aus *Escherichia coli*

Maxi Präparationen aus *E. coli* wurden nach dem Herstellerhandbuch des Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt. Das Prinzip der Präparation gleicht dem der Mini Präparation. Als Ausgangsmaterial dienten jeweils 100 ml einer frischen Übernachtskultur. Die Elution erfolgte in 300 µl TE-Puffer.

II.6.14 Sequenzierung von DNA

Nach erfolgreicher Klonierung und Amplifikation der neuen Konstrukte wurden diese zur Bestätigung der entsprechenden Sequenzen mit der so genannten „Kettenabbruchmethode“ (Sanger *et al.* 1977) sequenziert.

Hierfür wurden 150 ng Plasmid DNA zu 0,5 µl Sequenzierprimer (10 µM), 2 µl BigDye und 1 µl Sequenzierpuffer (10 x) gegeben und mit H₂O_{bidest} auf 10 µl aufgefüllt. Die Sequenzierreaktionen wurden nach folgendem Programm durchgeführt:

Initiale Denaturierung	96 °C	2 min
Denaturierung	96 °C	10 sec
Annealing	55 °C	10 sec
Elongation	60 °C	4 min

Insgesamt wurden 28 Zyklen bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation wiederholt. Die Sequenzierung als solche wurde freundlicherweise vom hauseigenen Sequenzierlabor mittels Kapillarelektrophorese durchgeführt.

II.6.15 *Bacillus megaterium* Protoplastenherstellung

Ausgehend von einer einzigen *B. megaterium* Kolonie wurde eine Vorkultur inokkuliert (siehe II.4.4). Ein 1 ml Aliquot dieser Kultur wurde zur Inokkulation von 50 ml LB Medium genutzt. Die Kultur wurde bei 37 °C und 250 rpm in einem 500 ml Schikane-Kolben bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 1.0 inkubiert. Anschließend wurden die Bazillen durch Zentrifugation (2600 x g, 15 min, 4 °C) vom Kulturmedium abgetrennt und in 5 ml frisch angesetztem SMMP resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl steriler Lysozymlösung (100 µg ml⁻¹ in SMMP) wurde die Protoplastensuspension 30 min bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Protoplastenformierung kann im Lichtmikroskop verfolgt werden. Sobald ca. 80 % der stäbchenförmigen Bakterien coccoide Formen einnehmen, sollten die Protoplasten geerntet (1300 x g, 10 min, RT) werden. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet in 5 ml SMMP resuspendiert. Nach einem zweiten Waschschrift wurden die Protoplasten erneut in 5 ml SMMP resuspendiert und 750 µl steriles 87 % Glycerin (w/v) hinzugefügt.

Die frisch hergestellten Protoplasten wurden entweder direkt zur Transformation genutzt oder in 500 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zu 2 Monate gelagert. Zur Kontrolle der Vitalität der hergestellten Protoplasten Charge wurde ein 500 µl Aliquot mit 2,5 ml cR5 Top Agar (42 °C) gemischt und auf eine LB Agar Platte ohne Antibiotikum ausgestrichen. Nach einer Übernacht-Inkubation bei 30 °C im Brutschrank sollte ein dichter Rasen von *B. megaterium* sichtbar sein.

II.6.16 Protoplastentransformation

Zur Transformation der Protoplasten wurden 5 bis 10 µg Plasmid-DNA mit 10 µl SMMP gemischt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Ein 500 µl Aliquot der Protoplasten Suspension wurde mit der DNA vermischt und zu 1,5 ml PEG P Lösung gegeben. Nach einer Inkubation von 2 min bei RT wurden 5 ml SMMP hinzu gegeben und die Reaktionsmischung vorsichtig geschwenkt. Die Protoplasten wurden durch Zentrifugation geerntet (1300 x g, 10 min, RT), vorsichtig in 500 µl SMMP resuspendiert und 45 min bei 30 °C ohne Schütteln, gefolgt von weiteren 45 min bei 300 rpm und 30 °C inkubiert. Die regenerierten Protoplasten wurden anschließend zügig mit 2,5 ml cR5 Top Agar (42 °C) gemischt und auf eine vorgewärmte LB Tetracyclin Agar Platte (10 µg / ml Tetracyclin) gegeben. Zum Verteilen des cR5 Top Agar wurde die Platte lediglich geschwenkt. Der Ausplattierungsschritt muss sehr zügig vor Erstarren des Agar erfolgen. Weitere Inkubation erfolgte bis maximal 24 Stunden bei 30 °C. In dieser Zeit sichtbare Kolonien wurden auf eine neue LB Tetracyclin Agar Platte ausgestrichen und mittels colony PCR (siehe II.6.10) auf Vorhandensein des Transgen überprüft. Von positiven Klonen wurden je 2 ml LB Tetracyclin angeimpft und nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 230 rpm zwei Glyzerinstocks angefertigt (siehe II.4.6).

II.7 PRODUKTION REKOMBINANTER PROTEINE

II.7.1 Expression rekombinanter Proteine in *Bacillus megaterium*

Plasmidtragende Kolonien wurden auf eine frische LB Tetracyclin Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Ausgehend von einer einzelnen Kolonie wurde eine Flüssig-Vorkultur angeimpft und bei 37 °C kultiviert (siehe II.4.4). Zur Expression wurden zwischen 10 und 1000 ml LB Medium (in Schikane-Kolben) mit 10 µg ml⁻¹ Tetracyclin versetzt und die Hauptkultur im Verhältnis 1:100 aus der Vorkultur angeimpft. Kulturen wurden bei 30 °C bzw. 37 °C und 230 rpm bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,3 bis 0,5 inkubiert und die Protein Expression durch Zugabe von 1 % (w/v) Xylose zum Medium induziert. Zur Messung der optischen Dichte bei 600 nm und Analyse der intra- und extrazellulären Fraktionen auf einem SDS Polyacrylamid Gel wurde zu verschiedenen Zeitpunkten 2 ml Medium entnommen. Nach Messung der optischen Dichte wurden die Proben für 3 min und 14000 x g bei 4 °C abzentrifugiert und die Pellets bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Der geklärte Überstand (zellfreies Kulturmedium) wurde bis zur Analyse der extrazellulären Proteinfraction bei 4 °C gelagert. Als Negativkontrollen diente *B. megaterium* MS941, welcher den Leervektor pSTREPHIS1525 bzw. pC-HIS1622 trug.

II.7.1.1 Analyse der intrazellulären Proteinfraction

Zur Analyse der intrazellulären Proteinfraction wurden die bei -20 °C gelagerten Pellets in 50 µl H₂O_{bidest} und 50 µl 2x SDS Ladepuffer resuspendiert und 7 min bei 95 °C aufgekocht. Nach 5 min Zentrifugation bei 14000 x g wurden 25 µl der vorbereiteten Probe auf ein SDS Polyacrylamid Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe II.7.6).

II.7.1.2 Analyse der extrazellulären Proteinfraktion

Proteine aus dem zellfreien Kulturmedium wurden zur weiteren Analyse aus dem Medium mittels eiskalter Acetonfällung präzipitiert. Hierzu wurden 2 ml Kulturmedium mit 8 ml eiskaltem Aceton vermischt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Präzipitierte Proteine wurden durch Zentrifugation (2600 x g, 10 min, 4 °C) gesammelt, bei 37 °C für 10 min getrocknet und anschließend mit 500 µl H₂O_{bidest} gewaschen. Zur Analyse der extrazellulären Proteinfraktion wurde das Proteinpellet in 50 µl 2x SDS Ladepuffer resuspendiert und 7 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 14000 x g wurden 15 µl auf ein SDS Polyacrylamid Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe II.7.6).

II.7.2 Aufreinigung von intrazellulären Proteinen aus *B. megaterium*

Zur Aufreinigung der intrazellulär produzierten Fusionsproteine wurden 1000 ml Kultur durch Zentrifugation (2600 x g, 15 min, 4 °C) geerntet, in 100 ml PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert.

II.7.2.1 Native Ni-NTA Affinitätschromatographie

Zur Minimierung der enzymatischen Aktivität zellulärer Proteasen wurden alle folgenden Schritte bei 4 °C durchgeführt. Das geerntete Pellet wurde in 2 ml pro g_{Pellet} Lysepuffer resuspendiert und mit 1x Proteaseinhibitor (*complete* EDTA-free) versetzt. Der Aufschluss erfolgte enzymatisch durch Zugabe von Lysozym in einer Endkonzentration von 1 mg ml⁻¹. Zur Degradation von Nucleinsäuren wurden 5 U ml⁻¹ Benzonase eingesetzt. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Rohlysat 5 mal für 60 sec (75 % Intensität, Stufe 5) sonifiziert. Zwischen jeder Sonifikation wurde das Rohlysat min. 30 sec auf Eis abgekühlt. Zur Abtrennung von zellulären Bestandteilen wurde das Rohlysat 30 min bei 75000 x g und 4 °C zentrifugiert.

Zur Aufreinigung wurden 0,5 ml Ni-NTA Agarose mit 5 Volumen Lysepuffer äquilibriert und das Rohlysat zusammen mit der äquilibrierten Ni-NTA Agarose in einem 50 ml Falcon für 60 min bei 4 °C geschwenkt. Anschließend wurde das Ni-NTA-Rohlysat Gemisch in eine Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Nach dreimaliger Zugabe von 5 V Waschpuffer wurde das Protein zu je 0,5 ml in Elutionspuffer eluiert. Zu folgenden Zeitpunkten wurden je 50 µl Proben entnommen:

1. Rohlysat: nach Aufschluss
2. Durchflussfraktion
3. Waschfraktion 1 bis 3
4. alle Fraktionen der Elution

Probe 1 wurde 5 min bei 14000 x g zentrifugiert, das Pellet in 50 µl 2x SDS Ladepuffer und 50 µl H₂O_{bidest} resuspendiert und der Überstand mit 50 µl 2x SDS Ladepuffer versetzt. Die Proben 2-4 wurden ebenfalls mit 50 µl 2x SDS Ladepuffer versetzt und bis zur Auftragung auf ein SDS Polyacrylamid Gel bei -20 °C gelagert.

II.7.2.2 Denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie

Die Pellets wurden in 2 ml pro g_{Pellet} Bindepuffer B resuspendiert und 5 Mal für 60 sec (75 % Intensität, Stufe 5) sonifiziert. Nach 12 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Rohlysat für 30 min bei 75000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Aufreinigung erfolgte wie unter II.7.2.1 beschrieben. Verwendet wurden die denaturierenden Puffer Waschpuffer C und Elutionspuffer D verwendet.

II.7.2.3 *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie

Der *Strep*-tag II ist ein kleines 8 Aminosäure langes Peptid (WSHPQFEK), welches hoch selektiv an *Strep*-tactin bindet. Da für die Aufreinigung über *Strep*-Tactin der gleiche Lysepuffer, wie bei der Ni-NTA Affinitätschromatographie verwendet werden kann, ist es möglich, hochgradig reine Proteine durch eine „Two-step Purification“ Prozedur zu erhalten. Hierzu wird das Rohlysat zuerst wie in II.7.2.1 beschrieben über Ni-NTA Agarose aufgereinigt und die gepoolten Eluatfraktionen anschließend mittels *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Bindung von *Strep*-tag II an *Strep*-Tactin erfolgt bei pH 8. Zur Elution kompetiert Desthiobiotin mit dem *Strep*-tag II der rekombinanten Fusionsproteine um freie Bindungsstellen und verdrängt diese somit. Desthiobiotin ist ein stabiles, reversibel bindendes Analogon zu Biotin, welches der natürliche Ligand von Streptavidin ist.

Zur Aufreinigung wurden die Pellets in 1 ml pro g_{Pellet} Lysepuffer resuspendiert und mit 1x Proteaseinhibitor (*complete* EDTA-free) versetzt. Nach Zugabe von 5 U ml⁻¹ Benzonase und 5 mg ml⁻¹ Lysozym wurde die Suspension für 30 min bei 4 °C inkubiert. Das Rohlysat wurde zum vollständigen Aufschluss 5 Mal für 60 sec (75 % Intensität, Stufe 5) sonifiziert und anschließend für 30 min bei 75000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Bindung der rekombinanten Fusionsproteine an *Strep*-Tactin erfolgte im Batchverfahren für 60 min bei 4 °C in einem 50 ml Falcon. Nach Überführung der *Strep*-Tactin-Rohlysat Lösung auf eine Säule wurde der Durchfluss aufgefangen, die Matrix zwei Mal mit 4 ml *Strep*-Waschpuffer gewaschen und in 0,5 ml Schritten mit *Strep*-Elutionspuffer eluiert. Von jedem Aufreinigungsschritt wurden Proben wie unter II.7.2.1 beschrieben entnommen und auf ein SDS Polyacrylamid Gel geladen.

II.7.3 Aufreinigung der extrazellulären Fusionsproteine

Nach Abtrennen der Zellen aus einer 1000 ml Expressionskultur (10000 x g, 30 min, 4 °C) wurde das gesamte Kulturmedium steril filtriert (\varnothing 0,45 μm) und die rekombinanten Proteine zur weiteren Aufreinigung mittels Ammoniumsulfatfällung einkonzentriert.

II.7.3.1 Ammoniumsulfatfällung: Konzentrierung von sekretierten Proteinen

Die äußerst schonende Fällung von Proteinen mittels Ammoniumsulfat bietet im Vergleich zu Aceton- oder Trichloressigsäure einige Vorteile. Zum Einen ist es möglich, die native Proteinstruktur zu erhalten. Zum Anderen ist die Möglichkeit einer fraktionierten Fällung gegeben.

Jedes Protein präzipitiert bei einer anderen Ammoniumsulfat Sättigung einer Lösung. Durch Bestimmung der spezifischen Sättigung ist es möglich unerwünschte Proteine, solche die unter- und oberhalb der ermittelten Konzentration präzipitieren, abzutrennen. Dies erleichtert in der Regel die weitere Proteinaufreinigung. In einem Vorversuch wurde die für das aufzureinigende Protein kritische Ammoniumsulfat Sättigung ermittelt. Diese entspricht dem Sättigungsgrad, ab der ein Protein präzipitiert. Hierzu wurden 100 ml des Kulturmediums entnommen und über einen Zeitraum von ca. 30 min 11,3 g gemörsertes Ammoniumsulfat (entspricht einer Sättigung von 20 %) unter ständigem Rühren bei 4 °C hinzu gegeben. Präzipitierte Proteine wurden 10 min bei 16300 x g und 4 °C abzentrifugiert und in 250 µl Lysepuffer aufgenommen. Der Überstand wurde daraufhin nach Angaben von Tabelle 6 auf eine Sättigung von 30 % eingestellt. Diese Schritte wurden bis zu einer Sättigung von 80 % wiederholt. Von allen Proteinfractionen wurden je 50 µl Proben entnommen, diese mit 50 µl 2x SDS Ladepuffer versetzt und auf einem SDS Polyacrylamid Gel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe II.7.6). Nach Ermittlung der für das rekombinante Protein kritischen Ammoniumsulfat Sättigung wurde dem Kulturmedium gemäß Tabelle 6 die entsprechende Menge Ammoniumsulfat hinzugefügt, sodass die Lösung 10 % unterhalb der ermittelten kritischen Sättigung lag. An dieser Stelle präzipitierte Proteine wurden verworfen und der Überstand auf die kritische Sättigung eingestellt. Nach Resuspendierung der präzipitierten Proteine in 4 ml Lysepuffer wurden die sekretierten Proteine rein rechnerisch 250-fach einkonzentriert. Zur Entfernung des verbleibenden Ammoniumsulfats wurden die Proben über Nacht bei 4 °C gegen nativen Lysepuffer dialysiert.

Anfangs-sättigung %	Finale zu erreichende Sättigung (in %)																	
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
	Hinzu zu gebende Menge von Ammoniumsulfat in g pro L Lösung (bei 20 °C)																	
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761	
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723	
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685	
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647	
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609	
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571	
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533	
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495	
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457	
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419	
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381	
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343	
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305	
65										0	34	69	105	143	183	224	267	
70											0	34	70	107	146	186	228	
75												0	35	72	110	149	190	
80													0	36	73	112	152	
85														0	37	75	114	
90															0	37	76	
95																0	38	

Tabelle 2.7: Tabelle zur Ermittlung der benötigten (NH₄)₂SO₄-Menge (in g pro l) zur Erhöhung der Konzentration ausgehend von einem Anfangswert (links) zu einem gewünschten Endwert (oben).

II.7.3.2 Dialyse

Proteinlösungen wurden zum Entfernen von Ammoniumsulfat (siehe II.7.3.1) oder Harnstoff (siehe II.7.2.2) in einem 10 Liter Becherglas gegen Lysepuffer oder PBS dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch (MWCO: 5 kDa) für 20 min in Lysepuffer oder PBS getaucht und die untere Öffnung mit einer Schlauchklemme verschlossen. Der Dialyseschlauch wurde zu maximal 1/3 gefüllt, um ein Platzen in Folge einer größeren Volumenzunahme zu verhindern, das obere Ende ebenfalls verschlossen und an einen Schwimmer angebracht. Die Dialyse fand 24 Stunden bei 4 °C unter leichtem Rühren statt.

Die Aufreinigung der mit Ammoniumsulfat gefällten (siehe II.7.3.1) und gegen Lysepuffer dialysierten Proteine (siehe II.7.3.2) wurde wie unter II.7.2.1 beschrieben durchgeführt.

II.7.4 Expression von HERV-K TM in *Hansenula polymorpha*

Ausgehend von einer einzelnen Kolonie wurde eine Flüssigvorkultur (100 ml YPD Medium) angeimpft und bei 37 °C 12 bis 16 Stunden bei 180 rpm inkubiert. Zur Inokkulation einer Expressionskultur wurden 500 bis 2000 ml YPM Medium (Expressionsmedium) mit der Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 2 eingestellt und weitere 24 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Zur visuellen Kontrolle auf bakterielle Kontaminationen wurde vor Induktion und nach 24 stündiger Inkubation ein kleines Volumen des Kulturmediums mit Hilfe eines Lichtmikroskops untersucht. Als Negativkontrolle der Proteinexpression wurde parallel zur Hauptkultur ein Kolben mit 10 ml nicht-induzierter Kultur inkubiert. Für die weitere Analyse der intra- und extrazellulären Proteinfraction wurde eine 3 ml Probe entnommen und die optische Dichte gemessen. Nach Zentrifugation für 3 min und 14000 x g bei 4 °C wurde das Pellet bei – 20°C und der zellfreie Überstand bei 4 °C gelagert. Die Analyse der intra- und extrazellulären Proteinfraction erfolgte genau, wie unter II.7.1.1 bzw. II.7.1.2 für die bakteriellen Fraktionen beschrieben.

II.7.5 Denaturierende Aufreinigung von HERV-K TM aus *Hansenula polymorpha*

Zur Aufreinigung von HERV-K TM aus *H. polymorpha* wurden 1000 ml Kulturen durch Zentrifugation (30 min, 6000 x g, 4 °C) geerntet und in Sorbitolpuffer gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml pro g Zellpellet (Feuchtgewicht) Zymolyasepuffer und 5 U ml⁻¹ Benzonase wurde die Suspension 1 h bei 37 °C inkubiert und für 15 min bei 4000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 Volumen Sorbitolpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml pro g_{Pellet} Bindepuffer B resuspendiert, mit 1 Volumen Glaskugeln (Ø 0,5 mm) versetzt und 8 Mal für 30 sec stark gevortext. Nach 12 stündiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler wurde das Rohlysate 20 min bei 75000 x g und 16 °C abzentrifugiert.

Zur Aufreinigung von HERV-K TM aus dem Rohlysate wurden 0,5 ml Ni-NTA Agarose mit 5 Volumen Bindepuffer B äquilibriert und anschließend das Rohlysate mit der Ni-NTA Agarose für 60 min bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert. Nach erfolgter Bindung wurde das Ni-NTA-Rohlysate Gemisch auf eine Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Nach dreimaligem

Waschen mit 5 Volumen Waschpuffer C wurden die Proteine in 0,5 ml Fraktionen in Elutionspuffer D eluiert.

Während des Zellaufschlusses sowie der Affinitätschromatographie wurden Proben (50 µl) entnommen:

1. nach Lyse durch Zymolyase
2. nach mechanischem Aufschluss durch Glaskugeln
3. Rohlysat: nach 12 stündiger Inkubation
4. Durchflussfraktion
5. Waschfraktion 1 bis 3
6. alle Elutionsfraktionen

Nach Zentrifugation der Proben 1 bis 3 für 5 min bei 14000 x g wurde jeweils das Pellet in 50 µl 2x SDS Ladepuffer resuspendiert und der Überstand mit 50 µl 2x SDS Ladepuffer versetzt. Die Proben 4 bis 6 wurden ebenfalls mit 50 µl 2x SDS Ladepuffer versetzt und bis zur Analyse durch ein SDS Polyacrylamid Gel bei -20 °C gelagert.

II.7.6 Diskontinuierliche SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die SDS PAGE (Laemmli, 1970) mit Modifikationen nach Schlägger & von Jagow (1987) als diskontinuierliche SDS PAGE durchgeführt. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proben 7 min bei 95 °C in 2x SDS Ladepuffer aufgeköcht und 5 min bei 14000 x g zentrifugiert. Die Polyacrylamid Konzentration eines Gels wurde entsprechend der aufzutrennenden Proteingröße gewählt und betrug zwischen 12 und 15 % (v/v). Proben wurden auf das vorbereitete SDS Polyacrylamid Gel geladen und einer Stromstärke von 30 mA bis zum Austritt aus dem Sammelgel ausgesetzt. Bei Eintritt der Proben in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 60 mA erhöht, bis die gut sichtbare blaue Lauffront (Bromphenolblau) aus dem Gel heraustrat. Während der Gelelektrophorese werden die denaturierten Proteine, welche aufgrund der Maskierung durch Natriumdodecylsulfat (SDS) negativ geladen sind, zuerst durch einen Feldstärkegradienten im Sammelgel fokussiert und anschließend im Trenngel nach ihrem relativen Molekulargewicht aufgetrennt. Als Größenstandard wurden 7 µl PageRuler Prestained Protein Ladder aufgetragen.

Zur Visualisierung der Proteine wurden die Gele 20 min in Coomassie Brilliant Blue G250 geschwenkt und mehrere Stunden in Entfärbelösung entfärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele mit dem Gel Doc 2000 fotografiert und anschließend in Cellophanfolie getrocknet. Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurden Western Blot Analysen (siehe II.7.7) durchgeführt.

II.7.7 Western Blot / ECL-Detektion

Mit Hilfe der Western Blot Analysen lassen sich aufgetrennte Proteine hoch spezifisch mittels Antikörper nachweisen. In einem ersten Schritt bindet ein spezifischer Primär-Antikörper an das nachzuweisende Protein. Im zweiten Schritt bindet der Sekundär-Antikörper über seine Fab-Region (fragment antigen binding) an die Fc-Region (fragment crystalizing) des Primär-Antikörpers und bringt somit das Enzym Peroxidase, mit welchem der Sekundär-Antikörper konjugiert ist, in räumliche Nähe des zu detektierenden Proteins. Mittels ECL-Detektion (enhanced chemiluminescence) können diese nun auf einem lichtsensitiven Film sichtbar gemacht werden. Die Entwicklung der CL-XPosure Filme erfolgte in der Dunkelkammer mit dem Curix 60.

Nach erfolgter SDS PAGE wurden die Trenngele für 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Immobilon Transfer Membran (Porengröße 0,2 μm) wurde durch kurzes Schwenken in Methanol aktiviert und ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Zum Blotten wurde ein „Blotsandwich“ bestehend aus einem in Transferpuffer angefeuchteten Blotpapier, der Transfer Membran, dem Trenngel und einem weiteren Blotpapier in die Semi Dry Blotkammer gelegt und bei 20 V für 20 min geblottet. Zur Absättigung aller freien Bindungsstellen der Transfer Membran wurde diese für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer geschwenkt. Die Transfermembran wurde anschließend in frischem Blockierungspuffer für 90 min mit einem spezifischen Primär-Antikörper inkubiert und 3 mal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Nach 60 min Inkubation der Membran mit einem Sekundär-Antikörper, wurde diese wieder 3 Mal für 10 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend mittels ECL-Detektion untersucht.

II.7.8 BCA Test: Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Der BCA Test basiert auf der Bildung eines stabilen violetten Kupfer-Komplexes. In Gegenwart von Proteinen wird Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert. Im alkalischen Milieu bildet sich aus Bicinchoninsäure und den Cu^+ -Ionen der typisch violett gefärbte $[\text{Cu}(\text{BCA})_2]^+$ -Komplex, dessen Absorption bei 562 nm über einen große Bereich zur Proteinkonzentration proportional ist. Die Reduktion von Kupfer wird dabei durch die Peptidbindungen und durch oxidierbare Aminosäuren wie z.B. Tyrosin, Tryptophan oder Cystein verursacht.

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das BCA Protein Assay Kit verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

II.7.9 Eiskalte Aceton-Methanol Fällung

Eine Möglichkeit zur Konzentrierung von Proteinen oder zur Entfernung Methanol- oder Aceton-löslicher Substanzen (z.B. SDS) ist die sogenannte eiskalte Aceton-Methanol Fällung. Das zu fällende Protein wurde mit vier Volumen Aceton-Methanol-Lösung (1:1 und 1 mM HCl) versetzt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 10000 x g und 4 °C wurde das Pellet luftgetrocknet und anschließend in PBS resuspendiert.

II.7.10 IL-10 spezifischer ELISA

Zur Untersuchung der IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach 24 stündiger Inkubation mit retroviralen Hüllproteinen (in dieser Arbeit HERV-K TM) wurde das *OptEIA™ Human IL-10 Set* (BD Biosciences) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde rekombinantes humanes IL-10 in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und die IL-10 Konzentration im Überstand anhand der Kalibriergeraden bestimmt.

III ERGEBNISSE

III.1 HETEROLOGE EXPRESSION IN *BACILLUS MEGATERIUM*

Hauptziel dieser Diplomarbeit war die Etablierung eines Endotoxin-freien Expressionssystems für die Produktion von HIV-1 gp41 abgeleiteter Proteine zur Analyse ihrer Funktion bei der Immunpathogenese. Hierfür sollten verschiedene Konstrukte in *B. megaterium* Protoplasten eingebracht und produziert werden. Zur Kostensenkung wurde ein Protokoll zur Herstellung kompetenter Protoplasten optimiert und standardisiert verwendet. Dieses Expressionssystem wurde zum ersten Mal in der Arbeitsgruppe angewendet, deshalb war es erforderlich, allgemeine Prozessparameter und optimale Kultivierungsbedingungen für die Produktion der rekombinanten Proteine zu ermitteln. Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Übersicht über die grundsätzliche Strategie zur Verfolgung dieser Ziele.

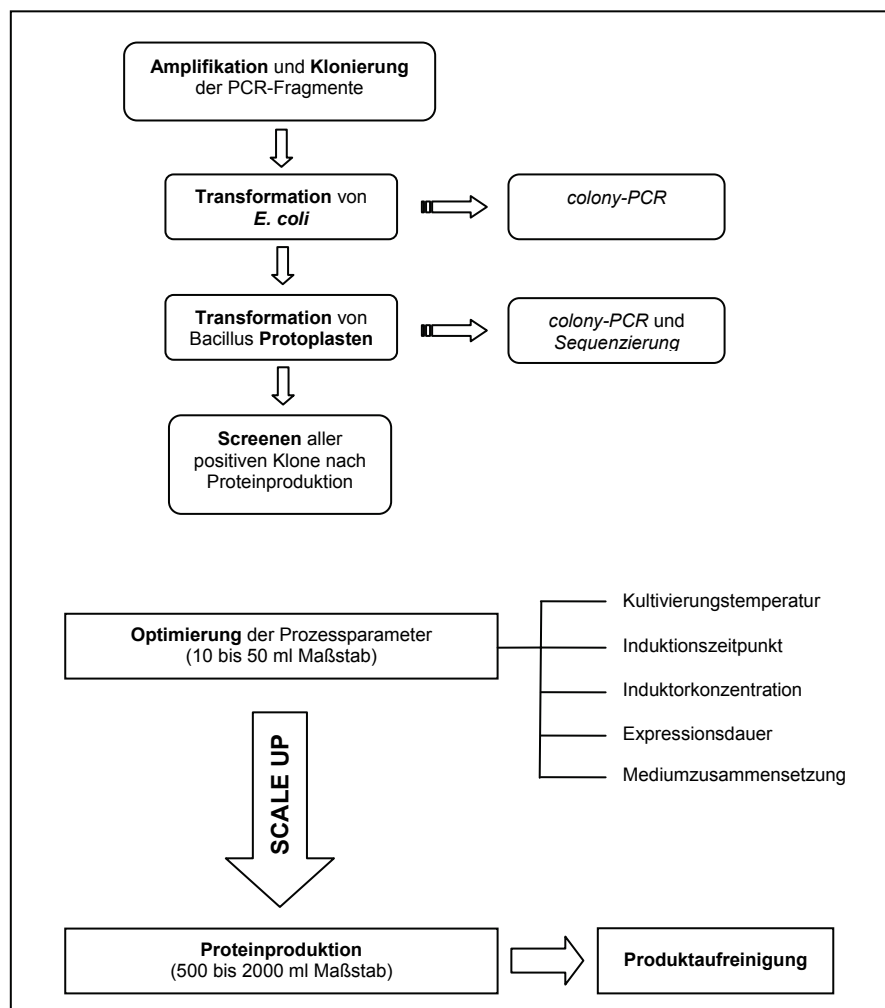


Abb. 3.1: Übersicht der allgemeinen Strategie zur Etablierung des *B. megaterium* Expressionssystems.

III.1.1 Konstruktion und Amplifikation der gp41 Verkürzungsmutanten

Um rekombinante Proteine für Untersuchungen der immunsuppressiven Eigenschaften des transmembranen Protein gp41 von HIV-1 zu gewinnen, wurden zwölf verschiedene gp41 Fragmente ausgewählt (Abb. 3.2) und mittels PCR amplifiziert. Hierbei enthielten die Fragmente *plusNHR*, Δ *NHR*, Δ *NHRloopCHR* Δ und *rgp*, sowie die entsprechenden Fragmente mit C-terminalen Lysinen die immunsuppressive Domäne. Die Fragmente *CHR*, *CHR 4K*, *CHR* Δ und *CHR* Δ *4K* hingegen beginnen unmittelbar in der C-terminalen Helix Region und enthalten somit nicht die Isu-Domäne. *CHR* Δ und *CHR* Δ *4K* stellen C-terminal verkürzte Versionen der Fragmente *CHR* und *CHR 4K* dar. *plusNHR* enthält die gesamte NHR mit der Isu-Domäne, während Δ *NHR* eine N-terminal verkürzte Variante von *plusNHR* darstellt. Das Fragment *rgp* beinhaltet den gesamten Bereich von NHR bis *CHR* aus gp41. Δ *NHRloopCHR* Δ ist eine N-, sowie C-terminal verkürzte Version von *rgp*. Des Weiteren wurden 4K-Fragmente hergestellt, welche an ihren C-terminalen Enden jeweils vier Lysine tragen. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass vier C-terminal angefügte Lysine die Löslichkeit der gp41 Konstrukte deutlich erhöhen konnten.

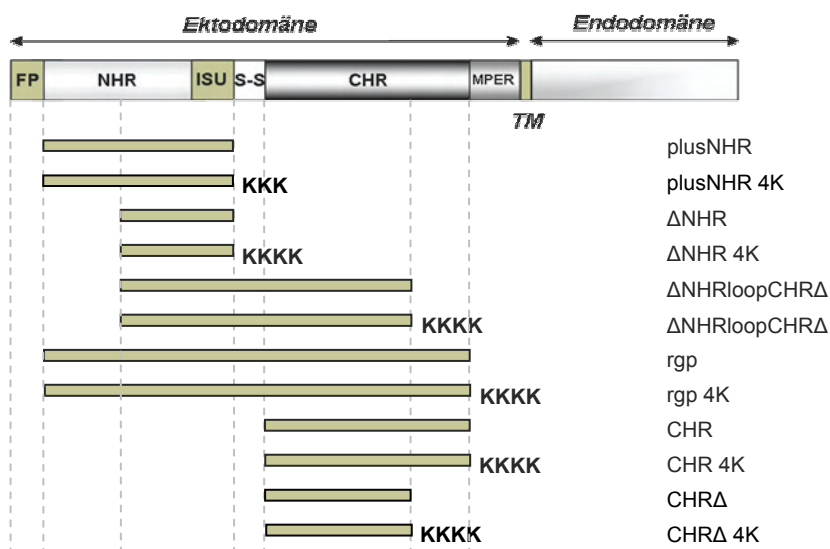


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der von gp41 abgeleiteten Konstrukte. Die Konstrukte *plusNHR*, Δ *NHR*, Δ *NHRloopCHR* Δ und *rgp*, sowie *plusNHR 4K*, Δ *NHR 4K*, Δ *NHRloopCHR* Δ *4K* und *rgp 4K* enthalten alle die Isu-Domäne. Die Konstrukte *CHR* und *CHR* Δ , sowie deren 4K Versionen enthalten lediglich die *CHR*.

Die Amplifikation der ausgewählten Fragmente erfolgte wie unter II.6.2 beschrieben mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR). Die Fragmente *plusNHR*, *plusNHR 4K*, Δ *NHR*, Δ *NHR 4K*, Δ *NHRloopCHR* Δ , Δ *NHRloopCHR* Δ *4K*, *rgp*, *rgp 4K*, *CHR* und *CHR 4K* konnten erfolgreich mittels PCR amplifiziert werden (Abb. 3.3). Die Fragmente *CHR* Δ und *CHR* Δ *4K* konnten auch nach Optimierung der *annealing* Temperatur mittels Gradienten-PCR und anschließendem Vereinen mehrerer Reaktionen nicht auf dem Agarose Gel detektiert werden. Tabelle 3.1 stellt die für die Amplifikation wichtigsten Parameter und die für jedes Fragment verwendeten *primer* Paare dar.

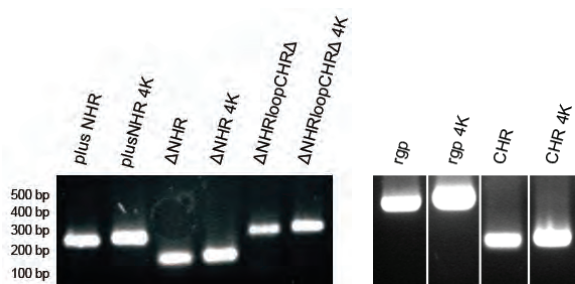


Abb. 3.3: 1,2 %-ige Agarose Gele der erfolgreich mittels PCR amplifizierten, von HIV-1 gp41 abgeleiteten Fragmente.

Die Fragmente wurden entsprechend ihrer molekularen Masse mittels Agarose Gelelektrophorese (II.6.3) aufgetrennt und anschließend aus dem Agarose Gel extrahiert (II.6.4).

Fragment	Abkürzung	Primerpaar	Annealing Temperatur	Größe PCR Produkt
plusNHR	SB 1	Bac_1_for / Bac_1_rev	52 °C	239 bp
plusNHR 4K	SB 2	Bac_1_for / Bac_2_rev	52 °C	251 bp
ΔNHR	SB 3	Bac_2_for / Bac_1_rev	54 °C	155 bp
ΔNHR 4K	SB 4	Bac_2_for / Bac_2_rev	54 °C	167 bp
ΔNHRloopCHRΔ	SB 5	Bac_2_for / Bac_3_rev	52 °C	293 bp
ΔNHRloopCHRΔ 4K	SB 6	Bac_2_for / Bac_4_rev	52 °C	305 bp
rgp	SB 7	Bac_3_for / Bac_5_rev	52 °C	458 bp
rgp 4K	SB 8	Bac_3_for / Bac_6_rev	52 °C	470 bp
CHR	SB 9	Bac_4_for / Bac_5_rev	47 °C	236 bp
CHR 4K	SB 10	Bac_4_for / Bac_6_rev	47 °C	248 bp
CHRΔ	SB 11	Bac_4_for / Bac_3_rev	49 °C	122 bp
CHRΔ 4K	SB 12	Bac_4_for / Bac_4_rev	49 °C	134 bp

Tabelle 3.1: Übersicht über die hergestellten gp41 Fragmente. Zur vereinfachten Nomenklatur wurden die hergestellten Fragmente von eins bis zwölf durchnummeriert. Die Annealing Temperaturen wurden für jedes Konstrukt entsprechend der Schmelztemperaturen der einzelnen primer ausgewählt (II.3.3). Die Fragmente CHRΔ und CHRΔ 4K (grau unterlegt) konnten nicht amplifiziert werden.

III.1.2 Codon-Optimierung der Sequenz von ΔNHR 4K

Zur Steigerung der Transkriptionseffizienz des Konstruktes *StreptII*-ΔNHR 4K-His, wurde eine Codonoptimierung auf DNA-Ebene für die verbesserte Expression in *B. megaterium* MS941 mit Hilfe des Programms GeneOptimizer[®] vorgenommen. Der CAI (*codon adaption index*) ist ein Maß für die Anpassung einer gegebenen Sequenz an die optimale „*codon usage*“ eines Referenzorganismus, wobei der Index zwischen 0 und 1 variieren kann und 1 die ausschließliche Nutzung optimaler Codons bedeutet. Vor Optimierung betrug der CAI (*codon adaption index*) von ΔNHR 4K 0,49. Nach Anpassung der Nukleotidsequenz wurde ein CAI von 0,96 erreicht. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass keine ungewollten internen TATA-Boxen, Chi-Sequenzen oder Ribosomenbindungsstellen entstehen. Außerdem wurden der G/C Gehalt von 51 % auf 32 % gesenkt und zur weiteren Klonierung die Restriktionsschnittstellen *Sac* I und *Sph* I eingefügt. Eine abschließende Sequenzoptimierung und die Synthese des optimierten Gens wurden von der Firma Geneart (Regensburg) durchgeführt.

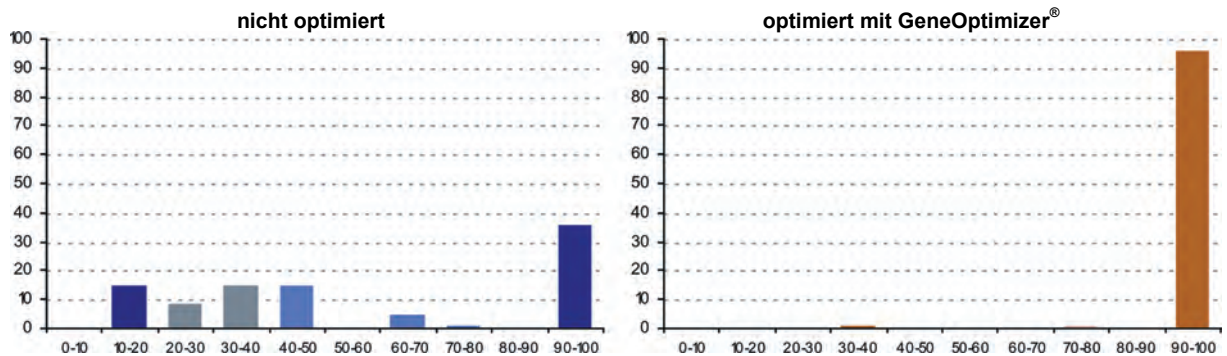


Abb. 3.4: Codon Qualitätsverteilung. Die beiden Histogramme zeigen die prozentuale Verteilung der Codons, welche in eine definierte „Qualitätsklasse“ fallen. Der Wert des meist genutzten Codons für eine bestimmte Aminosäure im gewünschten Expressionssystem entspricht 100 (Abzisse). Die übrigen Codons wurden entsprechend ihrer „Qualität“ auf die restlichen Klassen verteilt. Die Ordinate gibt die Anzahl der Codons an, welche in eine definierte Qualitätsklasse eingeteilt werden konnten (Sharp 1987).

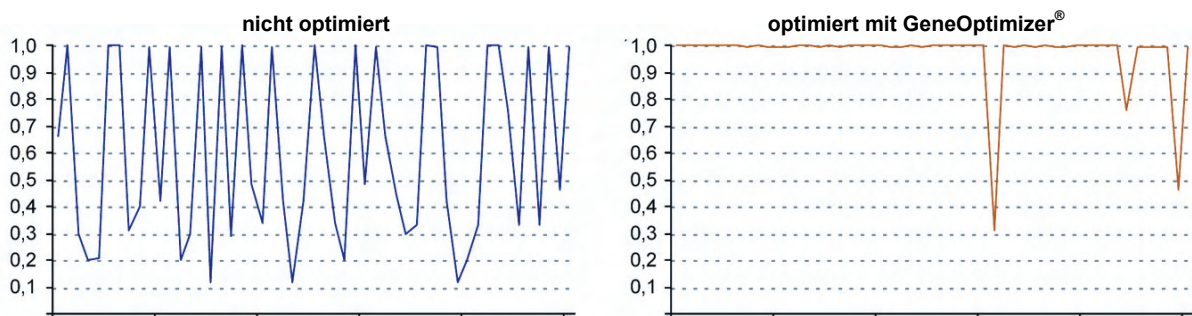


Abb. 3.5: Codon Qualitäts Plot. Die Diagramme zeigen die Qualität der genutzten Codons an der angezeigten Position. Hierbei gibt die Ordinate den CAI und die Abzisse die Position des Codons an.

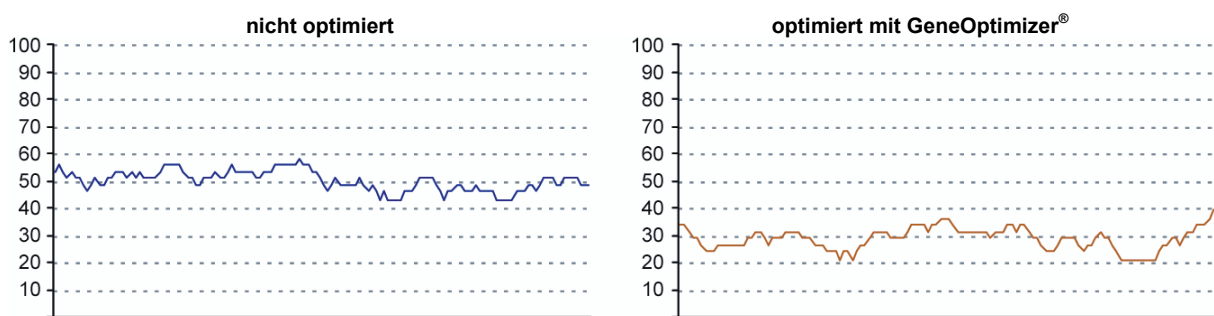


Abb. 3.6: GC-Gehalt von Δ NHR 4K.

III.1.3 Klonierung der gp41 Verkürzungsmutanten in pSTREP-HIS1525 und pC-HIS1622

Die aufgereinigten Fragmente plusNHR, Δ NHR, Δ NHR 4K, Δ NHRloopCHRA, Δ NHRloopCHRA 4K, rgp, rgp 4K, CHRA und CHRA 4K wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Sac* I und *Sph* I in einem Doppelverdau restringiert (II.6.6) und in den Vektor pSTREP-HIS1525 (II.3.2) kloniert. Für eine erfolgreiche Ligation mussten insgesamt 200 ng Vektor mit *insert* in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt werden. *E. coli* Zellen wurden anschließend mit Hilfe der Rubidiumchlorid-Methode bzw. mittels Elektroporation transformiert (Tab. 3.2).

Vektor [ng]	Molares Verhältnis Vektor : Fragment	Transformationsmethode	Positive Klone
30	1 : 3	Rubidiumchlorid	-
30	1 : 3	Elektroporation	-
30	1 : 5	Rubidiumchlorid	-
30	1 : 5	Elektroporation	-
60	1 : 3	Rubidiumchlorid	-
60	1 : 3	Elektroporation	-
60	1 : 5	Rubidiumchlorid	-
60	1 : 5	Elektroporation	-
100	1 : 3	Rubidiumchlorid	-
100	1 : 5	Elektroporation	-
200	1 : 5	Rubidiumchlorid	+

Tabelle 3.2: Vergleich verschiedener Bedingungen für die Ligation der restringierten, PCR-amplifizierten Fragmente mit dem Shuttlevektor pSTREP-HIS1525.

Insgesamt konnten alle amplifizierten Fragmente in den Expressionsvektor pSTREP-HIS1525 kloniert werden. Des Weiteren wurde das Codon-optimierte Gen für Δ NHR 4K (III.1.4) erfolgreich in die Vektoren pC-HIS1622 (II.3.2.2) und pSTREP-HIS1525 (II.3.2.1) kloniert (Tab. 3.3).

Konstrukname	Vektor	Fragment	Plasmidgröße	Proteingröße
pSB 1	pSTREP-HIS1525	plusNHR	7741 bp	15,1 kDa
pSB 2	pSTREP-HIS1525	plusNHR 4K	7753 bp	15,5 kDa
pSB 3	pSTREP-HIS1525	Δ NHR	7657 bp	12 kDa
pSB 4	pSTREP-HIS1525	Δ NHR 4K	7669 bp	12,4 kDa
pSB 4 (synth.)*	pSTREP-HIS1525	Δ NHR 4K (synth.)*	7669 bp	12,4 kDa
pSB 5	pSTREP-HIS1525	Δ NHRloopCHRA	7795 bp	17 kDa
pSB 6	pSTREP-HIS1525	Δ NHRloopCHRA 4K	7807 bp	17,4 kDa
pSB 7	pSTREP-HIS1525	rgp	7960 bp	23,1 kDa
pSB 8	pSTREP-HIS1525	rgp 4K	7972 bp	23,5 kDa
pSB 9	pSTREP-HIS1525	CHR	7738 bp	15 kDa
pSB 10	pSTREP-HIS1525	CHR 4K	7750 bp	15,4 kDa
pSB 16 (synth.)*	pC-HIS1622	Δ NHR 4K (synth.)*	6679 bp	18,7 kDa

Tabelle 3.3: Übersicht der genetischen Konstrukte zur Transformation von *B. megaterium*. Zur Vereinfachung wurden die gentechnisch hergestellten Konstrukte von 1 bis 26 durchnummeriert. (synth.)* kennzeichnet jene Konstrukte, welche anstelle des PCR-amplifizierten Δ NHR 4K das synthetische Codon-optimierte Gen tragen.

III.1.4 Optimierte Herstellung transformationskompetenter Protoplasten

Da Gram-positive Bakterien im Vergleich zu Gram-negativen einen erheblich dickeren Mureinsacculus besitzen, musste dieser zur Transformation enzymatisch mittels Lysozym abgebaut werden (Blake *et al.* 1965, Ito *et al.* 1993), sodass kompetente Protoplasten entstanden.

Zur Ermittlung der optimalen Lysozymkonzentration und Inkubationszeit wurden frische Protoplasten, wie unter II.6.15 beschrieben unter Einsatz der in Tab. 3.4 genannten Lysozymkonzentrationen und Einwirkzeit hergestellt und mit pSB4 transformiert (II.6.16). Die Effizienz der Protoplastenherstellung und –transformation wurde anschließend durch Auszählung der Transformandenzahl bestimmt. Bei Einsatz von Lysozym in einer Endkonzentration von $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ und einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C konnte die höchste Transformationseffizienz mit $31,4 \text{ cfu } \mu\text{g}^{-1}$ DNA erreicht werden (Tab. 3.4 und Abb. 3.7).

Lysozymkonzentration	Inkubationszeit	Temperatur	Transformanden	Effizienz
$2 \mu\text{g ml}^{-1}$	15 min	37°C	37	7,4
$2 \mu\text{g ml}^{-1}$	30 min	37°C	157	31,4
$2 \mu\text{g ml}^{-1}$	60 min	37°C	77	15,4
$10 \mu\text{g ml}^{-1}$	15 min	37°C	49	9,8
$10 \mu\text{g ml}^{-1}$	30 min	37°C	37	7,4
$10 \mu\text{g ml}^{-1}$	60 min	37°C	40	8
$50 \mu\text{g ml}^{-1}$	15 min	37°C	8	1,6
$50 \mu\text{g ml}^{-1}$	30 min	37°C	0	0
$50 \mu\text{g ml}^{-1}$	60 min	37°C	0	0

Tabelle 3.4: Ermittlung der optimalen Lysozymkonzentration und Inkubationszeit zur Herstellung von Protoplasten. Die Transformationseffizienz entspricht der Transformandenzahl pro μg eingesetzter DNA. In diesem Versuch wurden jeweils $5 \mu\text{g}$ aufgereinigte Plasmid-DNA von pSB4 (Tabelle 3.3) verwendet.

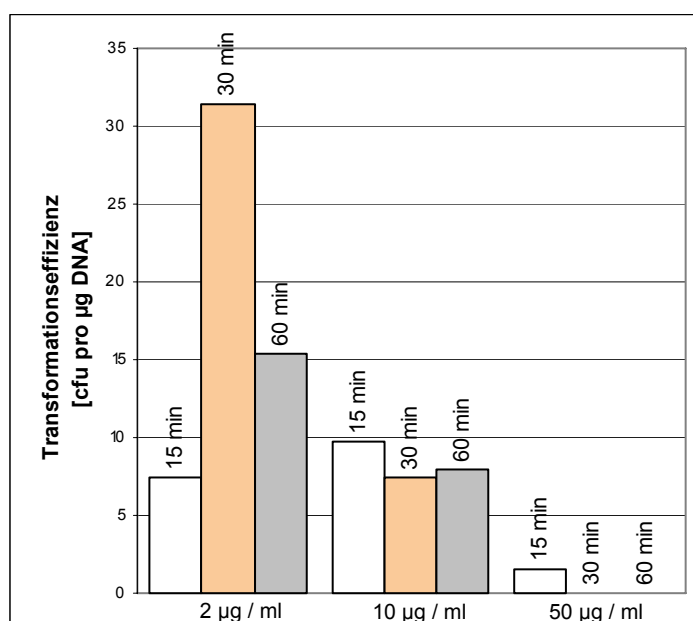


Abb. 3.7: Transformationseffizienz bei Einsatz unterschiedlicher Lysozymkonzentrationen und Inkubationszeiten. Die höchste Effizienz von $31,4 \text{ cfu pro } \mu\text{g}$ DNA wurde beim Einsatz von $2 \mu\text{g/ml}$ Lysozym und einer 30 min Inkubationszeit erreicht.

III.1.5 Transformation von *B. megaterium* MS941 mit den Isu-Konstrukten

Die hergestellten *B. megaterium* MS941 Protoplasten konnten erfolgreich mit den Konstrukten pSB1, pSB3, pSB4, pSB4*, pSB5, pSB10 und pSB16* (Tabelle 3.3) transformiert werden. Die Konstrukte pSB2, pSB6, pSB7, pSB8, pSB9, pSB11 und pSB12 konnten selbst nach mehrfachen Wiederholungen nicht in die kompetenten Protoplasten eingebracht werden. Zur Bestätigung der Transformanden wurde von jedem Klon eine *colony*-PCR (II.6.10) durchgeführt und bei positivem Ergebnis wurde die aufgereinigte DNA sequenziert (II.6.14).

III.1.6 Screenen der Klone auf Produktion der gp41 Verkürzungsmutanten

Alle erhaltenen Klone wurden nach positiver *colony*-PCR auf ihre Fähigkeit zur rekombinanten Proteinproduktion geprüft, wozu jeweils eine Testexpression in 50 ml LB-Tet Medium durchgeführt wurde. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 % (w/v) Xylose bei einer OD_{600nm} von 0,3 induziert und erfolgte für drei Stunden bei 37 °C. Danach wurde eine 2 ml Probe entnommen und die intra- (Pellet), als auch die extrazelluläre (Medium) Proteinproduktion mittels SDS-Page und Western Blot analysiert (II.7.1) (Abb. 3.8).

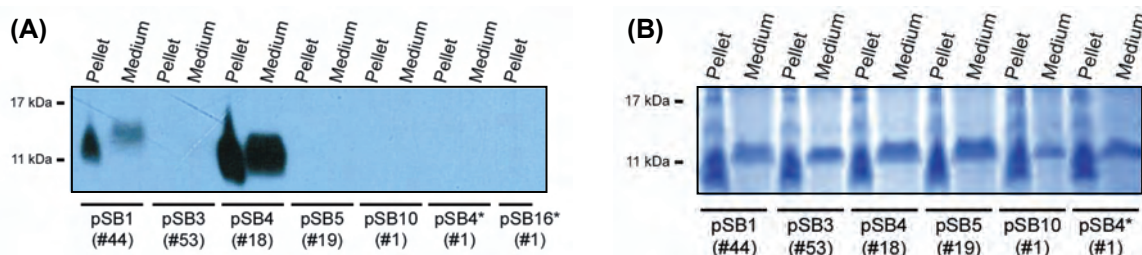


Abb. 3.8: (A) Western Blot Analyse der intra- und extrazellulären Proteinproduktion. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 45 sec Expositionszeit. **(B) Coomassie Blue gefärbtes Polyacrylamid Gel** der Testexpressionen. pSB1: *StreptII*-plusNHR-His, pSB3: *StreptII*- Δ NHR-His, pSB4: *StreptII*- Δ NHR 4K-His, pSB5: *StreptII*- Δ NHRloopCHR Δ -His, pSB10: *StreptII*-CHR 4K-His, pSB4*: synthetisches und codon-optimiertes *StreptII*- Δ NHR 4K-His. Die Konstrukte pSB1 bis pSB12 setzen sich aus dem Vektor pSTREP-HIS1525 und den angegebenen Fragmenten zusammen. pSB16*: synthetisches und codon-optimiertes Δ NHR 4K-His in pC-HIS1622.

Insgesamt konnten drei Klone identifiziert werden, welche die gp41 Verkürzungsmutanten *StreptII*-plusNHR-His (pSB1) und *StreptII*- Δ NHR 4K-His (pSB4) exprimierten und auch sekretierten. In Abbildung 3.8-A sind die Genprodukte der Klone pSB1 (#44) und pSB4 (#18) zu sehen. *StreptII*- Δ NHR 4K-His besitzt eine molare Masse von 12,4 kDa und *StreptII*-plusNHR-His 15,1 kDa. Die Expression von *StreptII*- Δ NHR 4K-His in Klon pSB4 (#24) ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Im Vergleich zu Klon pSB4 #24 konnte bei Klon #18 ein weitaus stärkeres Signal detektiert werden, was einer höheren Produktion von *StreptII*- Δ NHR 4K-His entsprach (Abb. 3.9). Auf dem mit Coomassie Blue gefärbtem Polyacrylamid Gel (Abb. 3.8-B) war in jeder Mediumspur eine deutliche Bande auf Höhe von etwa 12 kDa zu sehen. In allen anderen Spuren erschienen ebenfalls Banden auf Höhe von 11 bis 13 kDa.

Über einen Zeitraum von vier Stunden betrachtet, stieg die Produktion von *StreptII*- Δ NHR 4K-His (Klone pSB4 #18) mit zunehmender Expressionszeit an und erreichte nach vier Stunden den höchsten Wert (Abb. 3.10).

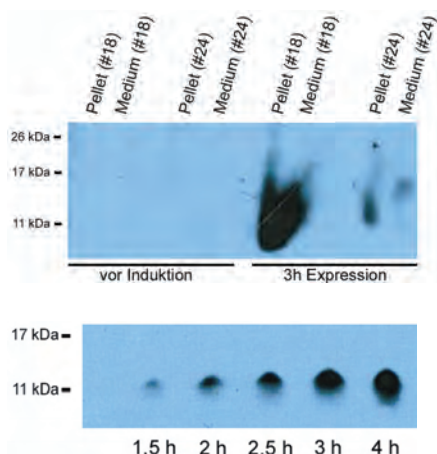


Abb. 3.9: Vergleich der Expressionstärke zwischen zwei, das gleiche Konstrukt exprimierenden Klone. Getestet wurde jeweils die intra- (Pellet), als auch extrazelluläre (Medium) Proteinproduktion der Klone pSB4 (#18) und pSB4 (#24). Beide Klone exprimierten die gp41 Verkürzungsmutante *StreptII-ΔNHR* 4K-His. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 120 sec Expositionszeit.

Abb. 3.10: Expression von *StreptII-ΔNHR* 4K-His in Klon pSB4 (#18) über einen Zeitraum von vier Stunden. Mit zunehmender Kultivierungszeit konnte eine stetige Zunahme der Signalstärke vermerkt werden. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 90 sec Expositionszeit.

III.1.7 Ermittlung der Kultivierungsbedingungen zur Produktion von *StreptII-ΔNHR* 4K-His

Zur Bestimmung des Einflusses relevanter Parameter (Temperatur, Induktorkonzentration, Induktionszeitpunkt, Erntezeitpunkt) auf die Expressionsstärke von *StreptII-ΔNHR* 4K-His wurde der *B. megaterium* MS941 Klon pSB4 (#18) in jeweils 100 ml LB-Tet unter verschiedenen Bedingungen (Tabelle 3.4) kultiviert und die Proteinexpression wurde entsprechend induziert. Über einen Zeitraum von 28 Stunden (nach Induktion) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 2 ml Proben entnommen und die intra- und extrazellulären Proteinfractionen wurden mittels SDS-Page und Western Blot analysiert.

Experiment	Temperatur [° C]	Induktorkonzentration Xylose [% (w/v)]	Induktionszeitpunkt (OD _{600nm})
# 1	30	0,5	0,3
# 2	30	1	0,3
# 3	30	0,5	0,5
# 4	30	1	0,5
# 5	37	0,5	0,3
# 6	37	1	0,3
# 7	37	0,5	0,5
# 8	37	1	0,5

Tabelle 3.5: Versuchsparameter zur Ermittlung optimaler Kultivierungsbedingungen.

Bei 30 °C (Abb. 3.11) stieg die Stärke der Proteinexpression in der intrazellulären Proteinfraction (Pellet) von *StreptII-ΔNHR* 4K-His bis ca. 8 Stunden nach Induktion stetig an. Nach 24 Stunden wurde in der Western Blot Analyse ein schwächeres Signal als nach 8 Stunden detektiert. Im Kulturmedium stieg die Konzentration von *StreptII-ΔNHR* 4K-His bis ca. vier Stunden nach Induktion an. Nach acht Stunden war nur noch sehr wenig *StreptII-ΔNHR* 4K-His im Medium detektierbar. Die höchste extrazelluläre Proteinkonzentration bei 30 °C wurde nach vier Stunden in Probe #3 detektiert. Intrazellulär konnten nach acht Stunden in den Proben #1 bis #4 ähnlich hohe Mengen an *StreptII-ΔNHR* 4K-His nachgewiesen werden. Bei 37 °C (Abb. 3.12) konnte ebenfalls

eine mit der Zeit zunehmende intra- und extrazelluläre Proteinproduktion beobachtet werden. Die höchsten Proteinmengen konnten nach acht Stunden Kultivierung in der intrazellulären, aber auch extrazellulären Proteinfraction gemessen werden. Im Kulturmedium konnte *StreptII*- Δ NHR 4K-His erst nach vier Stunden detektiert werden. Allerdings stieg die Proteinkonzentration zwischen der vierten und der sechsten Stunde rasant an. Nach 24 Stunden war kein *StreptII*- Δ NHR 4K-His mehr im Kulturmedium detektierbar. Die höchste Produktion fand bei 37 °C nach acht Stunden in den Proben #6 und #8 statt.

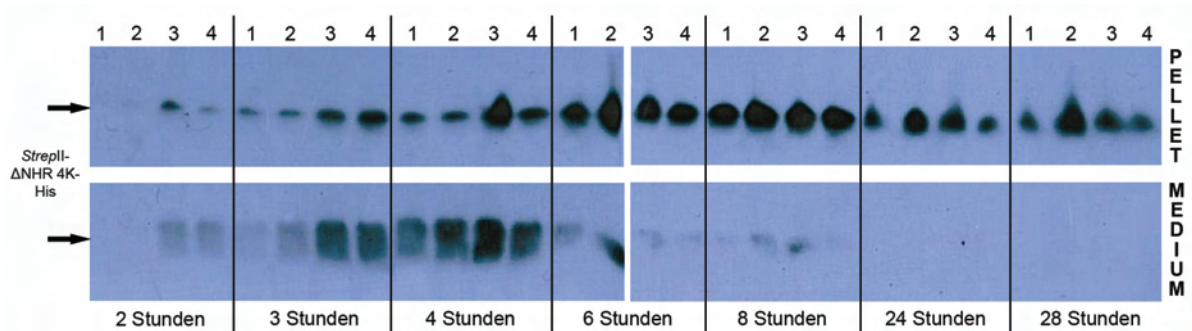


Abb. 3.11: Ermittlung optimaler Versuchbedingungen zur Expression von *StreptII*- Δ NHR 4K-His. *B. megaterium* MS941 Klon pSB4 (#18) wurde über einen Zeitraum von 28 Stunden bei einer Temperatur von 30 °C kultiviert. Die Induktion der Proteinproduktion erfolgte durch Zugabe von Xylose in unterschiedlichen Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. #1: Induktion bei OD_{600nm} 0,3 mit 0,5 % (w/v) Xylose. #2: OD_{600nm} 0,3, 1 % (w/v) Xylose. #3: OD_{600nm} 0,5, 0,5 % (w/v) Xylose. #4: OD_{600nm} 0,5, 1 % (w/v) Xylose. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 30 sec Expositionszeit.

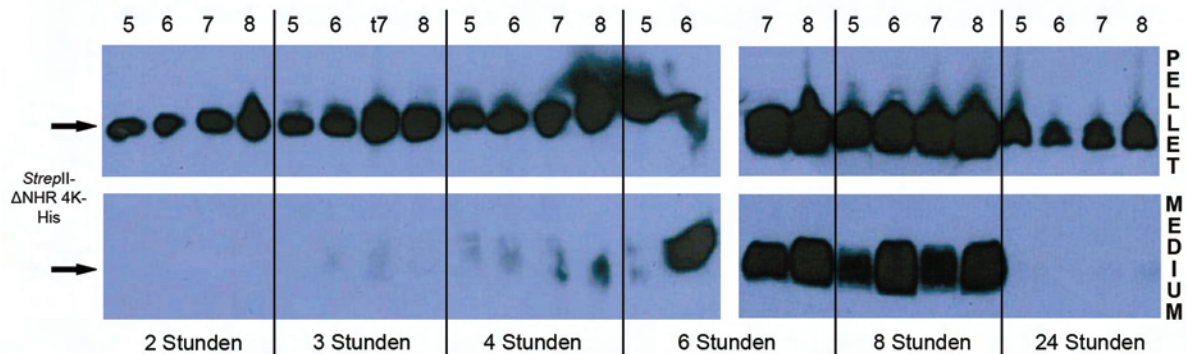


Abb. 3.12: Ermittlung optimaler Versuchbedingungen zur Expression von *StreptII*- Δ NHR 4K-His. *B. megaterium* MS941 Klon pSB4 (#18) wurde über einen Zeitraum von 28 Stunden bei einer Temperatur von 30 °C kultiviert. Die Induktion der Proteinproduktion erfolgte durch Zugabe von Xylose in unterschiedlichen Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. #5: Induktion bei OD_{600nm} 0,3 mit 0,5 % (w/v) Xylose. #6: OD_{600nm} 0,3, 1 % (w/v) Xylose. #7: OD_{600nm} 0,5, 0,5 % (w/v) Xylose. #8: OD_{600nm} 0,5, 1 % (w/v) Xylose. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper (1:2000): anti-Maus, 30 sec Expositionszeit.

Die Induktion der Expression rekombinanter Proteine erfolgt in der Regel im Laufe der exponentiellen Wachstumsphase. Somit stellt der Zeitpunkt der Induktion einen weiteren, für die Proteinproduktion wichtigen Faktor dar. Um diesen zu ermitteln, wurden vier weitere Testexpressionen mit Klon pSB4 (#18) durchgeführt. Die Induktion erfolgte hierbei mit 1 % Xylose (w/v) bei einer OD_{600nm} von 0,3, 0,5, 0,7 und 0,9. Als Negativkontrolle diente *B. megaterium* MS941, welcher mit dem leeren Expressionsvektor pSTREP-HIS1525 transformiert wurde. Die Expressionsdauer betrug acht Stunden bei 37 °C. Die Western Blot Analyse zeigte, dass bei allen vier Ansätzen *StreptII*- Δ NHR 4K-His im Pellet und Kulturmedium detektiert werden konnte (Abb. 3.13-A). Die Negativkontrolle hingegen lieferte, wie erwartet, kein Signal. Im entsprechenden, mit

Coomassie Blue gefärbten, Polyacrylamid Gel waren ebenfalls Banden in Höhe von etwa 12 kDa zu sehen (Abb. 3.13-B). Die Bandenintensitäten unterschieden sich in den einzelnen Ansätzen kaum voneinander, allerdings sekretierte *B. megaterium* MS941 mit Leervektor (Negativkontrolle) ebenfalls Proteine auf Höhe von etwa 12 bis 13 kDa.

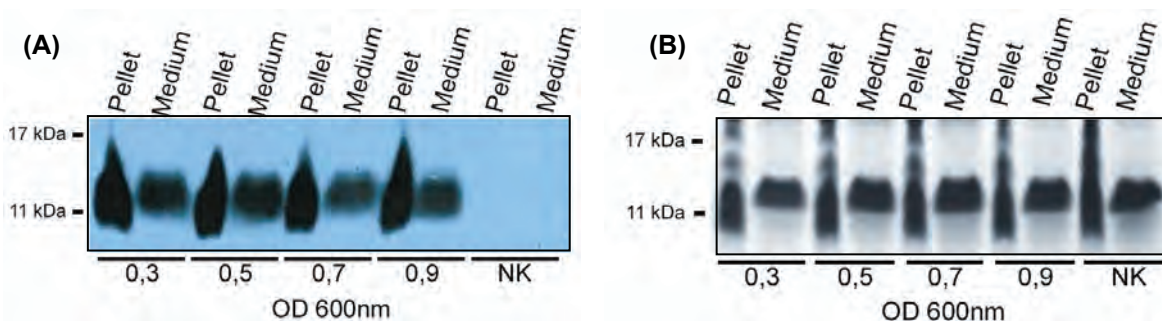


Abb. 3.13: (A) Ermittlung des optimalen Induktionszeitpunktes für die Expression von StreptII- Δ NHR 4K-His in Klon pSB4 (#18). Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 30 sec Expositionszeit. (B) Mit Coomassie Blue gefärbtes SDS Polyacrylamid Gel (12 %).

Weiterhin wurde untersucht, ob die Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien einen Effekt auf die Effizienz der rekombinanten Proteinproduktion haben könnte. TB Medium ist im Vergleich zu LB Medium weitaus reichhaltiger (Zusammensetzung siehe II.2.2) und sollte somit zu höheren Zelldichten, einhergehend mit höheren Proteinmengen, führen. Hierzu wurden erneut zwei Testexpressionen mit Klon pSB4 (#18) über einen Zeitraum von acht Stunden bei 37 °C durchgeführt. Die Induktion der Expression von *StreptII*- Δ NHR 4K-His erfolgte durch Zugabe von Xylose in einer Endkonzentration von 1 % (w/v) bei einer OD_{600nm} von 0,5. Erwartungsgemäß wurde *StreptII*- Δ NHR 4K-His nach acht Stunden in der intra- und, ein wenig schwächer, in der extrazellulären Fraktion der LB Expressionskultur detektiert. Für in TB Medium kultivierte Bacillen konnte zwar *StreptII*- Δ NHR 4K-His in der intrazellulären, allerdings nicht in der extrazellulären Proteinfraction nachgewiesen werden (Abb. 3.14). Ausgehend von einer OD_{600nm} von 0,5 stieg die Wachstumskurve der LB Kultur relativ konstant an, bis nach 7,5 Stunden die stationäre Wachstumsphase bei einer OD_{600nm} von ca. 4,5 erreicht wurde. In TB Medium kam es erst nach ca. 2 Stunden zu einem starken Anstieg des Wachstums. Nach ca. 8 Stunden wurde auch in dieser Kultur eine stationäre Phase mit einer OD_{600nm} von ca. 10,5 erreicht (Abb. 3.15).

Abb. 3.14: Western Blot Analyse der Testexpressionen in LB und TB Medium. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 30 sec Expositionszeit.

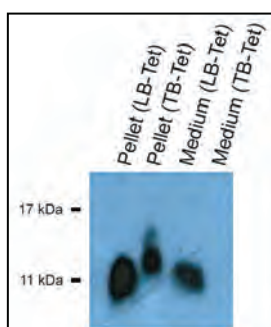
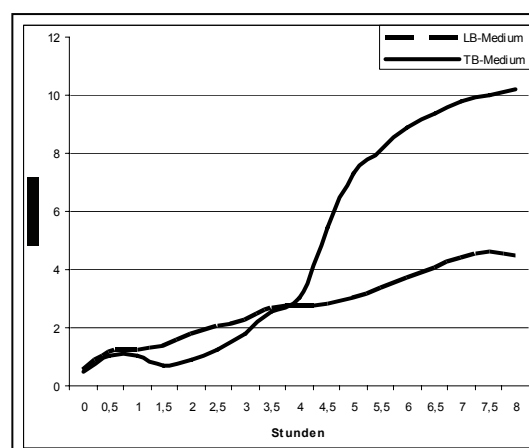


Abb. 3.15: Wachstumskurven der Expressionskulturen in LB und TB Medium. Aufgetragen wurde die optische Dichte (gemessen bei 600 nm) gegen die Zeit.



III.1.8 Intrazelluläre Produktion von *StreptII-ΔNHR* 4K-His

Zur intrazellulären Produktion der gp41 Verkürzungsmutante *StreptII-ΔNHR* 4K-His wurden Expressionskulturen in einem Maßstab von 0,5 bis 2 l Volumen durchgeführt. Generell wurden diese zur effektiven Versorgung der Bakterien mit Sauerstoff in Schikane-Kolben mit einem mindestens fünfmal größeren Volumen durchgeführt. Auf Basis der während der Optimierung (III.1.7) erhaltenen Bedingungen wurden alle weiteren Expressionen unter Einhaltung folgender Parametern durchgeführt: Induktion bei OD_{600nm} von 0,5 mit 1 % Xylose (w/v), Expressionszeitraum 8 Stunden, Temperatur 37 °C und Schüttlerdrehzahl 230 bis 300 rpm. Als Medium wurde LB-Tet verwendet (II.2.2).

III.1.8.1 Pufferoptimierung für die native Ni-NTA Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung von intrazellulären gp41 Verkürzungsmutanten wurde die komplette Expressionskultur geerntet (II.7.2), das Pellet ($m = 4$ g Feuchtwicht) gewaschen und anschließend enzymatisch (Lysozym) und physikalisch mittels Kavitationskräften (Sonifikation) aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte in Lysepuffer unter Standardbedingungen (II.2.4.5). Das durch Zentrifugation geklärte Lysat wurde zur Entfernung verbleibender, bakterieller Reste steril filtriert (\varnothing 0,45 μ m) und der pH wurde auf 8 eingestellt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie (II.7.2.1). Die Western Blot Analyse zeigte auf Höhe von 11 bis 14 kDa deutliche Signale im Rohlysate und auch im Durchfluss. Weitere, schwächere Signale konnten in Waschfraktion 1, aber auch in den Elutionsfraktionen 1 bis 6 gefunden werden (Abb. 3.16).

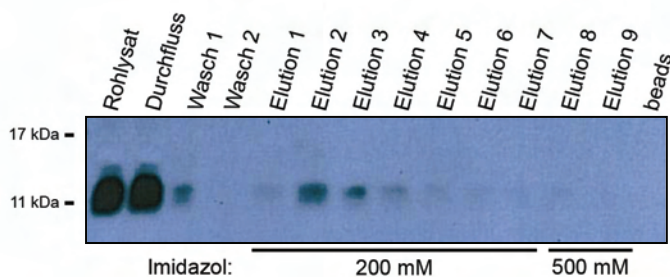


Abb. 3.16: Native Ni-NTA Affinitätschromatographie einer 2 l Expression von *StreptII-ΔNHR* 4K-His. Die Elutionen 1 bis 7 erfolgten unter Einsatz von 200 mM Imidazol. Elution 8 und 9 hingegen mit 500 mM Imidazol. Die verwendete Ni-NTA Agarose wurde zusätzlich als Elutionskontrolle aufgetragen. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 20 sec Expositionszeit.

Da das detektierte Signal in der Durchflussfraktion in etwa genau so stark, wie im Rohlysate war, wurde eine Optimierung des Lysepuffers zur verbesserten Bindung des His-getaggten Proteins an die Matrix durchgeführt. Hierzu wurden zehn Pellets (jeweils 0,5 g Feuchtwicht) in unterschiedlichen Puffern (Tabelle 3.5) resuspendiert und wie unter II.7.2 beschrieben aufgeschlossen. Das geklärte Rohlysate wurde in *Qiagen Ni-NTA Mini Spin column* transferiert und der Durchfluss aufgefangen. Da in diesem Experiment die Bindung der rekombinanten Proteine an die Ni-NTA Agarose verbessert werden sollte, wurde die im Rohlysate enthaltene Proteinmenge mit der aus der Durchflussfraktion verglichen. Für einen geeigneten Puffer wurde erwartet, dass die Durchflussfraktion in der folgenden Western Blot Analyse ein weitaus schwächeres Signal lieferte, als der Überstand (Ausgangsmaterial).

Tabelle 3.6: Übersicht über getestete Lysepuffer zur verbesserten Bindung der rekombinanten Proteine an die Ni-NTA Agarose.

Nr.	Bezeichnung	NaH ₂ PO ₄	Tris	NaCl	Imidazol	β-Mercaptoethanol
# 1	T20 N300 B5	-	20 mM	300 mM	5 mM	5 mM
# 2	T20 N600 B5	-	20 mM	600 mM	5 mM	5 mM
# 3	T50 N300 B5	-	50 mM	300 mM	5 mM	5 mM
# 4	T50 N600 B5	-	50 mM	600 mM	5 mM	5 mM
# 5	T20 N300 B10	-	20 mM	300 mM	5 mM	10 mM
# 6	T20 N600 B10	-	20 mM	600 mM	5 mM	10 mM
# 7	T50 N300 B10	-	50 mM	300 mM	5 mM	10 mM
# 8	T50 N600 B10	-	50 mM	600 mM	5 mM	10 mM
# 9	Lysepuffer	50 mM	-	300 mM	5 mM	-
# 10	Lysepuffer B	50 mM	-	300 mM	5 mM	10 mM

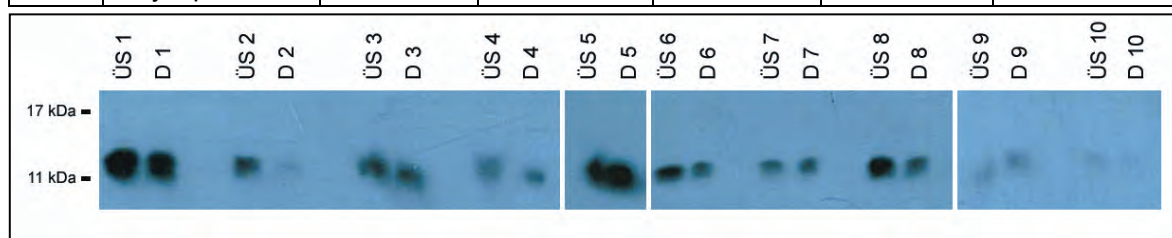


Abb. 3.17: Pufferoptimierung zur verbesserten Bindung von *StreptII-ΔNHR* 4K-His an Ni-NTA Agarose. In der Western Blot Analyse wurde für jeden Puffer jeweils geklärter Überstand (ÜS 1 - 10) und der entsprechende Durchfluss (D 1 - 10) aufgetragen. Die Durchnummerierung der Proben bezieht sich hierbei auf die in Tabelle 3.5 angegebenen Puffer. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 20 sec Expositionszeit.

In allen getesteten Überständen konnte *StreptII-ΔNHR* 4K-His nachgewiesen werden. In Probe 2 (Puffer T20 N600 B5) erschien ein deutliches Signal im Überstand und eine weitaus schwächere im Durchfluss. Bei den anderen Proben waren die Intensitäten beider Banden jeweils in etwa gleich. In den Proben 9 und 10 war kaum Protein im Überstand sichtbar, somit folglich auch nicht im Durchfluss. Für weitere Aufreinigungen wurde T20 N600 B5 als Lysepuffer verwendet.

III.1.8.2 Native 2-Schritt-Aufreinigung: Ni-NTA- und *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie

Ausgehend von einer 2 l Expressionskultur wurden 5 g Zellpellet in 10 ml Lysepuffer T20 N600 B5 (Tabelle 3.16) resuspendiert und, wie unter II.7.2 beschrieben, aufgeschlossen. Die Bindung von *StreptII-ΔNHR* 4K-His an die Ni-NTA Agarose erfolgte für eine Stunde bei 4 °C im Batch-Verfahren. Es wurden 0,5 ml Ni-NTA Agarose verwendet. Nach dreimaligem Waschen mit 5 ml Waschpuffer wurden gebundene Proteine einmal mit 1 ml Elutionspuffer 1 (150 mM Imidazol), zweimal mit 1 ml Elutionspuffer 2 (300 mM Imidazol) und weitere zweimal mit 1 ml Elutionspuffer 3 (500 mM Imidazol) eluiert. Als Expressionskontrollen wurden vor Zellaufschluss 2 ml Kulturmedium entnommen und für 5 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl SDS 2x Ladepuffer resuspendiert und für 5 min bei 97 °C aufgeköcht. Das Kulturmedium wurde über Nacht bei -20 °C mit Aceton gefällt und die präzipitierten Proteine wurden in 50 µl SDS 2x Ladepuffer und 50 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Von allen weiteren Fraktionen (Pellet nach Aufschluss, Überstand, Durchfluss, Wasch- und Elutionsfraktionen) wurden je 50 µl mit 50 µl SDS 2x Ladepuffer versetzt und ebenfalls aufgeköcht. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt

wurden von jeder Probe jeweils 30 μ l auf ein SDS Polyacrylamid Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die nachfolgende Western Blot Analyse zeigte, dass nach Aufschluss der geernteten Zellen noch immer verhältnismäßig große Mengen an *StreptII*- Δ NHR 4K-His verblieben (Abb. 3.18). In allen Elutionsfraktionen konnten aber eindeutige Signale auf der erwarteten Höhe von ca. 12 kDa erkannt werden. Auch im entsprechenden mit Coomassie Blue gefärbtem SDS Polyacrylamid Gel waren Banden auf Höhe von 12 kDa zu sehen, welche *StreptII*- Δ NHR 4K-His entsprachen (Abb. 3.19). Allerdings waren die Eluate noch durch weitere Proteine verunreinigt. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades wurden die Elutionsfraktionen 1 bis 5 vereint und zusammen über eine *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie erneut aufgereinigt. Allerdings konnten in der folgenden Western Blot Analyse lediglich Signale in den Fraktionen Eluate (gepoolt) und Durchfluss erkannt werden (Abb. 3.20).

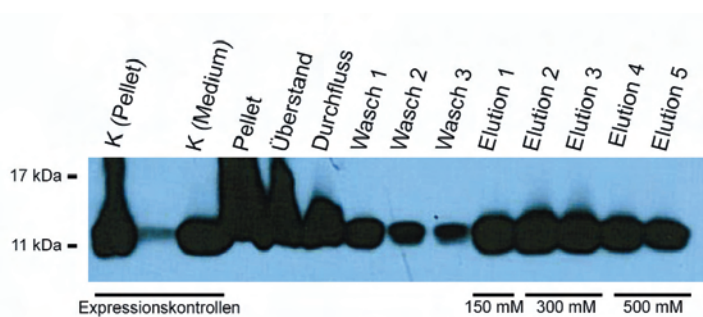


Abb. 3.18: Native Ni-NTA Affinitätschromatographie von *StreptII*- Δ NHR 4K-His. Ausgehend von einer 2 l Expressionskultur wurden insgesamt 5 g Zellpellet aufgeschlossen und das erhaltene Rohlysate über Ni-NTA Agarose aufgereinigt. K(Pellet) und K(Medium): Expressionskontrolle. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 20 sec Expositionszeit.

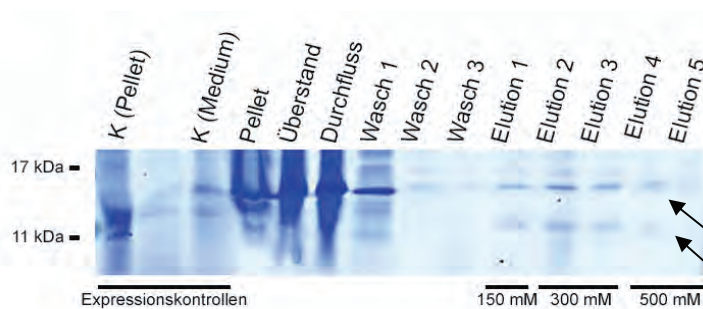


Abb. 3.19: Coomassie Blue gefärbtes SDS Polyacrylamid Gel (12 %) der nativen Aufreinigung von *StreptII*- Δ NHR 4K-His. K(Pellet) und K(Medium): Expressionskontrolle.

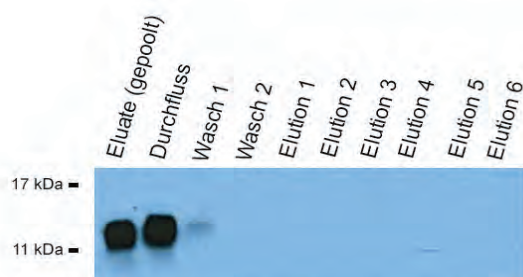


Abb. 3.20: *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie von *StreptII*- Δ NHR 4K-His (Eluate 1 bis 5 aus der nativen Ni-NTA Aufreinigung). Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 20 sec Expositionszeit.

Da nach Zellaufschluss immer noch große Mengen an *StreptII*- Δ NHR 4K-His im Pellet verblieben (Abb. 3.18), wurde dieses unter denaturierenden Bedingungen weiter aufgeschlossen und eine denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie wurde angewandt (II.1.8.3).

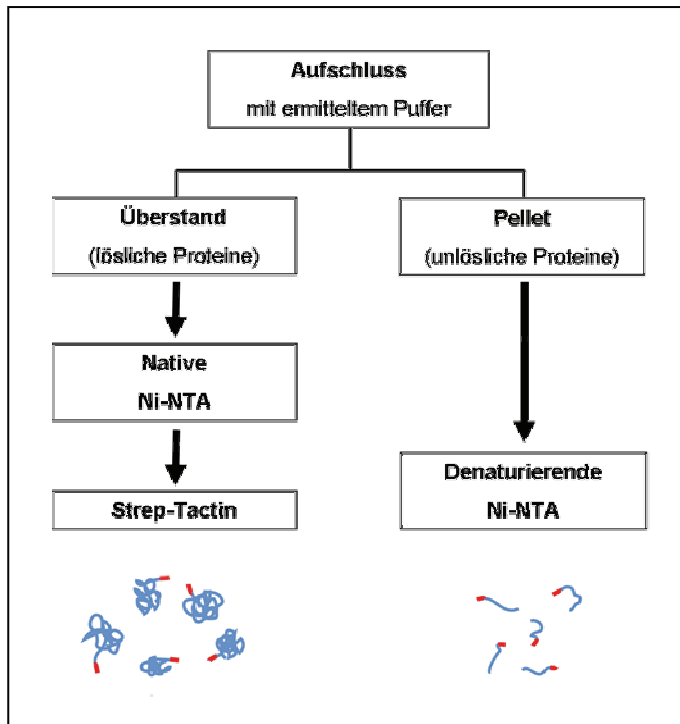


Abb. 3.21: Übersicht der angewandten Strategie zur Aufreinigung von *StrepII*- Δ NHR 4K-His. Nach Aufschluss der Zellen mit dem in II.1.8.1 optimiertem Puffer erhielt man 2 unterschiedliche Fraktionen. Im Überstand sollten lösliche Proteine enthalten sein, die durch eine Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt wurden. Zur weiteren Erhöhung der Reinheit bietet sich bei His- und *StrepII*-tag Proteinen eine weitere Affinitätschromatographie über *Strep*-Tactin an. Die unlöslichen, im Pellet verbliebenen Proteine können durch Einsatz von Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid solubilisiert und eventuell ebenfalls aufgereinigt werden.

III.1.8.3 Denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung von *StrepII*- Δ NHR 4K-His unter denaturierenden Bedingungen wurden Zellpellets in Bindepuffer B (II.2.4.6) resuspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 15000 x g wurde der Überstand im Batch-Verfahren für eine Stunde mit 0,5 ml Ni-NTA Agarose bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in eine Säule überführt. Zur Entfernung unspezifischer Bindungspartner wurde die Matrix dreimal mit Waschpuffer C (pH 6,3) gewaschen und anschließend *StrepII*- Δ NHR 4K-His mit Elutionspuffer D (pH 4,5) eluiert.

Abb. 3.22: (A) Denaturierende Ni-NTA Affinitätschromatographie von *StrepII*- Δ NHR 4K-His. Das Pellet aus II.1.8.2 wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur mit Bindepuffer B inkubiert und anschließend aufgereinigt. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 20 sec Expositionszeit.



Abb. 3.22: (B) Coomassie Blue gefärbtes SDS Polyacrylamid Gel (12 %) der denaturierenden Ni-NTA Affinitätschromatographie von *StrepII*- Δ NHR 4K-His. Die deutlichen Banden auf Höhe von etwa 14 bis 16 kDa entsprechen dem zum Aufschluss eingesetzten Lysozym.



Im Western Blot konnte für die Pelletfraktion kein, für den Überstand allerdings ein sehr deutliches Signal detektiert werden. Somit konnte in dieser Aufreinigung nahezu die gesamte Menge an verbliebenen *StreptII-ΔNHR* 4K-His aus dem Bakterienpellet solubilisiert werden. Die Elutionsfraktionen 2 und 3 zeigten ebenfalls ein recht intensives Signal auf Höhe von 12 kDa. Auch in den Elutionsfraktionen 1 und 4 bis 8 waren leichtere Signale zu sehen. Auf dem Coomassie gefärbten SDS Polyacrylamid Gel hingegen konnte keine Bande auf Höhe von 12 kDa vernommen werden.

III.1.9 Extrazelluläre Produktion von *StreptII-ΔNHR* 4K-His

Wie bereits in III.1.6 gezeigt wurde, entfiel ein Großteil des von *B. megaterium* MS941 hergestellten *ΔNHR* 4K auf die extrazelluläre Proteinfraction. Expressionsversuche wurden, wie für die intrazelluläre Produktion, in einem Volumen von 2 l durchgeführt. Die Expressionsdauer betrug acht Stunden. Die Induktion der Proteinproduktion erfolgte bei einer OD_{600nm} von 0,5 mit Xylose in einer Endkonzentration von 1 % (w/v). Nach Abtrennen der Zellen durch Zentrifugation wurde das Kulturmedium vor der weiteren Aufreinigung steril filtriert und zur Verminderung extrazellulärer Proteaseaktivitäten ständig bei 4 °C gelagert.

In den zwei folgenden Abschnitten sollte die Effizienz der Aufreinigung von *StreptII-ΔNHR* 4K-His aus unkonzentriertem (III.1.10), mit der aus konzentriertem (III.1.11) Kulturmedium verglichen werden. Hierzu wurden 2000 ml Kulturmedium geteilt und getrennt weiter gearbeitet.

III.1.9.1 Aufreinigung unkonzentrierter Proteine aus dem Kulturmedium

In einem ersten Versuch wurden 1 l zellfreies Kulturmedium über Nacht bei einer Flussgeschwindigkeit von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ über 1 ml Ni-NTA Agarose bei 4 °C geschickt. Die Elution erfolgte, wie bei der nativen Ni-NTA Aufreinigung intrazellulärer Proteine, mit Puffer T20 N600 B5 (Tabelle 3.5), welchem Imidazol in einer Endkonzentration von 300 mM zugesetzt wurde. Allerdings konnte in der nachfolgenden Analyse der einzelnen Fraktionen kein *StreptII-ΔNHR* 4K-His im Western Blot nachgewiesen werden. Auch im Kulturmedium konnte *StreptII-ΔNHR* 4K-His erst nach Konzentrierung der Proteine mittels Acetonfällung nachgewiesen werden (Abb. nicht gezeigt).

III.1.9.2 Aufreinigung konzentrierter Proteine aus dem Kulturmedium

Als Methode zur Konzentrierung der Proteine im Kulturmedium wurde die Ammoniumsulfat-präzipitation gewählt. Diese Fällungsmethode ermöglicht eine schonende Fällung von Proteinen unter Erhalt der natürlichen Konformation. Des Weiteren bietet sie die Möglichkeit der fraktionierten Fällung. Da jedes Protein aus einer wässrigen Lösung erst bei seiner spezifischen Ammonsulfatsättigung ausfällt, können somit alle Proteine, welche einen niedrigeren Fällungspunkt besitzen, abgetrennt werden. Zur Ermittlung der spezifischen Ammoniumsulfatsättigung von *StreptII-ΔNHR* 4K-His wurden 50 ml des Kulturmediums aliquotiert und gemäß Tabelle 2.6 auf eine

Ammoniumsulfatsättigung von 20 % eingestellt. Wie unter II.7.3.1 beschrieben, wurden die präzipitierten Proteine resuspendiert und die Sättigung wurde weiter stufenweise auf 40 %, 60 %, 80 % und letztendlich 100 % erhöht.

Erst bei einer Ammoniumsulfatsättigung von 60 % konnte mittels Western Blot Analyse präzipitiertes *StreptII-ΔNHR* 4K-His detektiert werden (Abb. 3.22). Bei 80 % und 100 % Sättigung wurde wiederum kein Signal detektiert, was auf eine vollständige Abtrennung bei 60 % entspricht. Die zur Präzipitation von *StreptII-ΔNHR* 4K-His spezifische Ammoniumsulfatsättigung lag somit bei etwa 60 % (entspricht 19,5 g pro 50 ml Kulturmedium).

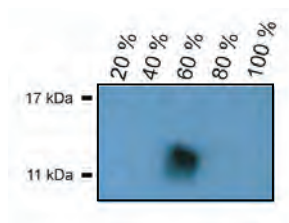


Abb. 3.23: Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung zur Ermittlung des spezifischen Fällungspunkt von *StreptII-ΔNHR* 4K-His. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundär-antikörper: anti-Maus (1:2000), 20 sec Expositionszeit.

Die restlichen 950 ml Kulturmedium wurden zunächst auf eine Sättigung von 40 % eingestellt und die präzipitierten Proteine wurde verworfen. Durch Erhöhung der Sättigung auf 60 % konnte *StreptII-ΔNHR* 4K-His gezielt gefällt werden. Die abgetrennten Proteine wurden anschließend in 10 ml T20 N600 B5 Puffer resuspendiert, was einem Konzentrierungsfaktor von 9,5 entsprechen sollte. Zur Entfernung des verbliebenen Ammoniumsulfats wurde die Probe bei 4 °C für 24 Stunden unter leichtem Rühren gegen 10 Liter T20 N60 B5 Puffer dialysiert und das Konzentrat wurde anschließend auf einen pH von 8 eingestellt. Allerdings konnte auch in diesem Fall kein *StreptII-ΔNHR* 4K-His mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie aus dem Kulturmedium aufgereinigt werden (Abb. nicht gezeigt).

III.2 PRODUKTION VON HERV-KTM IN HANSENULA POLYMORPHA

III.2.1 Nachweis der genomischen Integration von HERV-KTM

Für die Expression von HERV-KTM, welches ebenfalls eine immunsuppressive Domäne beinhaltet (siehe Tabelle 1.1), wurde ein methylophiler Hefestamm (*Hansenula polymorpha* RB11) verwendet, der bereits HERV-KTM stabil in seinem Genom integriert hatte (Dao Thi 2006). HERV-KTM sollte ebenfalls mit Hilfe eines Endotoxin-freien Systems hergestellt werden, wobei *H. polymorpha* als eukaryotisches System in der Lage ist, Glykosylierungen und weitere posttranslationale Modifikationen vorzunehmen. Ursprünglich wurde das Gen für HERV-KTM über die Restriktionsschnittstellen *Not* I und *Bgl* II in den Expressionsvektor pFPMT121 (II.3.2.5) kloniert und *Hansenula polymorpha* wurde mittels Elektroporation transformiert. Positive Klone wurden in frischem YPD Medium angezogen und als Glyzerinstocks gelagert (II.5.4). Nach Ausstreichen der Hefen auf eine YPD Platte und 24 stündiger Inkubation bei 37 °C konnten einzelne Kolonien gepickt und auf Vorhandensein des Gens für HERV-KTM geprüft werden. Hierzu wurde genomische DNA mit der sogenannten Smash´n´Grab Methode (II.6.1) präpariert und anschließend eine PCR (II.6.2) mit den ursprünglichen Klonierungsprimern *Herv_forward* und *Herv_reverse* (II.3.3) durchgeführt. Bei Vorhandensein des Gens für HERV-KTM wurde ein PCR-Amplifikat mit einer Größe von 480 bp erwartet.

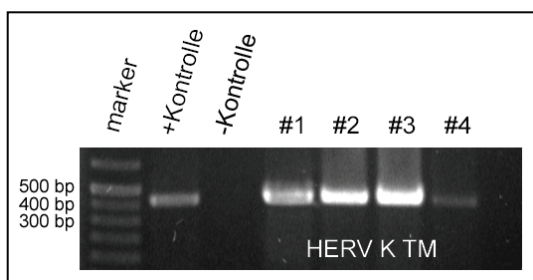


Abb. 3.24: Nachweis der Integration des Gens für HERV-KTM in *Hansenula polymorpha* RB11. Insgesamt wurden vier Klone von einer YPD Platte gepickt und die genomische DNA wurde mittels Smash´n´Grab (II.6.1) präpariert. Nach Amplifikation von HERV-KTM mit den Klonierungsprimern (II.3.3) *Herv_forward* und *Herv_reverse* wurde das PCR-Gemisch auf ein analytisches Agarose Gel (1 %) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Als Positiv-Kontrolle diente das für die Integration verwendete Plasmid pFPMT121-HERV-K-TM, als Negativ-Kontrolle H₂O_{bidest.}

Bei allen gepickten Klonen konnte ein signifikante Bande auf Höhe der Positiv-Kontrolle (480 bp, pFPMT121-HERV-KTM) gesichtet werden (Abb. 3.24). Dies bedeutete, dass alle Klone HERV-KTM in ihrem Genom integriert hatten. Die Negativ-Kontrolle (H₂O_{bidest} anstelle von genomischer DNA) hingegen zeigte keine Bande. Klon #3 wurde anschließend erneut in 10 ml YPD für 24 Stunden bei 37 °C angezogen und zur längerfristigen Aufbewahrung bei -80 °C wurden Glyzerinstocks angefertigt. Alle weiteren Experimente wurden ausgehend von Klon #3 durchgeführt. Zur weiteren Überprüfung wurden die PCR-Amplifikate Klon #3 aus dem Agarose Gel aufgereinigt (II.6.4) und die Fragmente wurden erfolgreich sequenziert (II.6.14). Nach Translation der erhaltenen Nukleotidsequenz konnte, wie erwartet, folgende Primärstruktur für das Genprodukt abgeleitet werden (Abb. 3.25).

```

KGISM L L F C H F P T A Q I T G L L F I N T T I A S I A A K E E G V S L D K R P M G S S H H H H H S S G L V
P R G S H A S G R V A G V A L H S S V Q S V N F V N D W Q K N S T R L W N S Q S S I D Q K L A N Q I N D L R Q
T V I W M G D R L M S L E H R F Q L Q C D W N T S D F C I T P Q I Y N E S E H H W D M V R R H L Q G R E D N L
T L D I S K L K E Q I F E A S K A H L N L V P G T E A I A G V A D G L A N L N P V T W V L T I G S T T

```

Abb. 3.25: Aminosäuresequenz von HERV-KTM. schwarz: mating factor α (MF α), rot: 6xHis-tag, grün: thrombin cleavage site (TCS), hellblau: HERV-KTM, dunkelblau: immunsuppressive Domäne (Isu).

III.2.2 Optimierung der HERV-K TM Produktion in *Hansenula polymorpha* RB11

HERV-K TM konnte bereits erfolgreich in der Arbeitsgruppe für weitere Untersuchungen exprimiert und aufgereinigt werden. Allerdings war das Expressionslevel extrem niedrig und HERV-K TM konnte nicht in reiner Form gewonnen werden. Aus diesem Grund wurde vor der eigentlichen Proteinproduktion eine Reihe an Experimenten mit dem Ziel der optimierten HERV-K TM Expression durchgeführt.

Ausgehend von einer einzelnen Kolonie wurden 20 ml YNB Medium (Minimalmedium) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Zur Expression von HERV-K TM wurden am folgenden Tag 100 ml YPM Medium (Induktionsmedium, enthielt 2 % Methanol zur Induktion der Proteinproduktion) mit der Vorkultur auf eine OD_{600nm} von 0,3 eingestellt und für weitere 24 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Als Negativkontrolle diente der gleiche Hefestamm, welcher allerdings in YPD Medium (Vollmedium, enthält 2 % Glucose) kultiviert und somit nicht induziert wurde. Zur weiteren Analyse wurden 6, 8, 10 und 24 Stunden nach Induktion je 4 ml Proben entnommen und mittels Western Blot analysiert.

In den ersten 10 Stunden konnte in der Negativkontrolle, wie erwartet, kein HERV-K TM detektiert werden. Allerdings erschien in Spur 24 h (24 Stunden nach Induktion) eine Ansammlung von Banden. Nach 8, 10 und 24 Stunden konnten für die induzierten Hefen spezifische Banden in Höhe von ca. 32 und 28 kDa, neben weiteren unspezifischen detektiert werden. Die Intensität der Banden nahm von 8 bis 10 h zu, es zeigte sich jedoch, dass eine längere Kultivierung nicht zu einer höheren Proteinexpression führte. Da der Primärantikörper ein anti-HERV-Antikörper war, konnte das exprimierte Protein als HERV-K TM identifiziert werden (Abb. 3.26), wobei die glykosylierte Form eine molare Masse von etwa 33 kDa und die nicht-glykosylierte ca. 24 kDa besitzt.

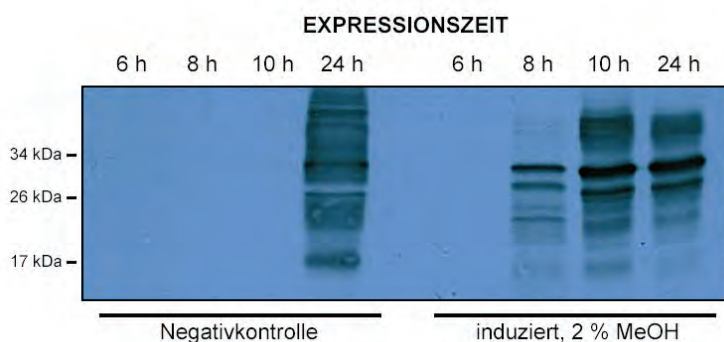


Abb. 3.26: Testexpression von HERV-K TM in *Hansenula polymorpha* RB11. Negativkontrolle: Hefen für 24 h in Vollmedium (2 % Glucose) inkubiert. Expression: Hefen für 24 h in Induktionsmedium (2 % Methanol (v/v)) inkubiert. Primärantikörper: anti-HERV (1:5000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 3 sec Exposition.

In einem weiteren Versuch sollten die optimale OD_{600nm} zur Induktion der Proteinexpression, sowie die Kultivierungstemperatur ermittelt werden. Hierzu wurden je vier Expressionen bei 30 °C und 37 °C durchgeführt. Hierzu wurden je 50 ml Induktionsmedium mit einer frisch angezogenen Vorkultur auf eine OD_{600nm} von 0,5, 1, 1,5 und 2 eingestellt und für 24 Stunden kultiviert.

Mit Hilfe der Western Blot Analyse konnte gezeigt werden, dass alle unterschiedlich kultivierten bzw. induzierten Hefekulturen HERV-K TM exprimiert haben (Abb. 3.27-A). Die stärksten Banden konnten in den Proben OD = 1,5 und 2 bei 30 °C, sowie bei 37 °C ermittelt werden. Die Bandenintensität lässt darauf schließen, dass die höchste Menge an rekombinanten HERV-K TM durch Induktion bei OD = 2 produziert wird. Im entsprechenden Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbten SDS Polyacrylamid Gel war in jeder Spur auf Höhe von knapp unter 34 kDa ebenfalls eine distinkte Bande zu sehen, welche dem HERV-K TM entspricht (Abb. 3.27-B).

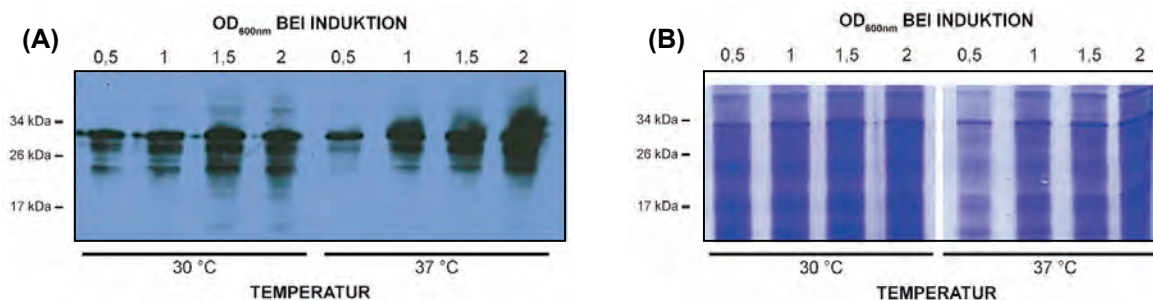


Abb. 3.27: (A) Testexpressionen zur Ermittlung der optimalen Kultivierungstemperatur und optischen Dichte zur Induktion der HERV-K TM Expression. Die Hefen wurden bei 30 °C und 37 °C kultiviert, wobei die Induktion bei einer optischen Dichte (600 nm) von 0,5, 1, 1,5 und 2 mittels 2 % Methanol erfolgte. Die Expressionen wurden insgesamt über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt. Primärantikörper: anti-HERV (1:5000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 3 sec Exposition. (B) Coomassie gefärbtes Polyacrylamid Gel der gleichen Testreihe.

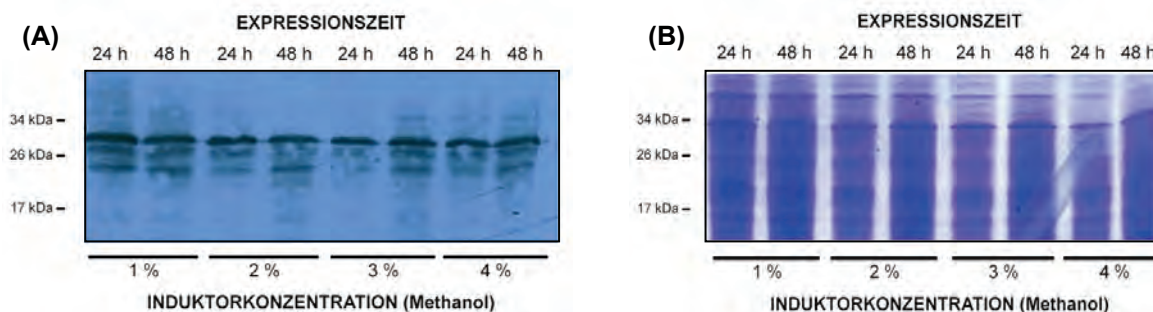


Abb. 3.28: (A) Testexpressionen zur Ermittlung der optimalen Induktorkonzentration. Die Proteinproduktion wurde mit Methanolkonzentrationen von 1 %, 2 %, 3 % und 4 % (v/v) induziert. Primärantikörper: anti-HERV (1:5000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 1 sec Exposition. (B) Coomassie gefärbtes Polyacrylamid Gel der gleichen Testreihe.

Der Einsatz unterschiedlicher Methanolkonzentrationen bewirkte keine signifikante Veränderung in der Expressionsstärke von HERV-K TM. Wie in Abbildung 3.28-A ersichtlich, konnten in allen Spuren in etwa die gleichen Bandenmuster, mit mehr oder weniger gleich starken Intensitäten beobachtet werden. Im Coomassie gefärbten SDS Gel konnte HERV-K TM nicht als stark überexprimiertes Protein erkannt werden (Abb. 3.28-B).

Ein weiterer Ansatz zur Erhöhung des Expressionslevels war die Nutzung unterschiedlicher Fermentationsmethoden. Im durchgeführten Fed-Batch-Verfahren (Abb. 3.29: Versuch B) wurde der Expressionskultur, im Gegensatz zum Batch-Verfahren (Abb. 3.29: Versuch A), nach 24 Stunden frisches Kulturmedium, und somit gleichzeitig neue Nährstoffe hinzugefügt. Addiert wurde

YPM mit einer Methanolkonzentration von 2 % (w/v) (Abb. 3.29: Versuch B) und 4 % (w/v) (Abb. 3.29: Versuch C). Um den Effekt inhibierender oder gar toxischer Stoffwechselprodukte zu minimieren, wurde in einem anderen Ansatz die komplette Kultur nach 24 Stunden abzentrifugiert und erneut in YPM Medium (2 % (w/v) Methanol) resuspendiert und weitere 24 Stunden kultiviert (Abb. 3.29: Versuch D). Bei allen acht Versuchen wurde für die ersten 24 Stunden Kultivierung YPM Medium mit 2 % (w/v) Methanol verwendet. Zur Induktion wurden die Medien mit einer frischen Vorkultur auf eine OD_{600nm} von 1 eingestellt und bei 37 °C und 180 rpm kultiviert.

In der anschließenden Western Blot Analyse der intrazellulären Proteinfractionen (Abb. 3.29-A), sowie im Coomassie gefärbten Polyacrylamid Gel (Abb. 3.29-B) konnte in allen Proben weitestgehend identische Bandenmuster, sowie ähnliche Intensitäten festgestellt werden. Im Western Blot konnte für alle Experimente wieder das für HERV-K TM typische Bandenmuster erkannt werden (Abb. 3.29-A).

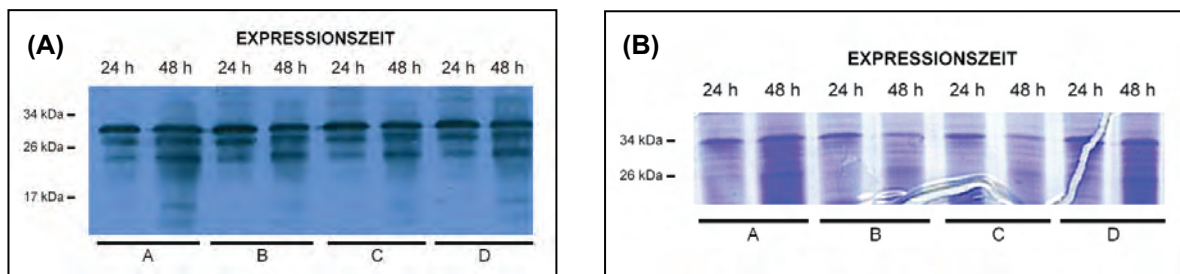


Abb. 3.29: (A) Erprobung unterschiedlicher Fermentationsarten zur Herstellung von HERV-K TM. In Experiment A wurde das Batch-Verfahren mit YPM (2 % (w/v) Methanol) angewandt. In Experiment B wurde der Expressionskultur nach 24 Stunden 1 Volumen frisches YPM mit Methanol in einer Endkonzentration von 2 % (w/v) und in C mit einer Endkonzentration von 4 % (w/v) Methanol hinzugefügt. In Experiment D wurden die Zellen nach 24 Stunden geerntet und in neuem YPM (2% (w/v) Methanol) Medium resuspendiert und weitere 24 Stunden kultiviert. Primärantikörper: anti-HERV (1:5000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 1 sec Exposition. (B) Coomassie gefärbtes Polyacrylamid Gel der gleichen Versuchsreihe.

III.2.3 Optimierter Hefeaufschluss und Aufreinigung von HERV-K TM

In vorangegangenen Arbeiten konnte HERV-K TM bereits in kleinen Mengen aus *Hansenula polymorpha* RB11 isoliert werden. Allerdings war die Effizienz des Hefeaufschlusses und die weitere Aufreinigung mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgrund der starken Hydrophobizität von HERV-K TM sehr niedrig. Zum Aufschluss wurden die geernteten Zellen in Bindepuffer B aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (Dao Thi 2006). In nachfolgenden Arbeiten konnte der Aufschluss der Hefen durch starkes Vortexen unter Einsatz von Glaskugeln (0,2 Volumen) leicht verbessert werden, nach wie vor verblieben aber noch große Mengen an rekombinantem Protein im Hefepellet (Falenski 2007). Des Weiteren ist zu erwähnen, dass Bindepuffer B aufgrund seiner hohen Konzentration an Guanidinhydrochlorid (8 M) sämtliche Proteine, und somit auch HERV-K TM, denaturiert und somit keine strukturell nativen Proteine gewonnen werden könnten.

Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit acht native und zwei denaturierende Puffer zur verbesserten Solubilisierung von HERV-K TM getestet und der Aufschluss durch den Einsatz von Glaskugeln (1 Volumen) und dem Enzym Zymolyase, welches effizient Zellwände von Hefen abbaut, optimiert.

Hierzu wurden geerntete Hefepellets aus 30 ml Kulturen in 1 ml Puffer (siehe Tabelle 3.6) resuspendiert, mit einem Volumen Glaskugeln (0,5 µm Durchmesser) versetzt und dreimal je 2 Minuten stark gevortext. Alle Arbeitsschritte erfolgten zur Unterdrückung proteolytischer Aktivitäten auf Eis. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 12000 x g bei 4 °C wurden die Pellets und Überstände mit SDS 2x Ladepuffer versetzt und mittels SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung verwendeter Puffer zur Erhöhung der Löslichkeit von HERV-K TM. Zur Inhibierung proteolytischer Enzyme wurden die Puffer auf 4 °C gekühlt und ein Proteaseinhibitor-Cocktail (1x complete, Roche) beigefügt.

Puffername	Zusammensetzung	pH-Wert
TIF	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 0,1 % NP-40, 10 % (w/v) Glycerin	8
NETN-20	20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,52 % NP-40	8
NETN-25	25 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0, 2 % NP-40, 1 mM DTT	7,5
NETN-50	50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5 % NP-40	8
NETN-M	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM β-Mercaptoethanol, 3 mM EDTA, 1 % NP-40	8
SET	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % NP-40	8
HEPES	20 mM HEPES KOH, 150 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,15 % NP-40, 10 mM DTT	7
PBS-Tx	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 1 % Triton X	7,4
Crackingpuffer	40 mM Tris-HCl, 5 % SDS, 8 M Harnstoff, 0,1 mM EDTA, 0,4 mg / ml Bromphenolblau	6,8
Bindepuffer B	100 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM Tris-HCl, 8 M Guanidinhydrochlorid, 0,3 % SDS	8
Lysepuffer (nativ)	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol	8



Abb. 3.30: Vergleich verschiedener Puffer zur Erhöhung der Löslichkeit von rekombinantem HERV-K TM aus *H. polymorpha*. Der Cracking-, sowie der Bindepuffer B wirkten aufgrund des SDS bzw. Guanidinhydrochlorid denaturierend auf alle Proteine. Alle anderen Puffer ermöglichten eine Aufreinigung unter Erhalt der nativen Proteinkonformation. Primärantikörper: anti-HERV (1:5000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 1 sec Exposition.

In der nachfolgenden Western Blot Analyse (Abb. 3.30) konnte gezeigt werden, dass HERV-K TM im Vergleich zu den anderen getesteten Puffern mit Hilfe des denaturierenden Bindepuffer B am besten gelöst werden konnte. Von den nativen Puffern konnte NETN-25 die größte Menge an HERV-K TM solubilisieren. Als Positivkontrolle für den Aufschluss wurde Crackingpuffer verwendet.

In einem weiteren Versuch sollte der native Puffer NETN-25 durch Zusatz von 0,5 %, 1 % und 1,5 % Triton-X 100 weiter verbessert und mit Bindepuffer B verglichen werden. Abbildung 3.31 zeigt, dass die Löslichkeit von HERV-K TM mit zunehmender Triton-X 100 Konzentration anstieg. Bindepuffer B erwies sich allerdings auch in diesem Experiment als optimaler Puffer, sodass die folgende Aufreinigung ebenfalls mit diesem Puffer durchgeführt wurde.

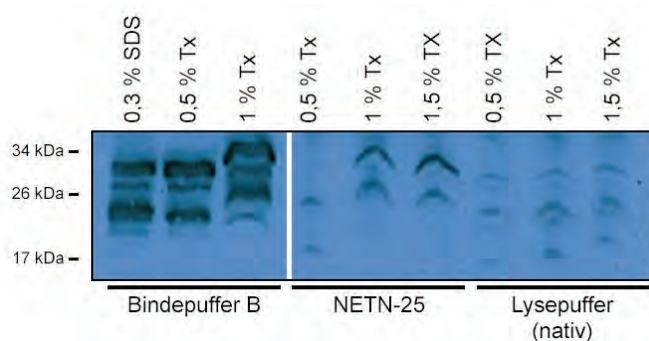


Abb. 3.31: Auswirkung von Triton-X 100 und SDS auf die Löslichkeit von HERV-K TM. Verglichen wurde hierbei der denaturierende Bindepuffer B mit den nativen Puffern NETN-25 und Lysepuffer (nativ). Primärantikörper: anti-HERV (1:5000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 1 sec Exposition.

Für die nachfolgende Analyse von HERV-K TM auf die Zytokinmodulation von PBMCs wurde eine Expressionskultur im Maßstab von 1000 ml in YPM Medium angesetzt und unter optimierten Kultivierungsbedingungen (III.2.2) durchgeführt (Durchführung siehe II.7.4). Nach 24 Stunden konnten 6,45 g Hefezellen (Feuchtgewicht) geerntet und mit Hilfe von Zymolyase (2 mg pro g Pellet) protoplastiert werden. Nach Resuspendieren der Protoplasten in Bindepuffer B erfolgte der vollständige Zellaufschluss durch 8x starkes Vortexen à 30 sec mit 1 Volumen Glaskugeln, gefolgt von einer 12 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht auf einem Überkopfschüttler. Die denaturierende Aufreinigung des hydrophilen transmembranen Hüllproteins HERV-K TM erfolgte unter standardisierten Bedingungen (II.7.5).

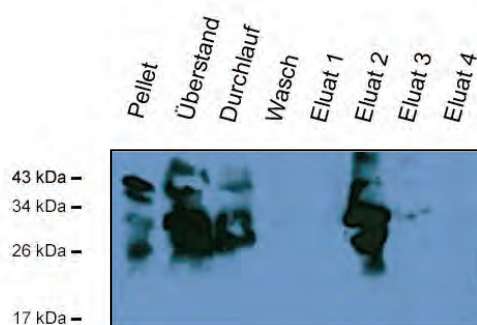


Abb. 3.32: Aufreinigung von HERV-K TM mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie. Primärantikörper: anti-His (1:1000), Sekundärantikörper: anti-Maus (1:2000), 5 sec Exposition.

Abbildung 3.32 zeigt die einzelnen Fraktionen der Ni-NTA Affinitätschromatographie. Bei Betrachtung der Pellet- und Überstandfraktion (beide beziehen sich auf den Zustand nach Zellaufschluss), so ist erkennbar, dass HERV-K TM erfolgreich produziert und auch solubilisiert wurde. Eluat 2 zeigte ebenfalls starke Signale auf der Höhe von 34 und 26 kDa, was in etwa der Größe von glykosyliertem bzw. unglykosyliertem HERV-K TM entspricht. Auch im Polyacrylamid Gel konnten starke HERV-Banden auf entsprechender Höhe gesichtet werden. Die Eluate 2 und 3 wurden gepoolt, 24 Stunden bei 4 °C gegen H₂O dialysiert (MWCO 3,5 kDa) und mit Hilfe der *Speed Vac* auf ein Volumen von ca. 400 µl reduziert. Zur Entfernung des SDS wurde eine sogenannte eiskalte Aceton-Methanol Fällung (II.7.9) durchgeführt und HERV-K TM in 400 µl PBS aufgenommen. Die Proteinkonzentration (II.7.8) betrug 1,36 mg ml⁻¹, was letztendlich einer Gesamtmenge von 544 µg HERV-K TM entsprach. Unter optimierten Bedingungen konnten somit in etwa 0,54 mg HERV-K TM pro 1 Liter Expressionskultur gewonnen werden.

III.2.4 Untersuchung der immunsuppressiven Eigenschaften von HERV-K TM

Für die Untersuchung der immunsuppressiven Eigenschaften von HERV-K TM wurden die humanen PBMCs mit verschiedenen Konzentrationen der HERV-K TM Präparationen inkubiert und anschließend ein IL-10 spezifischer ELISA mit den Überständen durchgeführt (II.7.10). Als Negativkontrolle wurde anstelle von HERV-K TM Kulturmedium verwendet.

Wie in Abbildung 3.33 zu sehen ist, konnte eine relativ hohe und HERV-K TM konzentrationsabhängige Sekretion von IL-10 induziert werden. Bei Inkubation mit 25 μg HERV-K TM wurde die höchste IL-10 Konzentration im ELISA mit ca. 840 pg ml^{-1} IL-10 detektiert. Mit sinkender HERV-K TM Einsatzmenge nahm auch die IL-10 Konzentration im Medium ab. Bei Inkubation mit 0,187 μg HERV-K TM erreichte die IL-10 Konzentration letztendlich einen Wert von 3,9 pg ml^{-1} , was der Konzentration in der Negativkontrolle entsprach.

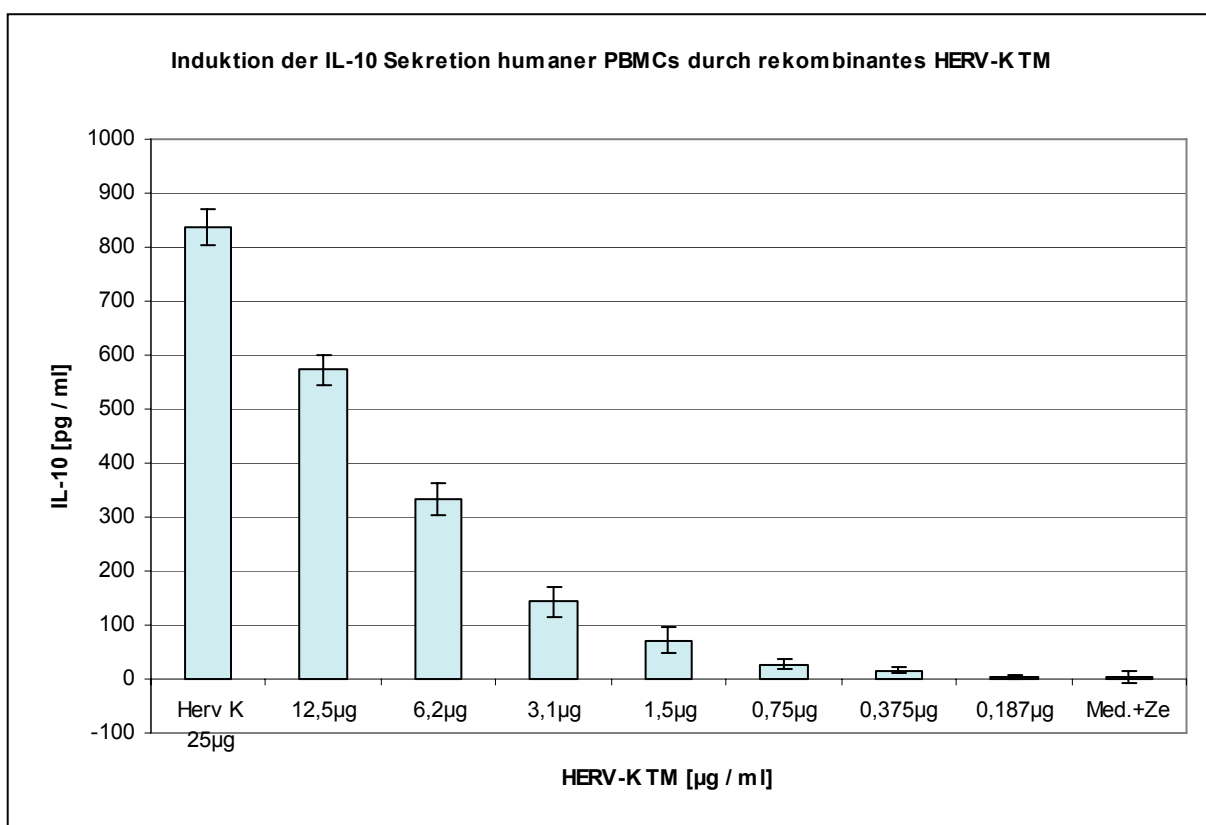


Abb. 3.33: IL-10 Sekretion humaner PBMCs nach Inkubation mit rekombinantem HERV-K TM aus *Hansenula polymorpha*. Frisch isolierte PBMCs gesunder Spender wurden 24 h mit unterschiedlichen Mengen HERV-K TM inkubiert und anschließend die IL-10 Konzentration in den Überständen mittels ELISA ermittelt.

IV DISKUSSION

Das humane Immundefizienz Virus 1 (HIV-1) induziert in seinem Wirt eine Immunsuppression, wobei der molekulare Mechanismus nach wie vor weitgehend unbekannt ist. In diesem Zusammenhang wird schon seit längerer Zeit die Beteiligung der immunsuppressiven Domäne (Isu), welche einem 17 Aminosäuren langen Abschnitt innerhalb der N-terminalen Helix Region von HIV-1 gp41 entspricht, diskutiert (Ruegg *et al.* 1989, Denner 1994, 1996, 2000). Nach Inkubation humaner PBMCs mit dem Isu-Peptid konnte eine Modulation der Cytokinproduktion beobachtet werden (Denner 1998, Tacke 2000). Diese Effekte konnten allerdings nur für das an einen Carrier, beispielsweise Bovines Serumalbumin (BSA), gebundene Isu-Peptid festgestellt werden (Denner *et al.* 1994). Für Untersuchungen der immunsuppressiven Eigenschaft werden diese mittlerweile synthetisch hergestellt und untereinander mittels EDC zu Homopolymeren gekoppelt (Behrendt 2005). Allerdings gehen hierbei aufgrund der niedrigen Kopplungseffizienz (etwa 20 %) große Mengen des Peptides verloren, wodurch sich dieses Verfahren als äußerst kostenintensiv darstellt.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte ein Expressionssystem etabliert werden, welches ausreichende Mengen rekombinanter von HIV-1 gp41 abgeleiteter Proteine, welche die Isu-Domäne enthalten, zur Verfügung stellt und darüber hinaus die Möglichkeit der Endotoxin-freien Produktion bietet. Aufgrund der Vielzahl publizierter positiver Eigenschaften schien das *Bacillus megaterium* Expressionssystem für die heterologe Expression rekombinanter von HIV-1 gp41 abgeleiteter Proteine geeignet zu sein. Ein weiteres Ziel war die optimierte Herstellung des gp36-Proteins des humanen endogenen Retrovirus-K, welches ebenfalls eine Isu-Domäne beinhaltet (I.1.3.5). Das Gen für HERV-K TM wurde bereits durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe stabil in das Genom der metylotrophen Hefe *Hansenula polymorpha* integriert (Dao Thi 2006) und für weitere Experimente zur Verfügung gestellt.

IV.1 HETEROLOGE EXPRESSION IN BACILLUS MEGATERIUM

Bei *B. megaterium* handelt es sich um ein Gram-positives Bodenbakterium, das bereits industriell im großen Maßstab zur Produktion einer Vielzahl an Enzymen und Wirkstoffen, wie z.B. β -Galactosidase (Rygus und Hillen 1991), Dextranucrase (Wang *et al.* 2005), Levansucrase (Malten *et al.* 2006) oder auch Clostridium difficile toxin A (Burger *et al.* 2003) genutzt wird. Die Attraktivität von *B. megaterium* für die heterologe Expression rekombinanter Proteine ist vor allem auf seine natürliche Proteasedefizienz, sein Wachstum auf einem breiten Spektrum günstiger Nährmedien, sowie seiner kompletten Apathogenität zurückzuführen. Im Gegensatz zu *E. coli* produziert es keine Endotoxine und ist in der Lage, Proteine über den sogenannten SEC-Transportweg in das Kulturmedium zu sekretieren. Hierbei bindet ein Signalpeptid unmittelbar nach seiner Translation durch die Ribosomen an spezielle Proteine des SEC-Systems und vermittelt den Transport des ungefalteten Proteins durch die Plasmamembran in den Raum zwischen Membran und Mureinsacculus. Nach Abspaltung des Signalpeptides durch eine Signalpeptidas Typ I wird die

weitere Proteinfaltung durch Chaperone unterstützt und das Protein diffundiert in das Kulturmedium (zusammengefasst in Tjalsma *et al.* 2004).

Der in dieser Arbeit verwendete Stamm MS941 ist eine Mutante des Stammes DSM319, bei dem das Gen für die extrazelluläre Protease NprM inaktiviert wurde. Somit sind sekretierte Proteine besser vor enzymatischem Abbau geschützt und liegen im Kulturmedium weitaus länger stabil vor (Wittchen und Meinhard 1995).

IV.1.1 Herstellung rekombinanter HIV-1 gp41 Verkürzungsmutanten

Die Fragmente plusNHR, plusNHR 4K, Δ NHR, Δ NHR 4K, Δ NHRloopCHR Δ , Δ NHRloopCHR Δ 4K, rgp, rgp 4K, CHR und CHR 4K (Abb. 3.2) konnten erfolgreich mittels PCR amplifiziert (III.1.1) und in den Expressionsvektor pSTREP-HIS1525 (II.3.2.1) kloniert werden. Die Fragmente plusNHR, plusNHR 4K, Δ NHR und Δ NHR 4K stellen die kleinsten Vertreter der hergestellten gp41 Verkürzungsmutanten dar und beinhalten die Isu-Domäne von HIV-1 gp41. Die Fragmente Δ NHRloopCHR Δ , Δ NHRloopCHR Δ 4K beinhalten Abschnitte der C-terminalen Helixregion, während rgp, sowie rgp 4K die gesamte CHR beinhalten. Wie bereits unter I.1.4 erläutert, interagieren NHR und CHR miteinander, resultierend in einer starken Konformationsänderung von gp41 (Ausbildung des Sechs-Helix Bündels) (Abb. 1.6). Da die Isu-Domäne in dieser Konformation unter Umständen besser exponiert vorliegt, wurden unterschiedliche gp41 Verkürzungsmutanten konstruiert. Die Fragmente CHR und CHR 4K beinhalten nicht die Isu-Domäne und sollten in weiteren Untersuchungen als Negativkontrollen verwendet werden. Des Weiteren wurde zur Erhöhung des Expressionslevels von Δ NHR 4K eine Codon-optimierte Variante synthetisch hergestellt (III.1.2) und das Gen in die Vektoren pSTREP-HIS1525 und pC-HIS1622 (II.3.2.2) kloniert. In pSTREP-HIS1525 klonierte Gene werden als Fusionspeptide exprimiert, welche am N-terminus das Signalpeptid der extrazellulären Esterase LipA (SP_{LipA}) aus *B. megaterium* enthalten und somit über den SEC-Transportweg in das umgebene Kulturmedium sekretiert werden können (Biedendieck 2006). An SP_{LipA} schließt sich ein *StreptII*-tag und am proximalen C-Terminus ein RGS-6xHis-tag an. Diese beiden tags ermöglichen die Aufreinigung des Fusionspeptides mittels *Strep*-Tactin- und / oder Ni-NTA Affinitätschromatographie. Um darüber hinaus eine ausschließlich in der intrazellulären Proteinfraction angereicherte gp41 Verkürzungsmutante zu erhalten, wurde das Codon-optimierte und synthetisch hergestellte Gen für Δ NHR 4K in den Vektor pC-HIS1622 kloniert. Im Gegensatz zu pSTREP-HIS1525 fehlt dem Expressionsvektor pC-HIS1622 die SP_{LipA} -Sequenz, sowie der *StreptII*-tag. In beiden Vektoren steht das Fusionsprotein unter der Kontrolle des starken, streng regulierten Promotors P_{XylA} , wodurch eine Induktion der Proteinproduktion durch Zugabe von 0,5 bis 2 % (w/v) D-Xylose zum Kulturmedium erfolgen konnte. Rygus und Hillen (1991) konnten bei Nutzung des Xylose Operons eine 130- bis 350-fach verstärkte Genexpression feststellen.

Zur Klonierung der mittels PCR amplifizierten Fragmente wurden *primer* (II.3.3) verwendet, welche die Restriktionsschnittstellen *Sac* I und *Sph* I, gefolgt von je zwei Basen am 5' Terminus beinhalteten. Interessanterweise mussten für die Ligation der resultierenden *inserts* mit den Expressionsvektoren auffallend hohe Mengen an Vektor (200 ng) und *insert* (in einem molaren Verhältnis von 1:5) eingesetzt werden, während bei Standardligationen in der Regel einige wenige Nanogramm ausreichen. Da dies für beide Vektoren festgestellt werden konnte, muss die Ursache für die Ineffizienz der Ligation auf die amplifizierten und restringierten *inserts* zurück zu führen sein. Einen weiteren Hinweis hierfür liefert die problemlose Klonierung des Codon-optimierten und synthetisch hergestellten Gens für Δ NHR 4K. Dieses wurde nach Synthese in Form eines 2,5 kB großen Vektors geliefert und konnte nach Restriktion problemlos unter Standardbedingungen (5 ng Vektor) in pSTREP-HIS1525 und pC-HIS1622 kloniert werden. Restriktionsendonukleasen schneiden meist ineffizient an unmittelbaren Enden von DNA-Strängen und benötigen zur Anlagerung an die zu restringierende DNA häufig noch weitere Nukleotide stromauf- bzw. stromabwärts der Restriktionsschnittstelle (Kaufmann und Evans 1990).

Nach erfolgter Sequenzierung konnte *B. megaterium* MS941 erfolgreich mit den Konstrukten pSB1, pSB3, pSB4, pSB4*, pSB5, pSB10 und pSB16* (siehe Tabelle 3.3) transformiert werden. Allerdings konnte nur für die Konstrukte pSB1 (*StreptII*-plusNHR-His) und pSB4 (*StreptII*- Δ NHR 4K-His) eine Überexpression nachgewiesen werden (III.1.6), wobei *StreptII*- Δ NHR 4K-His weitaus stärker, als *StreptII*-plusNHR-His produziert wurde (Abb. 3.8-A). Die Western Blot Analyse zeigte weiterhin, dass die rekombinanten Proteine in der intra-, als auch in der extrazellulären Proteinfraction vorhanden waren. Im Coomassie gefärbten SDS Polyacrylamid Gel (Abb. 3.8-B) konnten ebenfalls in den Spuren „Pellet“, als auch in der Spuren „Medium“ auf Höhe der erwarteten Proteine intensive Banden erkannt werden. Allerdings traten diese Banden mit ähnlicher Intensität in den Spuren auf, bei denen im Western Blot kein Signal detektiert wurde. Hieraus lässt sich schließen, dass die rekombinanten gp41 Verkürzungsmutanten durch bazilluseigene Proteine der gleichen Größe überlagert wurden. Somit ergab sich das Problem, dass Coomassie gefärbte Gele nicht für die Identifikation der gesuchten Proteine ausreichten und zum Proteinnachweis jeweils Western Blot Analysen durchgeführt werden mussten. Weiterhin zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke zweier, das gleiche Konstrukt exprimierender Klone. Während für Klon BmMS941 pSB4 (#18) im Western Blot sehr starke Signale nachgewiesen werden konnten, wurden für Klon BmMS941 pSB4 (#24) lediglich vergleichbar schwache (Abb. 3.9) detektiert. Von insgesamt über 500 getesteten Klonen konnten letztendlich rund 200 mittels *colony*-PCR für positiv befunden werden, wovon lediglich drei das entsprechende Transgen exprimierten.

IV.1.2 Optimierte Protoplastenherstellung und Transformation von *B. megaterium*

Da die Nutzung kommerzieller transformationskompetenter *B. megaterium* WH320 Protoplasten (MoBiTec, Göttingen) ausgesprochen hohe Kosten erzeugte und der für die Sekretion rekombinanter Proteine optimierte Stamm MS941 zudem nicht erhältlich war, wurden diese vor Transformation selber hergestellt. Gram-positive Bakterien besitzen, im Gegensatz zu Gram-negativen, einen mehrschichtigen von bis zu 100 nm dicken Mureinsacculus, welcher zwischen 20 bis zu 70 % der Zelltrockenmasse ausmacht (Seltmann und Holst 2002). Aufgrund dieser Physiologie muss zur Transformation von *B. megaterium* in einem ersten Schritt der Mureinsacculus degradiert werden, wodurch transformationskompetente Protoplasten entstehen. Das Enzym Lysozym spaltet hierbei β -1,4-glykosidische Bindungen der Peptidoglycane und baut effizient die bakterielle Zellwand ab (Blake *et al.* 1965, Ito *et al.* 1993). Die Herstellung von Protoplasten wurde in dieser Arbeit nach Puyet *et al.* (1987) mit Modifikation durchgeführt (II.6.15 und II.6.16).

Es konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der Protoplastenherstellung bei Einsatz von Lysozym in einer Endkonzentration von $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ bei einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C mit $31,4 \text{ cfu pro } \mu\text{g DNA}$ am höchsten war (Abb. 3.7). Wurden kürzere (15 min) oder auch längere Inkubationszeiten (60 min) gewählt, so führte dies zu niedrigeren Transformationseffizienzen. Offensichtlich wurde nach 15 min der Mureinsacculus noch nicht ausreichend abgebaut, während eine Inkubationszeit von 60 min zur Lyse der Protoplasten geführt haben könnte. Bei Einsatz von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ und auch $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ wurden ebenfalls weit aus niedrigere Effizienzen beobachtet. Grund hierfür ist wahrscheinlich der schon erwähnte, dass zu hohe Lysozymkonzentrationen den Mureinsacculus zu stark abbauen und die fragilen Protoplasten zügig lysieren (Ball, Edwards 1989). Dennoch war selbst bei Einsatz von 2 mg ml^{-1} die Transformationseffizienz vergleichsweise niedrig. Während für *E. coli* durch Elektroporation Werte von bis zu $10^{10} \text{ cfu pro } \mu\text{g DNA}$ erreicht werden, konnten *B. megaterium* Protoplasten lediglich mit einer Transformationseffizienz von $31,4 \text{ cfu pro } \mu\text{g DNA}$ transformiert werden.

Diese Werte konnten allerdings durch den Einsatz von cR5-top Agar (Biedendieck 2006) auf ca. $10^2 \text{ cfu pro } \mu\text{g DNA}$ erhöht werden. Hierzu wurden transformierte Protoplasten mit flüssigem cR5-top Agar (42°C) versetzt, das Gemisch wurde vor Erstarren auf eine LB-Tet Platte ausplattiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Vermutlich gewährleistet der Einsatz von cR5-top Agar eine bessere Nährstoffversorgung der regenerierten Protoplasten und führte somit zu mehr positiven Klonen. Die erreichten Transformationseffizienzen entsprachen letztendlich denen, für die Herstellung transformationskompetenter *B. megaterium* Protoplasten, erwarteten Werten (Biedendieck 2006).

IV.1.3 Einfluss der Codon-Optimierung auf das Expressionslevel von *StreptII-ΔNHR 4K-His*

Um die Expression von *StreptII-ΔNHR 4K-His* weiter zu erhöhen, wurde die entsprechende Sequenz Codon-optimiert und anschließend synthetisch hergestellt. Ausgehend von einem CAI (*codon adaption index*) von 0,49 konnte dieser letztendlich auf 0,96 angehoben werden (III.1.2). Der CAI ist ein Maß für die Anpassung einer gegebenen Sequenz an die optimale „*codon usage*“ eines Referenzorganismus, wobei der Index zwischen 0 und 1 variieren kann und 1 die ausschließliche Nutzung optimaler Codons bedeutet. Da der GC-Gehalt des *B. megaterium* Genoms bei etwa 39 % liegt (Nakamura *et al.* 2000), wurde auch dieser bei der Codon-Optimierung berücksichtigt. Im Zuge dessen wurde der GC-Gehalt von 51 % auf 32 % gesenkt (Abb. 3.6). Jia und Li konnten 2005 für *E. coli* beschreiben, dass Gene mit einem CAI < 0,3 in der Regel sehr schwach bis gar nicht exprimiert werden. Biedendieck zeigte 2006 an einigen Beispielen, dass codon-optimierte Gene, welche vor Optimierung einen CAI < 0,3 aufwiesen, durch Erhöhung des CAI > 0,9 stark in *B. megaterium* exprimiert wurden.

Entgegengesetzt der Erwartungen konnte nach Klonierung des Codon-optimierten Gens für *ΔNHR 4K* in die Vektoren pSTREP-HIS1525 und pC-HIS1622 gar kein Genprodukt detektiert werden (Abb. 3.8), während die nicht-optimierte Variante exprimiert wurde (Abb. 3.8). Somit wird deutlich, dass eine Anpassung der Nukleotidsequenz eines Gens an die jeweilige *codon usage* nicht unweigerlich zu einer erhöhten Expression führt. Eine plausible Erklärung könnte in diesem Fall die Ausbildung von Sekundärstrukturen in der mRNA sein. Wird beispielsweise die Shine Dalgarno Sequenz einer mRNA durch Sekundärstrukturen verdeckt, so ist diese für Ribosomen nicht mehr frei zugänglich und eine Translation der entsprechenden mRNA bleibt aus. Die Beobachtung, dass eine Codon-Optimierung zu keiner Erhöhung der Proteinexpression oder unter Umständen sogar zu einer verringerten Proteinexpression führt, konnte bereits durch Alexeyev und Winkler (1999), sowie Griswold *et al.* (2003) beschrieben werden. In diesem Fall wäre eine weitere Strategie zum Ausgleich der Limitationen durch seltene Codons, die Überexpression der entsprechenden Anticodon-tRNAs im Wirtsorganismus. Dies könnte beispielweise durch Integration der entsprechenden Gene in das *Bazillus* Genom erfolgen, sodass seltene Anticodon-tRNAs coexprimiert werden.

IV.1.4 Optimierte Kultivierungsbedingungen für die Expression von *StreptII-ΔNHR 4K-His*

Für die Expression von *StreptII-ΔNHR 4K-His* in *B. megaterium* MS941 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die höchsten Proteinmengen bei einer Temperatur von 37 °C sechs bis acht Stunden nach Induktion der Proteinexpression erreicht wurden (Abb. 3.11 und 3.12). Allerdings waren diese Proteinmengen zu gering, um in Coomassie gefärbten Polyacrylamid Gelen erkennbar zu sein (Abb. nicht gezeigt). Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von Xylose in einer Endkonzentration von 0,5 bzw. 1 % (w/v) bei einer optischen Dichte (OD_{600 nm}) von 0,3 bzw. 0,5. Bei einer Temperatur von 30 °C konnte bereits zwei Stunden nach Induktion *StreptII-ΔNHR 4K-His* im Kulturmedium detektiert werden, während bei 37 °C erst vier Stunden nach Induktion vergleichbar starke Sekretion nachgewiesen wurde. Nach 24 Stunden fiel die

Proteinkonzentration im Vergleich zu 8 Stunden in der intrazellulären Fraktion (Pellet) etwas ab, während das Kulturmedium nach dieser Zeit frei von rekombinanten *StreptII-ΔNHR* 4K-His war. Grund hierfür könnte der Übergang von *B. megaterium* in die stationäre Wachstumsphase nach acht Stunden (bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von etwa 4 bis 6), gefolgt von einer späteren Absterbephase sein. In diesen Phasen kommt es vermehrt zur Degradation von Proteinen durch Lyse der Bakterien und einer erhöhten Proteaseaktivität. Dies ist auch der Hauptgrund für die Wahl des *B. megaterium* Stammes MS941, für den gezeigt werden konnte, dass hergestellte und sekretierte Proteine bis zu acht Stunden stabil im Kulturmedium vorlagen. Dies ist auf die Inaktivierung des Gens für die extrazellulären Protease NprM zurück zu führen, während sekretierte Proteine aus dem Stamm DSM319 und auch WH320 bereits nach vier Stunden stark degradiert wurden (Wittchen und Meinhard 1995). Dennoch verblieben große Mengen an *StreptII-ΔNHR* 4K-His intrazellulär, wodurch jeweils die extra-, sowie auch intrazellulären Proteinfractionen aufgereinigt werden mussten (Abb. 3.12).

Aufgrund des insgesamt geringen Expressionslevels ist es wünschenswert, den Anteil sekretierter Proteine zu erhöhen und somit die rekombinanten Proteine in der extrazellulären Fraktion zu konzentrieren. Dies könnte beispielsweise durch Koexpression einer entsprechenden Signalpeptidase bewerkstelligt werden. Es wurde berichtet, dass die Koexpression des Typ I Signalpeptidase Gens *sipM* in *B. megaterium* in einer 3,7-fachen Erhöhung der Proteinsekretion resultierte und somit die Sekretionskapazität deutlich erhöhte (Malten *et al.* 2005). Erklärbar ist dies durch die Tatsache, dass die Entfernung des Signalpeptides eines Vorläuferproteins einen absolut notwendigen und somit auch limitierenden Schritt für die Proteinsekretion in *B. megaterium* darstellt (siehe VI.1). Weiterhin konnte durch Koexpression des extrazellulären Chaperon PrsA eine 4-fache Erhöhung der α -Amylasesekretion (Vitikainen *et al.* 2005) und eine 1,6-fache Erhöhung der Sekretion eines *single-chain* Antikörpers in *B. subtilis* (Wu *et al.* 1998) erreicht werden.

In weiteren Experimenten hinsichtlich der Ermittlung optimaler Bedingungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Zeitpunkt der Induktion einen relativ geringen Einfluss auf die Höhe der Proteinproduktion hatte (Abb. 3.13-A).

Weiterhin wurde untersucht, ob die Nutzung des weitaus nährstoffreicheren TB Mediums, anstelle von LB Medium, einen positiven Einfluss auf die Höhe der Produktausbeute haben könnte. Erwartungsgemäß wurde bei Kultivierung der Bazillen in TB Medium eine weitaus höhere Biomasse erreicht, als dies in LB Medium der Fall war (Abb. 3.15). Während in LB Medium nach etwa acht Stunden die stationäre Phase mit einer gemessenen $OD_{600\text{ nm}}$ von etwa 4,5 eintrat, konnte für in TB kultivierte Bazillen eine $OD_{600\text{ nm}}$ von ca. 10 gemessen werden (Abb. 3.15). Allerdings führte der Einsatz von TB Medium entgegen allen Erwartungen zu einer Erniedrigung der Proteinproduktion (Abb. 3.14). Während die intrazelluläre Proteinfraction der in TB Medium kultivierten Bazillen weitaus weniger *StreptII-ΔNHR* 4K-His, als die der in LB kultivierten beinhaltete, konnte im Kulturmedium gar kein *StreptII-ΔNHR* 4K-His nachgewiesen werden. Somit erwies sich LB als besser geeignetes Kultivierungsmedium für *B. megaterium*. Dennoch könnte ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der rekombinanten Proteinproduktion die Suche nach einem besser

geeigneten Medium sein. Für das Medium A5 konnte beispielweise eine 4-fach erhöhte Proteinproduktion in *B. megaterium* WH320 im sog. Hoch-Zelldichte-Kultivierungsverfahren gezeigt werden (Biedendieck 2006).

IV.1.5 Aufreinigung von rekombinant hergestelltem *StreptII-ΔNHR* 4K-His

Unter nativen Bedingungen war es nicht möglich, *StreptII-ΔNHR* 4K-His mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie in ausreichenden Mengen und vor allem in reiner Form zu isolieren (Abb. 3.19). Als Hauptproblem stellte sich die Bindung des rekombinanten Proteins an die Ni-NTA Agarose dar, sodass der Hauptanteil des Proteins nach Auftragung auf die Affinitätssäule in der Durchflussfraktion zu finden war (Abb. 3.16). Zwar konnten relativ kleine Mengen in den Elutionsfraktionen detektiert werden, allerdings lagen diese unterhalb der Nachweisgrenze für ein Coomassie gefärbtes SDS Polyacrylamid Gel. Eine Möglichkeit zur verbesserten Bindung rekombinanter Proteine an die Ni-NTA Agarose stellt die Bindung im sogenannten Batch-Verfahren dar, welches nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) für schwach exprimierte Proteine (< 0,1 mg pro l Expressionskultur) empfohlen wird.

Um die Bindung weiter zu erhöhen, wurden zudem acht weitere Bindepuffer getestet. Hierfür wurden jeweils 0,5 g (Feuchtgewicht) frisch geernteter Pellets in den einzelnen Puffern resuspendiert, wie unter II.7.2.1 beschrieben aufgeschlossen und auf *Qiagen Ni-NTA Mini Spin columns* gegeben. Zur weiteren Analyse wurde ein Western Blot durchgeführt, wobei lediglich der Überstand nach Lyse, sowie der entsprechende Durchfluss analysiert wurde. Hierbei konnten durch Verwendung von Puffer T20N600B5 (Tab. 3.5) die besten Resultate (Abb. 3.17) erzielt werden. In Überstand 2 (ÜS2) konnte ein stärkeres Signal, als im Durchfluss 2 (D2) auf der erwarteten Höhe detektiert werden, was dem rekombinanten Protein entsprach. Bei allen anderen Proben entsprachen die Intensität der detektierten Signale der Überstände in etwa denen der Durchflussfraktionen.

Nach Ermittlung eines für die Bindung besser geeigneten Puffers konnte *StreptII-ΔNHR* 4K-His aufgereinigt werden. Wie in Abb. 3.18-A zu sehen ist, konnte nach Nutzung von T20N600B5 in allen Elutionsfraktionen *StreptII-ΔNHR* 4K-His detektiert werden. Auch auf dem entsprechenden Coomassie gefärbten SDS Polyacrylamidgel (Abb. 3.18-B) konnten Banden auf Höhe von etwa 12 kDa erkannt werden. Da die untere Nachweisgrenze für mit Coomassie G-250 gefärbte Polyacrylamidgele bei etwa 0,5 µg Protein pro Bande liegt (Kang *et al.* 2002), konnte die Konzentration von *StreptII-ΔNHR* 4K-His auf mindestens 15 µg ml⁻¹ und somit insgesamt mindestens 75 µg *StreptII-ΔNHR* 4K-His in allen fünf Eluatn berechnet werden. Aufgrund des niedrigen Reinheitsgrades der Proben würde eine genauere Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Nachweis (II.7.8) keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern. Die Banden auf Höhe von etwa 15 kDa konnten in einer vergleichenden Gelelektrophorese (Abb. nicht dargestellt) als Lysozym identifiziert werden, welches zum Zellaufschluss verwendet wurde.

Zur Erhöhung des Reinheitsgrades des rekombinanten *StreptII-ΔNHR* 4K-His wurde eine 2-Schritt-Aufreinigungsstrategie entwickelt. Wie in II.3.2.1 beschrieben, werden in pSTREP-HIS1525 kodierte Gene als Fusionspeptid mit einem N-terminalen *StreptII*-tag und einem C-terminalen His-tag translatiert, wodurch diese Proteine mittels Ni-NTA und auch *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie aufgereinigt werden können. Da laut Hersteller die für die Ni-NTA Affinitätschromatographie verwendeten nativen Puffer kompatibel mit dem *Strep*-Tactin System sind, konnten die Eluate ohne Umpufferung für eine *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie verwendet werden. Allerdings führte die erneute Aufreinigung mittels *Strep*-Tactin nicht zu einem erhöhten Reinheitsgrad von *StreptII-ΔNHR* 4K-His, da auch in diesem Fall die Bindung der rekombinanten Proteine an die *Strep*-Tactin Matrix absolut ineffizient verlief (Abb. 3.20).

Ein Grund für die schlechte Bindung von *StreptII-ΔNHR* 4K-His an die Ni-NTA Agarose könnte zudem sein, dass der C-terminale His-tag nicht, oder nur teilweise exponiert wurde. Außerdem ist aus Abb. 3.18-A ersichtlich, dass nach Lyse der Bazillen nach wie vor große Proteinanteile im aufgeschlossenen Zellpellet verblieben. Wie in I.1.4 bereits erläutert, kommt es bei der Membranfusion der viralen mit der Wirtsmembran zur Ausbildung des sogenannten Sechs-Helix-Bündels. Diese Konformation wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der CHR und NHR Domäne ausgebildet und liefert somit eine Erklärung für die verminderte Löslichkeit von *StreptII-ΔNHR* 4K-His. Aus diesem Grund und aufgrund der geringen Effizienz der nativen Proteinaufreinigung, wurden zusätzlich Aufreinigungen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Abb. 3.21-A und B). Diese zeigten, dass *StreptII-ΔNHR* 4K-His unter denaturierenden Bedingungen nahezu vollständig aus dem Zellpellet gelöst werden konnte (Abb. 3.21-A). Da im Western Blot kein Signal in der Durchflussfraktion zu finden war, schien die Bindung im Vergleich zur nativen Aufreinigung sehr gut funktioniert zu haben. Auch in den Eluaten konnte *StreptII-ΔNHR* 4K-His detektiert werden. Doch auch in diesem Experiment wurden keine Banden auf der erwarteten Höhe von etwa 12 kDa im Coomassie gefärbten SDS Polyacrylamid Gel (Abb. 3.21-B) sichtbar, was wiederum für eine deutlich zu niedrige Proteinproduktion spricht. Die Banden auf Höhe von etwa 15 kDa entsprechen dem für den Zellaufschluss verwendeten Lysozym.

Da die Aufreinigung der intrazellulären Proteinfraction unter den gewählten nativen, als auch denaturierenden Bedingungen nicht zu reinen Proben führte, wurden weitere Experimente zur Aufreinigung von *StreptII-ΔNHR* 4K-His aus unkonzentriertem und konzentriertem Kulturmedium durchgeführt. Nachdem erste Versuche, *StreptII-ΔNHR* 4K-His aus unkonzentriertem Kulturmedium aufzureinigen (III.1.9.1) fehlschlagen, wurde *StreptII-ΔNHR* 4K-His zu erst mittels Ammoniumsulfatfällung gefällt und anschließend wurde das erhaltene Konzentrat aufgereinigt. Hierbei konnte für *StreptII-ΔNHR* 4K-His gezeigt werden, dass dieses erst bei einer Ammoniumsulfatsättigung von 40 bis 60 % präzipitierte (Abb. 3.22). Somit konnten Proteine, welche unterhalb einer Sättigung von 40 % und oberhalb von 60 % ausfielen, separiert werden. Durch Resuspension des Proteinpellets in Bindepuffer B sollte *StreptII-ΔNHR* 4K-His rechnerisch in etwa 9,5-fach konzentriert und das Konzentrat ebenfalls mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie

aufgereinigt (Abb. nicht gezeigt). Allerdings führte auch dieser Ansatz nicht zu reinem *StreptII-ΔNHR 4K-His*.

Bacillus megaterium stellt in der Regel ein sehr effizientes prokaryotisches Expressionssystem dar, welches allerdings nicht für die Produktion von HIV-1 gp41 Verkürzungsmutanten etabliert werden konnte. Aufgrund der ausgesprochen niedrigen Transformationseffizienz von etwa 10^2 cfu pro μg DNA stellte bereits die Transformation der hergestellten Protoplasten große Schwierigkeiten dar. Eine Vielzahl an Klonen (> 500) wurde auf das Vorhandensein des entsprechenden Transgens geprüft, wovon letztendlich ca. 200 mittels *colony*-PCR bestätigt wurden. Allerdings konnte lediglich für zwei Klone eine sehr schwache und für einen einzigen eine schwache Proteinproduktion nachgewiesen werden. Eine Vielzahl für die Expression, als auch für die Aufreinigung relevanter Parameter konnte ermittelt werden und führte zu einer leichten Produktivitätssteigerung. Dennoch produzierten alle drei Klone die von HIV-1 gp41 abgeleiteten Proteine an der unteren Nachweisgrenze von Coomassie Blue gefärbten SDS Polyacrylamid Gelen, wodurch sich diese nicht effizient aufreinigen ließen.

Ginsburgh *et al.* (1989) konnten allerdings durch Nutzung des Sporulationspromotors *spoVG* aus *B. subtilis* erfolgreich HIV-1 Proteine in *B. megaterium* herstellen, während dies bei Nutzung des in dieser Arbeit verwendeten Promotors p_{xyI} anscheinend noch nicht der Fall war. Außerdem zeigen weitere Berichte, dass einige *Bacillus* Spezies für spezifische Gene bessere Wirtsorganismen darstellen, als andere (zusammengefasst in Vary 1992). Unter Umständen könnte die Nutzung von bspw. *B. subtilis* zu einer starken Expression der gp41 Verkürzungsmutanten führen, während dies in *B. megaterium* nicht der Fall ist.

IV.2 PRODUKTION VON HERV-KTM IN *HANSENULA POLYMORPHA*

Daten des humanen Genomprojektes zeigen, dass ca. 8% des gesamten humanen Genoms aus retroviralen Sequenzen besteht (Lander *et al.* 2001), wobei der überwiegende Teil dieser Proviren aufgrund verschiedener Mutationen defekt ist. Der Ursprung heutiger humaner endogener Retroviren sind retrovirale Proviren, die vor ca. 40 Millionen Jahren ins Genom unserer Vorfahren eingebaut wurden (Lower *et al.* 1996). Aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks bezüglich infektiöser Viruspartikel und der Ansammlung von Mutationen im Laufe der Jahre, wird der Großteil dieser Viren nicht transkribiert und ist nicht mehr replikationskompetent. Nur wenige endogene Retroviren besitzen ein vollständiges Genom vergleichbar mit dem exogener Retroviren (Bannert und Kurth 2004). Im Gegensatz zu anderen HERV-Familien, die durch Deletionen und andere Mutationen stark geschädigt sind, sind einige Mitglieder der HERV-K-Familie weitestgehend intakt und stellen somit die biologisch aktivste Familie innerhalb der humanen endogenen Retroviren dar. Indirekte Hinweise auf die Expression von HERV-K konnten zunächst in Untersuchungen mit Seren von verschiedenen Patienten gewonnen werden. Bei Patienten mit Hodentumoren oder Leukämien, aber auch bei Schwangeren konnte eine erhöhte ELISA-Aktivität gegen synthetische Proteine von HERV-K gefunden werden (Denner *et al.* 1995). So zeigten 45% aller Patienten mit Hodentumor eine Reaktion gegen synthetische Peptide des transmembranen Hüllproteins von HERV-K, darunter 58% mit Teratokarzinom. Erhöhte Antikörpertiter gegen rekombinantes Env-Protein konnten bei 85% der Patienten mit Seminom oder anderen Keimzelltumoren festgestellt werden, vor allem gegen den Anteil des transmembranen Hüllproteins (Sauter *et al.* 1996).

Für das transmembrane Hüllprotein gp36 des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-KTM) konnte gezeigt werden, dass dieses in malignen Tumoren überexprimiert wird (Büscher *et al.* 2005, 2006). Der Zusammenhang zwischen Entstehung von Tumoren sowie einer beobachteten Immunsuppression und der Expression von HERV-K Sequenzen, im Besonderen von gp36, ist noch nicht geklärt. Ergebnisse der bisherigen Forschung auf diesem Gebiet lassen jedoch darauf schließen, dass zumindest eine Verknüpfung dieser beiden Ereignisse besteht, wobei die Art dieser Verbindungen noch unbekannt ist.

Um eventuelle Rückschlüsse auf *in vivo* Funktionen und die Wirkweise von HERV-KTM und seiner immunsuppressiven Domäne (siehe Tab. 1.1) ziehen zu können, inwiefern es beispielsweise immunmodulatorisch in das Wirtssystem eingreifen und somit das Tumorwachstum begünstigen könnte, ist es unumgänglich dieses rekombinant für weitere Untersuchungen herzustellen.

Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Dao Thi 2006) wurde das Gen für HERV-KTM in den Vektor pFPMT121 (II.3.2.5) kloniert und erfolgreich in das Genom von *Hansenula polymorpha* integriert. Um zu Überprüfen, ob HERV-KTM eine immunsuppressive Wirkung auf humane PBMCs ausübt, wurde das Protein in *H. polymorpha* RB11 hergestellt und aufgereinigt. HERV-KTM wurde anschließend auf seine immunsuppressiven Eigenschaften mittels eines IL-10 spezifischen ELISA untersucht. Hierzu wurden frisch isolierte, humane PBMCs mit HERV-KTM für 24 Stunden inkubiert und anschließend wurde die produzierte Menge an IL-10 im Kulturmedium gemessen. In vorhergehenden Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Inkubation

humaner PBMCs mit dem transmembranen Hüllprotein gp36 von HERV-K eine Erhöhung der IL-10 Sekretion bewirkte (Dao Thi 2006, Akyüz 2008), während proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-2, IL-12, Interferon γ (IFN γ) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) herunter reguliert wurden. IL-10 wurde somit als indirekter Nachweis für eine Immunsuppression verwendet.

IV.2.1 Herstellung von rekombinantem HERV-K TM in *Hansenula polymorpha*

Das günstige und leicht zu handhabende *E. coli* Expressionssystem ist häufig nicht in der Lage, korrekt gefaltete Fremdproteine herzustellen. Des Weiteren fehlt es an der Möglichkeit zur posttranslationalen Modifikation humaner Proteine und darüber hinaus produziert es große Mengen an Endotoxinen. Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, konnte für bakterielle Endotoxine nachgewiesen werden, dass diese die Expression von Cytokinen in Makrophagen und Lymphozyten modulieren und darüber hinaus zur Inflammation oder auch Apoptose führen (Beutler und Cerami 1988, Dinarello 1991). Aus diesen Gründen war es unumgänglich, ein alternatives Produktionssystem zur Herstellung von rekombinantem, Endotoxin-freiem HERV-K TM zu wählen.

Generell eignen sich Hefen sehr gut zur Produktion rekombinanter Proteine, da sie leicht zu kultivieren sind und in der Regel hohe Expressionslevels aufweisen. Außerdem besitzen sie die Möglichkeit, posttranslationale Modifikation durchzuführen und produzieren zudem keine Endotoxine. Die methylotrophe Hefe *H. polymorpha* ist im Gegensatz zu *S. cerevisia* in der Lage, Methanol als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Dies führt zu höheren Zelldichten und ermöglicht darüber hinaus den Einsatz des starken, induzierbaren Promotor der Methanol Oxidase (MOX) (Gellissen *et al.* 1994).

In einem Vorversuch konnte bestätigt werden, dass der in dieser Arbeit verwendete *H. polymorpha* Stamm das Gen für HERV-K TM im Genom integriert (Abb. 3.24) hatte und die Nukleotidsequenz der ursprünglichen HERV-K TM Sequenz entsprach (Abb. 3.25). Allerdings konnten nach Verwendung bestehender Standardprotokolle zur Expression von HERV-K TM lediglich geringe Mengen hergestellt werden. Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung konnte durch Western Blot Analysen mittels HERV-spezifischen Antikörpern die Expression von HERV-K TM bestätigt werden. Allerdings lagen diese Mengen unterhalb der Nachweisgrenze eines Coomassie gefärbten SDS Polyacrylamid Gels und eine Vielzahl weiterer unspezifischer Proteine war zu sehen. Da solch eine Probe absolut ungeeignet für jegliche Folgeexperimente war, wurden zunächst Anstrengungen zur Erhöhung des Expressionslevels von HERV-K TM unternommen.

IV.2.2 Optimierte Bedingungen zur Produktion von HERV-K TM in *Hansenula polymorpha*

In Testexpressionen (Induktion mit 2 % (w/v) Methanol) konnte zehn Stunden nach Induktion der Expression unter den gewählten Bedingungen die höchste Proteinproduktion erreicht werden (Abb. 3.26). Das errechnete Molekulargewicht von HERV-K TM ist 25 kDa, jedoch konnte Dao Thi 2006

in ihrer Diplomarbeit zeigen, dass HERV-K TM vier N-Glykosylierungsstellen aufweist und die deutliche Bande in Höhe von etwa 34 kDa der glykosylierten Form entsprach (Abb. 3.26).

24 Stunden nach Induktion konnte nicht deutlich mehr Protein, als nach 10 Stunden detektiert werden. Durch Verstoffwechslung der einzigen Kohlenstoffquelle sank die Methanolkonzentration vermutlich nach zehn Stunden unter einen kritischen Wert, sodass die stationäre Wachstumsphase eingeleitet wurde. Überraschenderweise wurde in der Negativkontrolle nach 24 Stunden ebenfalls HERV-K TM detektiert. Dieses Ergebnis wurde nicht erwartet, da in diesem Fall 2 % (w/v) Glucose als Kohlenstoffquelle diente und der MOX-Promotor somit weiterhin reprimiert bleiben müsste. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der verwendete Promotor zwar stark induzierbar ist, aber dennoch eine leichte konstitutive Basalexpression zulässt. Eine weitere Erklärung ist der Verbrauch der Kohlenstoffquelle Glucose nach 24-stündiger Kultivierung. Für den MOX-Promotor konnte eine allgemeine Derepression des Promotors für Glucosekonzentrationen unterhalb von 0,5 % nachgewiesen werden (Gellissen 2002).

Um toxische Effekte durch zu hohe Methanolkonzentrationen auszuschließen und gleichzeitig eine gute Induktion des Promotors zu gewährleisten, ist es wichtig, die Methanolkonzentration innerhalb eines engen Rahmens zu halten (Guarna *et al.* 1997) und vor der eigentlichen Expression zu ermitteln. Nach 48 Stunden nahm die detektierte Proteinmenge bei Methanolkonzentrationen von 1 % und 2 % sogar leicht ab, während sie bei Einsatz von 3 % und 4 %, im Vergleich zu 24 Stunden, minimal zunahm (Abb. 3.28-A und B). Grund hierfür könnten Degradierungen während der späten stationären Phase sein, die aufgrund der größeren Menge an verfügbarem Kohlenstoff bei Einsatz von 3 % und 4 % erst später einsetzte. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass Proteinmengen anhand Western Blot Analysen abgeschätzt wurden und sich diese somit nicht quantifizieren und vergleichen lassen. Allerdings zeigen diese Experimente, dass die Proteinproduktion in diesem Fall nicht durch Steigerung der Methanolkonzentration (Kohlenstoffquelle und Induktor) erhöht werden konnte.

Für die weitere Erhöhung der HERV-K TM Menge nach 24 Stunden Expression, wurden unterschiedliche Fermentationsmethoden erprobt. Getestet wurden dabei ein normales Batch- und eine Art Fed-Batch Verfahren. Beim Batch-Verfahren wurde die Expression induziert und die Hefen wurden zum ermittelten Erntezeitpunkt geerntet, während im Fed-Batch Verfahren nach einer gewissen Zeit neue Nährstoffe in Form von frischem Kulturmedium hinzu gegeben wurden. Ein zusätzlicher Vorteil dieser Fermentationsmethode ist die Verdünnung von Stoffwechselendprodukten, welche das weitere Wachstum inhibieren könnten.

Während ein Ansatz im normalen Batch-Verfahren kultiviert wurde (Abb. 3.29: Versuch A), wurde in einem anderen Ansatz nach 24 Stunden 1 Volumen frisches Induktionsmedium (YPM, 2 % Methanol) hinzugefügt (Abb. 3.29: Versuch B). In Versuch C (Abb. 3.29: Versuch C) wurde ebenfalls frisches Induktionsmedium hinzugefügt, welches 4 % Methanol enthielt. In einem weiteren Ansatz wurde die komplette Expressionskultur nach 24 Stunden abzentrifugiert und

anschließend in frischem Induktionsmedium (YPM, 2 % Methanol) resuspendiert und weiter kultiviert (Abb. 3.29: Versuch D). In diesem Fall sollte die Belastung durch toxische Substanzen am niedrigsten sein, da das Medium vollständig ausgetauscht wurde. Allerdings konnte durch keine der getesteten Methoden die Proteinausbeute merklich angehoben werden (Abb. 3.29-A und 3.29-B), sodass weiterhin das einfache Batch-Verfahren verwendet wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die geringe Proteinproduktion nicht auf eine unzureichende Versorgung durch Nährstoffe zurück zu führen ist und somit andere Parameter limitierend wirkten.

H. polymorpha zeigte bei 37 °C eine höhere Produktivität, als bei 30 °C (Abb. 3.27-A), während beispielsweise *S. cerevisiae* in der Regel bei 30 °C kultiviert wird. Für *H. polymorpha* konnte eine sehr hohe Thermotoleranz nachgewiesen werden, sodass selbst bei Temperaturen bis 48 °C noch sehr gute Wachstums- und Expressionsraten erzielt werden (Reinders *et al.* 1999).

Einen bemerkenswert großen Einfluss auf die Gesamtausbeute an HERV-K TM hatte allerdings der Zeitpunkt zur Induktion der Proteinproduktion (gemessen anhand der optischen Dichte bei 600 nm). Während eine Induktion bei einer $OD_{600\text{nm}}$ von 0,5 zu verhältnismäßig niedrigen Proteinkonzentrationen führte, konnte diese durch Induktion bei $OD_{600\text{nm}}$ von 2 vervielfacht werden (Abb. 3.27-A und B). Die Erklärung hierfür liegt in der höheren Biomasse und somit größeren Produktionskapazität des gesamten Systems. Die Induktion bei einer noch höheren optischen Dichte wurde nicht getestet, könnte die Produktivität aber noch weiter steigern.

Eine äußerst vielversprechende Methode zur Erhöhung der HERV-K TM Expression könnte in diesem Fall die Optimierung der *codon usage* für *H. polymorpha* darstellen. Nach Berechnung des *codon adaptation index* (CAI) von HERV-K TM mit Hilfe des Programms JCat (Grote *et al.* 2005) konnte für die verwendete Nukleotidsequenz ein äußerst niedriger CAI von 0,07 ermittelt werden. Martin *et al.* konnten 1995 anhand des Genes für humanes TEL demonstrieren, dass die Erhöhung des CAI von 0,174 auf 0,754 zu einer deutlichen Erhöhung der Expression von auf ca. 20 % des Gesamtproteins (Martin *et al.* 1995) in Hefen führte. Die komplette Neusynthese des Gens für humane Phosphatidylcholinesterase erhöhte den CAI von 0,25 auf 0,70. Eine Erhöhung der Expression von „gerade detektierbar“ auf 10 % des Gesamtzellproteins war die Folge (Feng *et al.* 2000). Analog wurde die Expression von Dihydrofolatreductase-Thymidylatsynthase aus *Plasmodium falciparum* um den Faktor zehn erhöht (Prapunwattana *et al.* 1996).

Für die Expression von *StreptII-ΔNHR* 4K-His in *B. megaterium* wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine Codon-Optimierung durchgeführt, welche entgegen aller Erwartungen sogar zu einer Erniedrigung der Proteinexpression führte (IV.1.3 und Abb. 3.8). Allerdings betrug der CAI in diesem Fall vor Optimierung 0,49, sodass die niedrige Expressionsrate von *StreptII-ΔNHR* 4K-His vor Optimierung nicht unmittelbar auf die Abweichende *codon usage* zurückzuführen war. Im Fall von HERV-K TM betrug der CAI vor Optimierung allerdings 0,07, was einer außerordentlich hohen Abweichung von der präferierten *codon usage* von *H. polymorpha* entspricht und prinzipiell ein Hauptproblem der Expressionsstärke darstellen könnte.

Für die Expressionsstärke von Fremdproteinen in Hefezellen können weiterhin auch Unterschiede in den Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssignalen verschiedener Organismen kritisch sein (Zhao *et al.* 1999). Allgemein sind diese in Hefen weniger stark konserviert, als in Säugerzellen und bestehen aus AT-reichen Sequenzen (Zhao *et al.* 1999). Somit muss bei der Veränderung des CAI zusätzlich auch der GC-Gehalt berücksichtigt werden. Sharp und Li optimierten 1997 die *codon adaption* des humanen Gens der Glucocerebrosidase, wodurch gleichzeitig der GC-Gehalt stieg. Die Expression wurde anschließend verglichen mit der eines Kontrollkonstruktes mit in gleichem Maße erhöhtem GC-Gehalt, aber unverändertem CAI. Während das humane Gen zu einer sehr geringen Expression führte, wurde durch Codon- und GC-Gehalt Optimierung eine 10,6-fache und nur durch GC-Gehalt eine 7,5-fache Erhöhung der Proteinexpression beobachtet. Somit konnte der GC-Gehalt zu einer Haupteinflussgröße in Hefen identifiziert werden.

Interessanterweise wurden auch Unterschiede zwischen den beiden hauptsächlich als Expressionswirte genutzten Hefen *S. cerevisiae* und *P. pastoris*, ein naher Verwandter von *H. polymorpha* (*Pichia angusta*), gefunden. Die Expression des HIV-1 *env*-Proteins in diesen beiden Hefen resultierte in einem kompletten Transkript in *S. cerevisiae* und einem vorzeitig terminierten 5'-Fragment in *P. pastoris* (Scorer *et al.* 1993). Dies verdeutlicht, dass verschiedene Proteine in verschiedenen Organismen unterschiedlich stark exprimiert werden können. Somit wäre ein weiterer Ansatz zur Erhöhung der Expressionsrate die Verwendung anderer Hefestämme.

IV.2.3 Aufschluss von Hefen und Aufreinigung von rekombinatem HERV-K TM

Die Zellwand von Hefen besitzt in der Regel einen Durchmesser von 100 bis 200 nm und macht etwa 15 bis 25 % der Trockenmasse einer Hefezelle aus. Die typischen quantitativen Anteile der einzelnen Komponenten der Hefezellwand stellen sich in Prozent der Trockensubstanz der Hefezellwand wie folgt dar, 55% Glucan, 19% Mannan, 15% Protein, 7% Lipid sowie 4% Chitin (DiCarlo *et al.* 1958, Manners *et al.* 1973). Hierdurch wird der Hefezellwand eine ausgesprochen hohe Stabilität verliehen, sodass diese zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen unter verhältnismäßig hohen mechanischen Kräften aufgeschlossen werden müssen. Allerdings variieren Struktur und Zusammensetzung je nach gewählten Kultivierungsbedingungen (Bonaly *et al.* 1971).

Während in früheren Experimenten der Hefeaufschluss lediglich durch 24 stündiger Inkubation in Guanidinhydrochloridhaltigem Puffer (Bindepuffer B, siehe Tabelle 3.6) durchgeführt wurde (Dao Thi 2006), konnte dieser durch Einsatz von Glaskugeln unter starkem Vortexen leicht verbessert werden (Falenski 2007). Da der Aufschluss allerdings nach wie vor ineffizient war, sollte dieser in der vorliegenden Arbeit durch einen weiteren Schritt verbessert werden. Hierzu wurde zunächst die Polysaccharidhülle mit Hilfe von Zymolyase aus *Arthrobacter luteus* (Kaneko *et al.* 1969) effizient abgebaut und die resultierenden, fragilen Protoplasten durch Einsatz von 1 Volumen Glaskugeln unter starkem Vortexen aufgeschlossen. Zymolyase bezeichnet hierbei eine Kombination mehrere

Enzyme, wobei die lytische Aktivität auf die β -1,3-Glucan Laminaripentaohydrolase zurückzuführen ist. Diese hydrolysiert β -1,3-glykosydische Bindungen innerhalb linearer Glucose Polymere, wodurch die kleine Laminarpentaose freigesetzt wird (Kitamura und Yamamoto 1972, Kaneko *et al.* 1973), und bietet sich somit für den Aufschluss von Hefezellwänden an.

Als optimaler Puffer zur Solubilisierung von HERV-K TM konnte Bindepuffer B bestätigt werden (Abb. 3.30). Noch besser zur Solubilisierung geeignet war der als Positivkontrolle verwendete Crackingpuffer, der sich allerdings aufgrund seiner Zusammensetzung nicht für die Ni-NTA Affinitätschromatographie eignet. Da es wünschenswert war, eine nahezu native Konformation zu erhalten, wurden darüber hinaus weitere native Puffer getestet (Tab. 3.6), wovon lediglich NETN-25 in der Lage war, HERV-K TM in ausreichenden Mengen in Lösung zu bringen (Abb. 3.30). Durch Vergleich der Bandenintensität von HERV-K TM in Bindepuffer B mit der in NETN-25, wird der Eindruck erweckt, dass beide Puffer in etwa die gleiche Menge solubilisieren. Allerdings führte die weitere affinitätschromatographische Aufreinigung unter nativen Bedingungen zu keinem detektierbaren HERV-K TM in den Eluaten (Abb. nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung, warum Bindepuffer B letztendlich der bessere Puffer zur Aufreinigung von HERV-K TM ist, könnte die Struktur der Proteine in den jeweiligen Puffern liefern. Bindepuffer B wirkt durch die Anwesenheit von 8 M Guanidinhydrochlorid und 0,3 % SDS stark denaturierend auf alle Proteine, sodass lineare Aminosäurenketten entstehen. NETN-25 beinhaltet zur Solubilisierung lediglich 0,2 % Nonidet-P 40 und sollte somit weniger gravierende Effekte auf die Proteinstruktur haben. Eine Vermutung wäre, dass der C-terminale 6xHis-tag unter nativen Bedingungen nicht exponiert und somit eine Bindung an die Ni-NTA Agarose gar nicht erst stattfinden konnte, während die denaturierten Proteine ihren C-terminalen His-tag exponierten. Eine Möglichkeit, dieses Problem unter nativen Bedingungen zu umgehen, wäre die Verlagerung des His-tag vom C- an den N-Terminus. In Vorarbeiten konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Solubilisierungsvermögen von Bindepuffer B durch Zugabe von SDS in einer Endkonzentration von 0,3 % die Ausbeute an HERV-K TM deutlich erhöhte (Dao Thi 2006). Grund hierfür könnte sein, dass das Transmembranprotein von HERV tatsächlich über seine Transmembranregion in die Membran der Hefen eingebaut wird, oder das Protein intrazellulär aufgrund seiner hohen Hydrophobizität als unlösliche Aggregate akkumuliert. Das anionische Natriumdodecylsulfat kann diese durch Bindung der hydrophoben Kette an die hydrophoben Bereiche von HERV-K TM über die polare Kopfgruppe in Lösung bringen.

Nach Ermittlung optimaler Kultivierungsbedingungen konnten letztendlich ca. 540 μ g HERV-K TM aus einer 1000 ml Expressionskultur aufgereinigt (Abb. 3.32) und für weitere Analysen bereitgestellt werden. Diese Mengen sind zwar für Expressionen im 1 Liter Maßstab verhältnismäßig niedrig, allerdings ausreichend für die weiteren Untersuchungen zur Analyse der immunsuppressiven Eigenschaften gewesen.

IV.2.4 Auswirkungen von HERV-K TM auf die IL-10 Sekretion humaner PBMCs

In dem zur Untersuchung der IL-10 Sekretion humaner PBMCs durchgeführten Versuch sollte demonstriert werden, dass in *H. polymorpha* hergestelltes HERV-K TM den erwarteten und bereits demonstrierten Effekt der Hochregulation des antiinflammatorischen Cytokins IL-10 erzielt und sich dieser Organismus somit als mögliches Produktionssystem für retrovirale Hüllproteine eignet.

IL-10 diente in diesem Fall als indirekter Nachweis für eine mögliche Immunsuppression und ist ein multifunktionales Cytokin mit verschiedenen biologischen Eigenschaften. Eine wichtige Wirkung von IL-10 ist die Hemmung der Expression von MHC II-Molekülen und der kostimulatorischen Faktoren CD86 und CD80 von Monozyten und Makrophagen (De Waal *et al.*, 1991b). Weiterhin wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, und TNF- α , durch IL-10 inhibiert (De Waal *et al.*, 1991a). Während einer Infektion hemmt es letztendlich die Aktivität von allen erforderlichen Zellen zur optimalen Bekämpfung der Erreger und dämpft somit eine Immunantwort ab.

In der weiteren Untersuchung der immunsuppressiven Eigenschaft von HERV-K TM konnte eine konzentrationsabhängige IL-10 Sekretion humaner PBMCs gezeigt werden (Abb. 3.33). Bei Einsatz von 25 μg HERV-K TM und anschließender 24 stündiger Inkubation mit humanen PBMCs, konnte mit 840 pg ml^{-1} im Vergleich zur Negativkontrolle eine rund 210-fach höhere IL-10 Konzentration gemessen werden. Bei Einsatz von 1,5 μg betrug die IL-10 Konzentration in etwa 71 pg ml^{-1} , was einer rund 18-fach höheren IL-10 Konzentration entsprach.

Dao Thi konnte 2006 des Weiteren demonstrieren, dass das zur Solubilisierung verwendete SDS durch die zuvor durchgeführte „eiskalte Aceton/Methanol Fällung“ effizient entfernt wurde und somit keinen Einfluss auf die IL-10 Sekretion haben sollte. Eine Einschränkung bezüglich der Aussagekraft dieses Ergebnisses liefert allerdings das Fehlen einer geeigneten Negativkontrolle. Während in diesem Experiment lediglich Kulturmedium als Negativkontrolle verwendet wurde, könnte man in einem weiteren Versuch das, wie zur Aufreinigung von HERV-K TM, verwendete Protokoll an nicht-induzierten Hefen durchführen und das erhaltene Eluat ebenfalls für die Inkubation mit humanen PBMCs verwenden. Somit könnten weitere Aussagen über den Effekt durch eine Kontamination mit Hefe-Proteinen getroffen werden.

Aufgrund der starken Hydrophobizität und den damit verbundenen Problemen bei der Aufreinigung mussten denaturierende Bedingungen gewählt werden, wodurch das Protein seine natürliche Form verlor. Ein sinnvolles Folgeexperiment wäre aus diesem Grund eine *in vitro* Renaturierung (Wingfield *et al.* 1995) von HERV-K TM.

Durch diese Ergebnisse konnte die Tauglichkeit von *H. polymorpha* als Produktionssystem für das transmembrane Hüllprotein von HERV-K TM bestätigt werden.

V ZUSAMMENFASSUNG

Zur Etablierung eines Endotoxin-freien *Bacillus megaterium* Produktionssystems wurden zehn mittels PCR amplifizierte, von HIV-1 gp41 abgeleitete Fragmente hergestellt und in transformationskompetente *B. megaterium* Protoplasten eingebracht. Durch Optimierung bestehender Standardprotokolle zur Herstellung von Protoplasten war es möglich Transformationseffizienzen von etwa 10^2 cfu pro μg DNA zu erreichen und somit von der kostenintensiven Verwendung kommerziell erhältlicher *B. megaterium* Protoplasten abzusehen.

Von insgesamt über 500 getesteten Klonen konnten ca. 200 mittels *colony*-PCR für positiv befunden werden. Allerdings wurden lediglich drei Klone identifiziert, die auch in der Lage zur heterologen Expression der Fremdproteine waren. Erreichte Expressionslevel waren extrem niedrig und konnten selbst nach aufwendigen Anstrengungen zur Optimierung und Bestimmung optimaler Expressionsbedingungen nicht signifikant gesteigert werden. Nach Aufreinigung von *StreptII*- Δ NHR 4K-His aus der intrazellulären Proteinfraction (Zellpellet) konnten letztendlich Proteinmengen von rechnerisch ca. 80 μg ermittelt werden, wobei es nicht möglich war, *StreptII*- Δ NHR 4K-His in reiner Form zu gewinnen. Entgegen allen Erwartungen führte die Codon-Optimierung von Δ NHR 4K entsprechend der *codon usage bias* von *B. megaterium* MS941 zu einer verminderten Proteinproduktion, was auf mögliche Sekundärstrukturen der resultierenden *messenger*-RNA zurück zu führen ist.

Aufgrund der im Vergleich zu *E. coli* ausgesprochen niedrigen Transformationseffizienz, sowie dem äußerst schlechten Vermögen zur Produktion der HIV-1 gp41 Verkürzungsmutanten, konnte *B. megaterium* für diese Zwecke nicht als geeigneter Produktionsorganismus genutzt werden.

Im Gegensatz hierzu war es möglich, das transmembrane Hüllprotein gp36 des humanen endogenen Retrovirus K (HERV-K) in der methylotrophen Hefe *Hansenula polymorpha* RB11 überzuexprimieren und eine Gesamtmenge von etwa 540 μg aus 1 L Expressionskultur aufzureinigen. Zum Aufschluss der äußerst robusten Hefezellwände erwies sich der Einsatz von Zymolyase in Kombination mit dem mechanischen Aufschluss durch Glaskugeln als äußerst effektiv.

Untersuchungen bezüglich der immunsuppressiven Eigenschaften von HERV-K TM auf humane PBMCs zeigten eine konzentrationsabhängige Steigerung der IL-10 Sekretion nach 24-stündiger Inkubation, welches als Marker für eine immunsuppressive Wirkung angesehen werden kann. Da dieses Ergebnis bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, kann *H. polymorpha* somit als geeigneter Wirt für die Endotoxin-freie Produktion von HERV-K TM bestätigt werden und bietet sich ebenfalls für die Produktion der gp41 Verkürzungsmutanten an.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- Ailor E. and Betenbaugh MJ (1999): Modifying secretion and posttranslational processing in insect cells. *Curr. Op. Biotechnol.* **10**: 142–145.
- Alberts *et al.* (2002): *Molecular Biology of the Cell*, Fourth edition, Taylor & Francis.
- Akyüz L. (2008): Untersuchungen zur Induktion regulatorischer T-Zellen durch die transmembranen Hüllproteine von HIV-1 und anderer Retroviren (Diplomarbeit).
- Alkhatib G., Combadiere C., Broder C.C., Feng Y., Kennedy P.E., Murphy P.M. and Berger E.A. (1996): CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, **272**: 1955-8.
- Allan JS, Coligan JE, Lee TH, Barin F, Kanki PJ, M'Boup S, McLane MF, Groopman JE, Essex M. (1987): Immunogenic nature of a Pol gene product of HTLV-III/LAV. *Blood*. **69(1)**: 331-3.
- Balbás, P. (2001): Understanding the art of producing protein and nonprotein molecules in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.* **19**, 251–267.
- Ball A.S., Edwards C. (1989): Properties of protoplasts from the thermophilic *Bacillus coagulans* and their significance for genetic studies. *Appl. Microbiol.* **9**, 141-144.
- Baltimore D., (1992): Viral RNA-dependent DNA polymerase. *Biotechnology*. **24**:3-5.
- Baneyx, F. (1999): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Op. Biotechnol.* **10**, 411–421.
- Bannert N and Kurth R (2004). "Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation." *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**(Suppl 2): 14572-14579.
- Barg H, Malten M, Jahn M, Jahn D. (2005). Protein and vitamin production in *Bacillus megaterium*. In: Barredo JL, editor. *Microbial processes and products*. Totowa: *Humana Press Inc.* p165 – 184.
- Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dautet C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W. and Montagnier L.m (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, **220**: 868-71, 1983.
- Battiste JL, Mao H, Rao NS, Tan R, Muhandiram DR, Kay LE, Frankel AD, Williamson JR., (1996): Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex. *Science*. **273**(5281):1547-51.
- Behrendt R, (2005): Immunsuppressive Eigenschaften transmembraner Hüllproteine von Retroviren, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald (Diplomarbeit)
- Beutler B, Cerami A, (1988): Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu. Rev. Biochem.* **57**:505–18.
- Bennetzen J.L. und Hall B.D. (1982): Codon selection in yeast. *J Biol Chem*. **257**:3026-31.
- Benit L, Dessen P, Heidmann T., (2001): Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. *J Virol*. **75**(23):11709-19.
- Biedendieck R., (2006): *Bacillus megaterium*: Versatile Tools for Production, Secretion and Purification of Recombinant Proteins. (Dissertation)
- Blake C.C. *et al.* (1965): Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Ångström resolution. *Nature*. **206**:757-761.
- Bonaly R, Moulki H, Benjelloun AT, Pierfitte M., (1971): Cell walls of yeasts of the genus *Rhodotorula*. II. Influence of culture conditions on the chemical composition of cell walls. *Biochim. Biophys. Acta*. **244**:484-494.
- Bryant M. and Ratner L., (1990): Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. **87**(2), 523-7.
- Burger S, Tatge H, Hofmann F, Genth H, Just I, Gerhard R., (2003): Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. *Biochem Biophys Res Commun*. **307**(3):584-8.
- Büscher K, Trefzer U, Hofman M, Sterry W, Kurth R, Denner J (2005): Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res*. **65**(10):4172-4180.
- Büscher K, Hahn S, Hofmann M, Trefzer U, Ozel M, Sterry W, Lower J, Lower R, Kurth R, Denner J (2006): Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. *Melanoma Res*. **16** (3): 223-234.
- Carbone A., Zinovyev A. and Kepes, F. (2003): Codon adaptation index as a measure of dominating codon bias. *Bioinformatics* **19**: 2005-2015.

- Carrio M.M. and Villaverde A. (2002): Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* **96**, 3–12.
- Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS., (1997): Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* **89**(2):263-73.
- Chan, Peter, Kim (1998): HIV Entry and Its Inhibition. *Cell.* **93**(5):681-684.
- Chen YH, Dierich MP., (1998): A common epitope on gp41, IFN-alpha and IFN-beta induces protective activity. *Immunol Today.* **19**(12):586-7.
- Chen YH, Wu W, Yang J, Sui SF, Sun J, Dierich MP., (1999): Antibodies against human IFN-alpha and -beta recognized the immunosuppressive domain of HIV-1 gp41 and inhibit gp41-binding to the putative cellular receptor protein p45. *Immunol Lett.* **69**(2):253-7.
- Cianciolo GJ, Copeland TD, Oroszlan S, Snyderman R. Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science* 1985, 230: 453-455.
- Clapham PR, McKnight A., (2001): HIV-1 receptors and cell tropism. *Br Med Bull.* **58**:43-59. Review.
- Collins KL, Chen BK, Walker BD, Baltimore D. (1998): HIV-1 nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* **391**: 397-401.
- Corchero J.L. and Villaverde A. (1998): Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **58**:625–632.
- Cullen BR., (1998): HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell.* **93**: 685-92.
- D'Souza MP, Cairns JS, Plaeger SF., (2000): Current evidence and future directions for targeting HIV entry: therapeutic and prophylactic strategies. *JAMA.* **284**(2):215-22.
- Dao Thi V.L., (2006): Induktion von CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen durch transmembrane Hüllproteine von Retroviren. (Diplomarbeit)
- De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE., (1991a): Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med.*, **174**(4): 915-924.
- De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries JE., (1991b): Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.*, **174**(5): 1209-1220.
- Denner J, Norley S, Kurth R., (1994): The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS.* **8**(8):1063-72.
- Denner J, Phelps RC et al. (1995). "Expression of the human endogenous retrovirus HERV-K in tumor and normal tissue and antibody response in pregnant women, tumor and AIDS patients against HERV-K Gag and Env peptides." *AIDS Research* 11 (Suppl.1) 103
- Denner J., (1998): Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **862**:75– 86
- Denner J., (2000): How does HIV induce AIDS? The virus protein hypothesis. *J Hum Virol.* **3**(2):81-2.
- Dewhurst S. and Whetter L., (1997): Pathogenesis and treatment of HIV-1 infection: recent developments. *Front Biosci.* **2**:147-59, 1997.
- Di Carlo F.J., Fiore J.V., (1958): On the composition of zymosan. *Science.* **127**(3301):756-757.
- Dinarelli CA., (1991): Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood.* **77**:1627–52.
- Falenski A., (2007): Induktion von CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen durch retrovirale transmembrane Hüllproteine. (Diplomarbeit)
- Fan T, Day NK, Luangwedchakarn V, Chang Y, Ikehara S, Lerner DL, Haraguchi S., (2005): The phosphorylation of phospholipase C-gamma1, Raf-1, MEK, and ERK1/2 induced by a conserved retroviral peptide. *Peptides.* **11**:2165-74.
- Farnet CM, Haseltine WA., (1991): Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol.* **65**(4):1910-5.
- Feng, L., Chan, W. W., Roderick, S. L. und Cohen, D. E. (2000) High-level expression and mutagenesis of recombinant human phosphatidylcholine transfer protein using a synthetic gene: evidence for a C-terminal membrane binding domain. *Biochemistry* **39**: 15399-409.
- Fields B.K., Howley PM, (1996). "Virology." Third Edition Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Frankel A.D. and Young J. A., (1998): HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem.* **67**, 1-25.

- Freed EO., (2001): HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet.* **26**(1-6):13-33. Review.
- Gelderblom H., H. Reupke, T. Winkler, R. Kunze and G. Pauli, M. (1987): HC antigens: Constituents of the envelopes of human and simian immunodeficiency viruses. *Z. Naturforsch.* **42**: 1328–1334.
- Gellissen G., Hollenberg C.P. and Janowicz Z.A., (1994): Gene expression in methylotrophic yeasts. In: *Gene Expression in Recombinant Microorganisms* (Smith, A., Ed.), pp. 195–239. Marcel Dekker, New York.
- Gellissen, G. (2000): Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**,741-750
- Gellissen G (Ed), (2005): Production of recombinant proteins - novel microbial and eukaryotic expression systems. Wiley-VCH, Weinheim ISBN 978-3-527-31036-4
- Gellissen, G. (Ed) (2002): *Hansenula polymorpha – Biology and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim. ISBN: 978-3-527-30341-0
- Ginsburgh, C., Spaulding, D., Robey, G., Shivakumar, A.M.O., Vanags, R., Katz, L., Fox, J.L. (1989): Sporulation promoter spoVG controlled expression of PP42 gene of HIV-1 in *Bacillus megaterium*. Abstract from an International Conference on AIDS, Montreal.
- Griswold K.E., Mahmood N.A., Iverson B.L. und Georgiou G., (2003): Effects of codon usage versus putative 5'(-)mRNA structure on the expression of *Fusarium solani* cutinase in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Protein Expr Purif* **27**: 134-42.
- Grote A, Hiller K, Scheer M, Munch R, Nortemann B, Hempel DC, Jahn D., (2005): JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res.*, 33(Web Server issue):W526-31.
- Guarna M.M., Lesnicki G.J., Tam B.M., Robinson J., Radziminski C.Z., Hasenwinkle D., Boraston A., Jervis E., MacGillivray R.T.A., Turner R.F.B. und Kilburn D.G., (1997): On-Line Monitoring and Control of Methanol Concentration in Shake-Flask Cultures of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng* **56**: 279-86.
- Gurtler L.G., Hauser P.H., Eberle J., von Brunn A., Knapp S., Zekeng L., Tsague J. M. and Kaptue L., (1994): A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol*, **68**: 1581-5, 1994.
- Haffar O, Bukrinsky M., (2005): Nuclear translocation as a novel target for anti-HIV drugs. *Expert Rev Anti Infect Ther.* **3**(1):41-50. Review.
- Hammer D., (2006): Herstellung und Evaluierung transdominant negativ wirksamer Varianten des HIV-1 gruppenspezifischen Antigens als Basiskomponente einer HIV-1-Gentherapie. (Dissertation)
- Haraguchi S., et al., (1995): Differential modulation of Th1- and Th2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(8):3611-5.
- Harrell R.A., et al., (1986): Suppression of the respiratory burst of human monocytes by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of human and animal retroviruses. *J Immunol.* **136**(10):3517-20.
- Harrich D, Ulich C, Gaynor RB., (1996): A critical role for the TAR element in promoting efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol.* **70**(6):4017-27.
- Harrich D, Hooker B., (2002): Mechanistic aspects of HIV-1 reverse transcription initiation. *Rev Med Virol.* **12**(1):31-45. Review.
- Harris D.T., et al., (1987): Inhibition of human natural killer cell activity by a synthetic peptide homologous to a conserved region in the retroviral protein, p15E. *J Immunol*, **138**(3): 889-94.
- Heinzinger N.K., Bukinsky M.I., Haggerty S.A., Ragland A.M., Kewalramani V., Lee M.A., Gendelman H.E., Ratner L., Stevenson M. and Emerman M., (1994): The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(15):7311-5.
- Hirsch I, Spire B, Tsunetsugu-Yokota Y, Neuveut C, Sire J, Chermann JC., (1990): Differences in replication and cytopathogenicity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) are not determined by long terminal repeats (LTR). *Virology.* **177**(2):759-63.
- Ho D.D., Neumann A.U., Perelson A.S., Chen W., Leonard J.M. and Markowitz M., (1995): Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* **373**(6510):123-6.
- Isel C, Karn J., (1999): Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J Mol Biol.* **290**(5):929-41.
- Ito Y, Yamada H, Nakamura M, Yoshikawa A, Ueda T, Imoto T, (1993): *The primary structures and properties of non-stomach lysozymes of sheep and cow, and implication for functional divergence of lysozyme.* *Eur. J. Biochem.* **213**(2): 649–58.
- Jia M. and Li Y., (2005): The relationship among gene expression, folding free energy and codon usage bias in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **579**: 5333-5337.
- Jones KA, Peterlin BM., (1994): Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem.* **63**:717-43.

- Jordan A, Defechereux P, Verdin E., (1969): The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.* **20**(7):1726-38.
- Kang D., Gho Y.S., Suh M., Kang C., (2002): Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**(11): 1511-1512.
- Kaneko, T., Kitamura, K. and Yamamoto, Y.: *J. Gen. Appl Microbiol.*, 15, 317 (1969)
- Kaneko, T., Kitamura, K. and Yamamoto, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2295 (1973)
- Kaufman D.L., and Evans G.A., (1990): Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *BioTechniques*. **9**, 304.
- Kitamura, K. and Yamamoto, Y.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 153, 403 (1972)
- Kleinerman E.S., *et al.*, (1987): A synthetic peptide homologous to the envelope proteins of retroviruses inhibits monocyte-mediated killing by inactivating interleukin 1. *J Immunol.* **139**(7):2329-37.
- Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, *et al.*, (1988): Active HIV protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**: 4686-90.
- Konforti BB, Koziolkiewicz MJ, Konarska MM., (1993): Disruption of base pairing between the 5' splice site and the 5' end of U1 snRNA is required for spliceosome assembly. *Cell.* **75**(5):863-73.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, *et al.* (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* **409**(6822): 860-921.
- Lauck M., (2008): Interaktion des transmembranen Hüllproteins von HIV-1 mit humanen Immunzellen. (Diplomarbeit)
- Le Rouzic E, Benichou S., (2005): The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology.* **2**(1):11.
- Leonard C.K., Spellman M.W., Riddle L., Harris R.J., Thomas J.N., and Gregory T.J. (1990): Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **265**:10373–10382.
- Loussert-Ajaka I., Chaix M.L., Korber B., Letourneur F., Gomas E., Allen E., Ly T.D., Brun-Vezinet F., Simon F. and Saragosti S. (1995): Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Cameroonian patients living in France. *J Virol*, **69**:5640-9.
- Lower R, Lower J and Kurth R (1996): "The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences." *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(11):5177-5184.
- Malten M, Nahrstedt H, Meinhardt F, Jahn D, (2005): Coexpression of the Type I Signal Peptidase Gene sipM Increases Recombinant Protein Production and Export in *Bacillus megaterium* MS941. *Biotechnol. Bioeng.* **91**:616–622.
- Malten M, Biedendieck R, Gamer M, Drews, AC, Stammen S, Buchholz K, Dijkhuizen L and Jahn D. (2006): A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export and one-step purification of affinity tagged heterologous levansucrase from the growth medium. *Appl Environ Microbiol.* **72**(2):1677-9.
- Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC, Björndal H, Lindberg B, (1973): The structure of a beta-(1–6)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J.* **135**(1):31-36.
- Margaritis A. and Bassi A.S., (1991): Plasmid stability of recombinant DNA microorganisms. *Recombinant DNA Technology and Applications.* (Prokop, A., Bajpai, R.K., and Ho, C., eds.) McGraw-Hill, New York, NY, pp. 316–332.
- Martin S.L., Vrhovski B. und Weiss A.S. (1995): Total synthesis and expression in *Escherichia coli* of a gene encoding human tropoelastin. *Gene.* **154**:159-66.
- Moore JP, Sattentau QJ., (1993): Detecting SIV gp120 and its interaction with soluble CD4 by ELISA. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **9**(12):1297-9.
- Moore J.P., Sattentau Q.J., Wyatt R. and Sodroski J. (1994): Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J Virol*, **68**: 469-84.
- Mitani M, Cianciolo GJ, Snyderman R, Yasuda M, Good RA, Day NK., (1987): Suppressive effect on polyclonal B-cell activation of a synthetic peptide homologous to a transmembrane component of oncogenic retroviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* **(1)**:237-40.
- Moore J.P., Parren P.W. and Burton D.R., (2001): Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus type 1 vaccine development. *J Virol*, **75**: 5721-9.
- Nakamura Y., Gojbori T. & Ikemura, T., (2000): Codon Usage Tabulated From International DNA Sequence Databases: Status for the Year 2000. *Nucleic Acids Res.* **28**, 292.
- Nilsson J, Weis K, Kjems J. The C-terminal extension of the small GTPase Ran is essential for defining the GDP-bound form. *J Mol Biol.* **318**(2):583-93.

- Ogasawara M. *et al.*, (1990): Inhibition of murine cytotoxic T lymphocyte activity by a synthetic retroviral peptide and abrogation of this activity by IL. *J Immunol.* **145**(2): 456-62.
- Olshevsky U, Helseth E, Furman C, Li J, Haseltine W, Sodroski J., (1990): Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J Virol.* **64**(12):5701-7.
- Olson P., Zhang Y., Olsen D., Owens A., Cohen P., Nguyen K. *et al.*, (1998): High-level expression of eukaryotic polypeptides from bacterial chromosomes. *Protein Express. Purif.* **14**:160–166.
- Palomares LA, Kuri-Brena F, and Ramirez OT. (2002): Industrial recombinant protein production, in *The Encyclopedia of Life Support Systems*. EOLSS Publishers, Oxford. 6.58.3.8.
- Papandreou MJ and Fenouillet E., (1998): Effect of changes in the glycosylation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope on the immunoreactivity and sensitivity to thrombin of its third variable domain. *Virology*, **241**:163-7.
- Paulsson J. and Ehrenberg M. (2001): Noise in a minimal regulatory network: plasmid copy number control. *Q. Rev. Biophys.* **34**: 1–59.
- Poignard P, Saphire EO, Parren PW and Burton DR. (2001): gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol*, **19**: 253-74.
- Pollard VW, Malim MH. (1998): The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol.* **52**:491-532. Review.
- Popov S, Rexach M, Zybarth G, Reiling N, Lee MA, Ratner L, Lane CM, Moore MS, Blobel G, Bukrinsky M. (1998): Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO J.* **17**(4):909-17.
- Prapunwattana P., Sirawaraporn W., Yuthavong Y. und Santi, D. V. (1996): Chemical synthesis of the Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Mol Biochem Parasitol* **83**:93-106.
- Puyet A, Sandoval H, Lopez P, Aguilar A, Martin JF, Espinosa M., (1987): A simple medium for rapid regeneration of *Bacillus subtilis* protoplasts transformed with plasmid DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **40**:1-5.
- Rabson AB, Koenig S, Daugherty DF, Gendelman HE, (1988): Molecular pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Gene Anal Tech.* **5**(3):41-53. Review.
- Raetz C, Whitfield C, (2002): Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu Rev Biochem.*, **71**:635–700.
- Reinders A, Romano I, Wiemken A, de Virgilio C, (1999): The thermophilic yeast *Hansenula polymorpha* does not require trehalose for normal acquisition of thermotolerance. *J Bacteriol.* **181**:4665-4668
- Robey FA, Kelson-Harris T, Roller PP, Robert-Guroff M, (1995): A helical epitope in the C4 domain of HIV glycoprotein 120. *J Biol Chem.*, **270**(41):23918-21.
- Ruegg CL, Monell CR, Strand M, (1989): Identification, using synthetic peptides, of the minimum amino acid sequence from the retroviral transmembrane protein p15E required for inhibition of lymphoproliferation and its similarity to gp21 of human T-lymphotropic virus types I and II. *J Virol.*, **63**(8):3250-6.
- Ruegg CL, Strand M, (1990): Identification of a decapeptide region of human interferon-alpha with antiproliferative activity and homology to an immunosuppressive sequence of the retroviral transmembrane protein P15E. *J Interferon Res.*, **10**(6):621-6.
- Rygus T, Hillen W, (1991): Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**:594-59
- Sackett K, and Shai Y, (2003): How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain. *J. Mol. Biol.* **333**:47-58.
- Sauter MM, Pelchen-Matthews A, Bron R, et al. (1996). "An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface." *J Cell Biol.* **132**(5): 795-811.
- Scorer, C. A., Buckholz, R. G., Clare, J. J. und Romanos, M. A., (1993): The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **136**:111-9.
- Seltmann G., Holst O., (2002): The bacterial cell wall. *Springer Verlag*, Berlin Heidelberg.
- Sharp, P. M., Tuohy, T. M. und Mosurski, K. R. (1986) Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Res* **14**:5125-43.
- Sharp PM, Li WH, (1987): The codon Adaptation Index - a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res.* **15**(3).
- Simon F, Mauclere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, and Brun-Vezinet F, (1998): Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*, **4**:1032-7.

- Stein BS, Engleman EG, (1990): Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. *J Biol Chem.* **265**(5):2640-9.
- Stryer L, (1996): Biochemie, 4. Auflage. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Summers D, (1998): Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Mol. Microbiol.* **29**:1137-1145.
- Tacke SJ, Kurth R and Denner J, (2000): Porcine endogenous retroviruses inhibit human immune cell function: risk for xenotransplantation ?, *Virology*, **268**(1):87-93.
- Takeshita S, Gage JR, Kishimoto TV, Vredevoe DL, Martinez-Maza O, (1996): Differential regulation of IL-6 gene transcription and expression by IL-4 and IL-10 in human monocytic cell lines. *J. Immunol.* **156**:2591.
- Tiley LS, Cullen BR, (1992): Structural and functional analysis of the visna virus Rev-response element. *J Virol.* **66**(6):3609-15.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D., Braun, P.G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.Y., Westers, H., Zanen, G., Quax, W.J., Kuipers, O.P., Bron, S., Hecker, M. and van Dijk, J.M. (2004) Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 207-233.
- Turner B.G. and Summers M.F., (1999): Structural biology of HIV. *J Mol Biol*, **285**:1-32.
- UNAIDS, (2008): Report on the global HIV/AIDS epidemic.
- Valentin A, Matsuda S, Asjo B., (1990): Characterization of the in vitro maturation of monocytes and the susceptibility to HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **6**(8):977-8.
- Von Schwedler U, Kornbluth RS, Trono D., (1994): The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**(15):6992-6.
- Vanden Haesevelde, M., Decourt, J. L., De Leys, R. J., Vanderborght, B., van der Groen, G., van Heuverswijn, H., and Saman, E. (1994): Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol*, **68**:1586-96.
- Vary, P. (1992): Development of genetic engineering of *Bacillus megaterium*. *Biotechnology* **22**:251-310.
- Vary, P.S. (1994): Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology* **140**(5):1001-1013 (minireview).
- Vary PS, Biedendieck R, Fuerch T, Meinhardt F, Rohde M, Deckwer WD, Jahn D (2007): *Bacillus megaterium* - from simple soil bacterium to industrial protein production host. *Appl Microbiol Biotechnol*, **76**:957-967.
- Wang W, Hollmann R, Furch T, Nimtz M, Malten M, Jahn D, Deckwer WD (2005): Proteome analysis of a recombinant *Bacillus megaterium* strain during heterologous production of a glucosyltransferase, *Proteome Sci.* **3**:4.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. (1995): Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* **373**(6510):117-22.
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC. (1997): Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature.* **387**(6631):426-430.
- Weissman I (1988): Approaches to an understanding of pathogenetic mechanisms in AIDS. *Rev Infect Dis.* **10**(2):385-398.
- Wingfield, P.T., (1995): Overview of the purification of recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. In: *Current protocols in protein science*, vol. 1, Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L., Speicher, D. W., and Wingfield, P.T. eds. John Wiley and Sons, New York, pp. 6.1.1-6.1.22.
- Wingfield, P.T., (1995): Preparation of soluble proteins from *Escherichia coli*. In: *Current protocols in protein science*, vol. 1, Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L., Speicher, D. W., and Wingfield, P.T., eds. Wiley and Sons, New York, pp. 6.2.1-6.2.15.
- Wingfield P.T., Palmer I. and Liang S.M., (1995): Folding and purification of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. In: *Current protocols in protein science*, vol. 1, Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L., Speicher, D. W., and Wingfield, P.T. eds. Wiley and Sons, Inc. New York, pp. 6.5.1-6.5.27.
- Wittchen KD, Meinhardt F, (1995): Inactivation of the major extracellular protease vom *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **42**(6):871-877.
- Wyatt R and Sodroski J, (1998):The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science.* **280**:1884-8.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Reinhard Kurth und Herrn Dr. Denner für die Bereitstellung des interessanten Themas der Diplomarbeit und für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Frau Dr. Magdalena Eschricht möchte ich besonders für die ausgezeichnete Betreuung und die vielen interessanten Diskussionen danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kreuzaler der RWTH-Aachen für die Bereitschaft, als Gutachter dieser Arbeit tätig zu sein.

Für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe P13 des Robert Koch-Instituts danken. Dabei gilt besonderer Dank Martina Lau, die mich während der gesamten Zeit tatkräftig unterstützt hat und mir bei vielen Experimenten zur Seite stand.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und allen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben.