

**Herstellung rekombinanter humaner
Chemokine in *E. coli*:
Etablierung von Methoden zur Expression,
Reinigung und Endotoxinentfernung**

Zur Erlangung des akademischen Grades
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

DISSERTATION

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Dana Wiese
aus Potsdam-Babelsberg

3. Januar 2011

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse
Referent: Prof. Dr. Stefan Bräse
Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Fischer
Tag der mündlichen Prüfung: 7.02.2011

Hiermit versichere ich, Dana Wiese, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Herstellung rekombinanter humaner Chemokine in *E. coli*: Etablierung von Methoden zur Expression, Reinigung und Endotoxinentfernung.“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Karlsruhe, den 3. Januar 2011

*„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft,
etwas, in das man viel Zeit
und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“*

Albert Einstein (1879-1955)

*„Fantasie haben heißt nicht, sich etwas auszudenken,
es heißt, sich aus den Dingen etwas zu machen.“*

Thomas Mann (1875-1955)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	5
2	Abstract.....	7
3	Einleitung.....	9
3.1	Chemokine und ihre Rolle im Immunsystem.....	9
3.1.1	Interleukin-8 (IL-8).....	10
3.1.2	Stromal cell derived factor 1 α (SDF1 α).....	11
3.1.3	Eotaxin-1.....	11
3.2	Chemokine und ihre Rolle bei Erkrankungen.....	12
3.3	Chemokine in der Forschung.....	14
3.4	Klonierung und Expression in <i>Escherichia coli</i>	15
3.5	Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	19
3.6	Endotoxine.....	22
3.7	Zielsetzung.....	24
4	Material und Methoden.....	27
4.1	Chemikalien und Material.....	27
4.2	Geräte und Software.....	29
4.3	Bakterienstämme.....	30
4.4	Zellbiologische Methoden.....	30
4.4.1	Zellkultur.....	30
4.4.1.1	Übernachtskulturen.....	31
4.4.1.2	Glycerolstocks.....	31
4.4.2	Herstellung kompetenter Zellen und Transformation.....	31
4.5	Arbeiten mit DNA.....	32
4.5.1	Plasmid-DNA-Isolierung.....	33
4.5.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
4.5.3	<i>Site-directed mutagenesis</i> -Polymerase-Kettenreaktion (sdmPCR) mit den rekombinanten Plasmiden pReceiver Eotaxin und pReceiver SDF1 α	34

4.5.4	Klonierung.....	36
4.5.4.1	PCR zur Gewinnung der cDNA-Fragmente (Inserts) für die Klonierungen und Kontroll-PCR	36
4.5.4.2	DNA-Gelextraktion.....	38
4.5.4.3	Restriktionsverdau	38
4.5.4.4	Ligationsansätze.....	39
4.6	Sequenzierung der rekombinanten cDNAs	39
4.7	Proteinexpression der rekombinanten Chemokine	40
4.7.1	Testmaßstab.....	40
4.7.2	Größerer Maßstab (800 ml).....	40
4.8	Proteinanalytik.....	41
4.8.1	Bicinchoninsäure-Test.....	41
4.8.2	Nanodrop.....	41
4.8.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	41
4.8.4	Western Blot.....	43
4.9	Zellysemethoden.....	44
4.9.1	Zellysemethode nach Koltermann et al. ^[125]	45
4.9.2	Optimierte Zellysemethode	45
4.9.3	Osmotischer Schock zur Gewinnung der periplasmatischen Fraktion.....	46
4.10	Proteinreinigung mittels Chromatographie	46
4.10.1	Affinitätschromatographie mit Heparin	47
4.10.2	Kationenaustauschchromatographie.....	47
4.10.3	Affinitätschromatographie mit Nickel-Sepharose.....	47
4.10.4	Kombinierte Chromatographiemethoden zur Reinigung rekombinanter Chemokine ohne His-tag.....	48
4.10.5	Kombinierte Chromatographiemethoden zur Reinigung rekombinanter Chemokine mit His-tag	48
4.11	Matrixunterstützende-Laserdesorption/Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS).....	49
4.12	Circulardichroismus-Spektroskopie	50
4.13	Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test (LAL-Test).....	50
5	Ergebnisse	51

5.1	Aufbau eines Expressionssystems	51
5.1.1	Verwendung der Wildtyp-cDNA von SDF1 α und Eotaxin-1	51
5.1.2	<i>site directed mutagenesis</i> PCR (<i>sdm</i> PCR) zur Änderung eines Codons in der Wildtyp-cDNA der Gene SDF1 α und Eotaxin-1 im Expressionsvektor pReceiver	52
5.1.3	Klonierungen und Expressionstests	55
5.1.3.1	K1: cDNA mit Codonaustausch von Eotaxin-1 und SDF1 α ohne Signalpeptidsequenz in den Expressionsvektor pReceiver	58
5.1.3.2	K2: codonoptimierte cDNA von Eotaxin-1 und Interleukin-8 mit und ohne K3-TEV-Protease-Sequenz in den Expressionsvektor pReceiver	60
5.1.3.3	K3: Codonoptimierte cDNA von Eotaxin-1, Interleukin-8 und SDF1 α in die Expressionsvektoren pET22b und pET28a.....	64
5.1.3.4	K4: codonoptimierte cDNA von Eotaxin-1 und Interleukin-8 in den Expressionsvektor pET28a ohne His-tag.....	71
5.2	Reinigung von rekombinanten humanen Chemokinen aus <i>E. coli</i>	73
5.2.1	Vergleich und Optimierung verschiedener Zellysemethoden.....	73
5.2.2	Freisetzung von IL-8 aus dem periplasmatischen Raum	77
5.2.3	Reinigung von rekombinanten Chemokinen mittels Chromatographie.....	78
5.2.3.1	Auswahl der Chromatographiemethoden	78
5.2.3.2	Kombinierte Chromatographiemethoden.....	86
5.2.3.3	Reinigung von rekombinanten Chemokinen mit His-tag	93
5.2.4	CD-Spektroskopie zur Strukturanalyse von rhIL-8	98
5.3	Nachweis und Entfernung von Endotoxinen.....	99
6	Diskussion.....	103
6.1	Expressionsvektoren für die Herstellung humaner Chemokine in <i>E. coli</i>	103
6.2	Zellysemethoden.....	105
6.3	Expression und Reinigung von rekombinatem Interleukin-8.....	107
6.4	Expression und Reinigung von rekombinatem SDF1 α	108
6.5	Expression und Reinigung von rekombinatem Eotaxin-1	110
6.6	Verbesserungsansätze für die Expression von humanem SDF1 α und Eotaxin-1 in <i>E. coli</i>	111
6.7	Konzept zur Reinigung von rekombinatem SDF1 α und Eotaxin-1.....	113
6.8	Entfernung von Endotoxinen.....	114

6.9	Ausblick.....	116
7	Literatur.....	119
8	Abbildungsverzeichnis.....	131
9	Tabellenverzeichnis	135
10	Abkürzungsverzeichnis.....	137
11	Danksagung.....	141
12	Wissenschaftliche Veröffentlichungen	143
13	Lebenslauf.....	145

1 Zusammenfassung

Chemokine sind Proteine, die zu den Botenstoffen des Immunsystems gehören und haben einen großen Einfluss auf zahlreiche chronische Erkrankungen. Von zentraler Bedeutung ist daher, die Aktivität dieser Proteine gezielt zu hemmen.

Für Bindungsstudien, Aktivitäts- und Zellmigrationstests mit potenziellen Inhibitoren werden humane Chemokine mit einem unveränderten N-Terminus in großen Mengen benötigt. Dieser ist für die Bindung an den Rezeptoren der Leukozyten und deren Aktivierung entscheidend.

Deshalb wurden in dieser Arbeit die drei ausgewählten humanen Chemokine Interleukin-8 (IL-8), Eotaxin-1 und SDF1 α rekombinant in *E. coli* exprimiert. Hierzu sollte ein Expressionssystem ausgesucht und optimiert werden, das sowohl für alle drei Chemokine anwendbar ist als auch Änderungen wie das Einfügen von Affinitätstags, Punktmutationen und Isotopenmarkierung erlaubt. Ein weiteres Ziel war die Entwicklung einer einfachen effektiven Reinigungsmethode, die für alle drei Chemokine anwendbar ist und zusätzlich die Entfernung der bakteriellen Endotoxine, die in Aktivitätstests mit Leukozyten stören, ermöglicht.

Die cDNAs (der jeweiligen Chemokine) wurden als unterschiedliche Konstrukte in drei verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Die Expression der Chemokine Interleukin-8 und SDF1 α mit dem pelB-Signalpeptid für den Transport in den periplasmatischen Raum mit dem Vektor pET22b ließ sich erfolgreich im Expressionsstamm BL21 DE3 RIL induzieren. Ebenfalls wurden sie mit einem His₆-tag mit dem Vektor pET28a in den Expressionsstämmen BL21 DE3 RIL und Rosetta DE3 exprimiert. Die Expression von Interleukin-8 mit pelB war deutlich stärker als von SDF1 α . Eotaxin-1 und SDF1 α mit His₆-tag wurden im Vektor pET28a stärker exprimiert als mit dem pelB-Peptid.

Durch eine gezielt ausgewählte Kombination mehrerer Lysemethoden und den Einsatz von DNaseI verbesserte sich die Freisetzung des im Cytoplasma vorliegenden löslichen Proteins in den Zellysatsüberstand.

Basierend auf den physikalischen Eigenschaften wie dem hohen isoelektrischen Punkt und der Affinität zu Glykosaminoglykanen wurden für die Reinigung von unmodifiziertem IL-8 verschiedene Chromatographiemethoden getestet. Für die Reinigung des Chemokins war die Kombination von drei Chromatographiemethoden erforderlich. Nach der Kationenaustauschchromatographie folgten eine Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie.

Die etablierte Reinigungsmethode erfolgte mit einem einzigen Puffersystem und benötigte keine Dialyse- und Membranfiltrationsschritte. Dadurch wurde der Zeitaufwand deutlich verringert und Proteinverluste vermieden. Am Ende lag das IL-8 in einem für Aktivitätsstudien kompatiblen Puffer vor. Aus einem Liter Zellkultur wurden durchschnittlich 6 mg IL-8 mit hoher Reinheit gewonnen.

Die Chemokine mit His₆-tag waren so konstruiert, dass der korrekte N-Terminus bei IL-8 während der Entfernung des His₆-tags durch die TEV-Protease freigelegt wird. Nach der Reinigung mit einer Nickelaffinitätssäule und anschließender Gelfiltration lagen durchschnittlich 3 mg reines Interleukin-8 vor. SDF1 α mit His₆-tag lag als Einschlusskörperchen in den Zellen

vor und wurde durch Zugabe denaturierender Substanzen gelöst. Die Rückfaltung des Proteins erfolgte an der Nickelsäule.

Eine deutliche Reduzierung der Endotoxinmengen ergab sich durch die Zugabe von 0,5% Triton X-114 ins Zelllysate und einer Verlängerung des Waschschruttes nach der Probeninjektion beim ersten Chromatographieschritt. Auch die Phasentrennung des Detergenz von der wässrigen Chemokinlösung führte zu einer starken Absenkung der Endotoxinkonzentration.

Somit kann das gereinigte Chemokin, das im PBS-ähnlichen Puffer mit sehr geringen Endotoxinmengen vorliegt, für weitere Anwendungen wie Aktivitäts- und Zellmigrationstests sowie chemische Modifikationen eingesetzt werden. Die neuartige schnelle Reinigungsmethode, bestehend aus drei Chromatographieschritten, kann auch für andere basische Chemokine genutzt werden.

2 Abstract

Chemokines are proteins which belong to the messengers of the immune system and have a wide influence on many chronic diseases. Therefore, it is of great importance to restrain the activity of these proteins. For binding studies, activity and cell migration tests with potential inhibitors, human chemokines are required in large quantities. Furthermore the N-terminus which is important for binding to the receptors of leukocytes and their activation must not be changed.

Therefore, in this work three selected human chemokines interleukin-8 (IL-8), eotaxin-1 and SDF1 α should be expressed recombinantly in *E. coli*. Moreover an expression system should be selected and optimized to be applicable for all three chemokines to permit changes like the insertion of affinity tags, point mutations and isotope label. Another purpose was the development of a simple, effective purification method which is applicable to all three chemokines and that, in addition, allows the reduction of the bacterial endotoxins which would interfere in activity tests with leukocytes.

The cDNAs encoding the respective chemokine were cloned as different constructs into three different expression vectors. In the expression strains BL21 DE3 RIL and Rosetta DE3, the expression of the chemokines interleukin-8 and SDF1 α with the pelB signal peptides for the transport into the periplasmic space with vector pET22b was as well induced successfully as was the expression of the chemokines with His₆-tag with vector pET28a. The expression of interleukin-8 with pelB was clearly stronger than that of SDF1 α . Eotaxin-1 and SDF1 α with His₆-tag in the vector pET28a were expressed better than with pelB-peptid. Besides, the His₆-tag could be used for the protein purification with a nickel affinity column.

The release of the protein from the cytoplasm was clearly improved by the combination of several cell lysis methods and the application of DNaseI.

For the purification of unmodified IL-8 different chromatography methods were tested based on the physical properties like the high isoelectric point and the affinity to glycosaminoglycans. To obtain very pure chemokine, the purification with a combination of three chromatographic methods was necessary. The initial cation exchange chromatography was followed by affinity and size exclusion chromatography.

This established purification method was performed with a single buffer system and required no dialysis and membrane filtration steps. Therefore a lot of time was saved as well as protein losses were avoided and the purified interleukin-8 was obtained in a buffer compatible with activity studies. On average 6 mg of IL-8 with high purity were obtained from 1 litre of cell culture.

The chemokines with His₆-tag were constructed in a way that the correct N-terminus of IL-8 was exposed upon the removal of the His₆-tag by TEV protease. SDF1 α with His₆-tag formed inclusion bodies in the cells and was dissolved by addition of denaturing substances. The re-folding of the protein occurred on a nickel affinity column.

A significant reduction of the endotoxin amount was achieved by the addition of 0.5% Triton X-114 in the cell lysate and by performing a prolonged washing step after the injection of

sample during the first chromatography step. Also the phase separation of the detergent from the aqueous chemokine solution led to a strong reduction of the endotoxin concentration.

Therefore the purified chemokine which is in a buffer similar to PBS with a low endotoxin concentration can be used for further applications like activity and cell migration tests as well as chemical modifications. The innovative rapid purification method consisting three chromatography steps can be also applied for other basic chemokines.

3 Einleitung

In einem Organismus, in den pathogene Mikroorganismen eindringen oder das Gewebe zerstört wird, werden sowohl unspezifische Reaktionen wie die Aufnahme von Bakterien durch Makrophagen als auch spezifische Reaktionen wie die Produktion von Antikörpern gegen das Pathogen ausgelöst. Diese Mechanismen, die zur angeborenen und zur adaptiven Immunität gehören, basieren auf Reaktionen von Leukozyten.^[1] Die Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen des Immunsystems beruht auf der Freisetzung verschiedener Mediatoren und Lockstoffe. Zu diesen Botenstoffen zählen die Chemokine, die eine Wanderung, auch Chemotaxis genannt, bei Leukozyten auslösen und diese zum Zielort führen. Die meisten Chemokine sind lösliche Proteine bestehend aus 92-125 Aminosäuren mit Signalpeptiden von 20-25 Aminosäuren, die nach der Sekretion entfernt werden. Die Gene sind auf den Chromosomen 4 und 17 lokalisiert.^[2]

3.1 Chemokine und ihre Rolle im Immunsystem

Chemokine wurden erstmals von Yoshimura 1987 und Walz 1989 unter verschiedenen Namen, in Bezug auf die Fähigkeit eine Migration von Leukozyten auszulösen, beschrieben.^{[3],[4]} Das Chemokin, das eine Wanderung der neutrophilen Granulozyten bewirkt, wurde als Neutrophile-activating peptide-1 bezeichnet, heute Interleukin-8 (IL-8).^[5] In den folgenden Jahren wurden weitere Chemokine entdeckt.^{[6],[7],[8]} Später zeigte sich, dass die biologische Bedeutung der Chemokine weit über die eines Lockstoffes für Leukozyten hinausgeht. Sowohl Zellproliferation, Hämatopoese als auch Angiogenese und verschiedene chronische Erkrankungen werden von Chemokinen beeinflusst.^{[9],[10],[11],[12]}

Mittlerweile sind ca. 50 Chemokine und 20 Rezeptoren im Menschen bekannt. Ein wichtiger Bestandteil der Primärstruktur sind die vier Cysteinreste, die einerseits durch Ausbildung von Disulfidbrücken die Struktur bestimmen und andererseits zur Klassifizierung der Chemokine genutzt werden. Chemokine werden basierend auf der Anordnung der ersten zwei Cysteinreste im N-Terminus in vier Unterfamilien (CC, CXC, CX3C und XC) eingeteilt.^[13] Im Jahr 2000 wurde eine Nomenklatur eingeführt bei der jedes Chemokin und jeder Rezeptor durch die jeweilige Unterfamilie und eine Nummer identifiziert wurde.^[14] Dadurch sollte mehr Klarheit bei der Benennung der Proteine erreicht werden, nachdem mehrere Chemokine unterschiedliche Namen hatten. Die Mitglieder der CXC-Familie aktivieren hauptsächlich neutrophile Granulozyten und die der CC-Familie wirken auf ein breiteres Spektrum von Zellen.^[15] Bezogen auf die physiologischen Eigenschaften, werden sie auch in homöostatische und inflammatorische Chemokine eingeteilt. Die Expression induzierbarer Chemokine wird durch inflammatorische Mediatoren, z.B. TNF α , IL-1, Interferon- γ verstärkt. Induzierbare Chemokine spielen eine Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort als Reaktion auf Entzündungen, Zellerstörung und anderen physiologischen Abnormalitäten.^[13] Konstitutiv exprimierte Chemokine regeln die Zelldifferenzierung und auch die Gewebeentwicklung.^[16]

Die sekretierten stark positiv geladenen Proteine werden durch die Interaktion mit negativ geladenen Glykosaminoglykanen (GAG) an den Zelloberflächen immobilisiert und bilden dadurch einen Chemokingradienten.^[17] Bestimmte Chemokine binden an verschiedene

Glykosaminoglykane mit unterschiedlichen Affinitäten. Die Glykosaminoglykanvarianten hängen von Zelltyp, Lokalisierung und dem Entzündungsstatus ab. Diese selektive Immobilisierung hat einen regulatorischen Effekt, der die Aktivität der Chemokine in bestimmten Geweben, Zellen oder Entzündungsstadien beeinflusst.^{[18],[19],[20]}

Die Aktivität der Chemokine beruht auf ihrer Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) der Leukozyten. Im ersten Schritt erfolgt eine spezifische Erkennung des Rezeptors, im zweiten, eine Konformationsänderung, die die Aktivierung auslöst. Dies führt zu einer Dissoziation des G-Proteins, das wiederum andere Effektormoleküle im Cytoplasma der Zelle aktiviert.^[21] Dadurch werden verschiedene physiologische Prozesse wie die Reifung von T- und B-Zellen induziert.^{[22],[23]} Auch die Migration dendritischer Zellen und Monozyten ins lymphatische Gewebe, wo sie heranreifen und Antigene aufnehmen, wird durch Chemokine ausgelöst.^{[24],[25],[26]} Ebenso erfolgt die Steuerung und Hemmung der Angiogenese über bestimmte Moleküle, z.B. IL-8 und NAP-2.^[27]

3.1.1 Interleukin-8 (IL-8)

Das von Yoshimura und Mitarbeitern 1987 entdeckte Interleukin-8 (CXCL8) wird als Vorstufe mit 99 Aminosäuren exprimiert und das Signalpeptid (20 aa) nach der Sekretion entfernt. Es gibt verschiedene biologische Varianten, die sich in der Länge des N-Terminus unterscheiden. Der häufigste Vertreter ist die aus 72 Aminosäuren bestehende, 8383 Da schwere IL-8-Variante.^[28] NMR-Studien zeigten, dass IL-8 in Lösung ein Monomer-Homodimer-Gleichgewicht bildet. Der ungeordnete N-Terminus des Proteins (Monomer) ist über zwei Disulfidbrücken mit der Kernstruktur verbunden. Diese besteht aus drei β -Faltblättern, gefolgt von einer C-terminalen α -Helix (*Abb. 1*).^[29] Das Chemokin wird von verschiedenen Zellarten wie Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Epithelzellen, Chondrozyten und einigen Tumoren gebildet.^{[5],[30]} Die Produktion von IL-8 wird durch verschiedene proinflammatorische Substanzen, z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Bakterien, IL-1 oder TNF α und Viren induziert.^{[31],[32],[33]} Dass Epithelzellen und Fibroblasten IL-8 sekretierten, wenn Bakterien in sie eingedrungen waren, wurde in der interessanten Studie von Eckmann und Mitarbeitern nachgewiesen. Nichtinvasive Bakterien lösten keine erhöhte IL-8-Produktion aus.^[34]

Interleukin-8, das zu den inflammatorischen Chemokinen zählt, bindet an die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2, die von neutrophilen Granulozyten und unreifen dendritischen Zellen exprimiert werden.^{[5],[35]} IL-8 aktiviert neutrophile Granulozyten und löst durch die Bindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor die Migration der Zellen sowie die Freisetzung der Granulasubstanzen und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aus.^[28] Diese Substanzen zerstören pathogene Mikroorganismen, aber auch körpereigenes Gewebe. Eine weitere Funktion von IL-8 ist die Regulierung der Blutgefäßbildung. Alle CXC-Chemokine, die das Motiv ELR (Aminosäuretriplett) vor den beiden Cysteinresten im N-Terminus besitzen, sind wichtige Promotoren bei der Angiogenese. Chemokine ohne dieses Motiv inhibieren die Angiogenese.^[27] Zwischen der IL-8 Produktion und bestimmten Erkrankungen wie Krebs, Psoriasis und COPD wurde ein Zusammenhang beobachtet.^{[36],[37],[38]}

3.1.2 Stromal cell derived factor 1 α (SDF1 α)

Das Chemokin Stromal cell derived factor 1 (SDF1, CXCL12) wurde erstmals aus Stromazellen des Knochenmarks von Mäusen isoliert. Die Varianten SDF1 α bestehend aus 89 Aminosäuren und SDF1 β aus 93 Aminosäuren (mit Signalpeptid) zeigen eine Übereinstimmung von 92% mit dem menschlichen Chemokin und werden von einem Gen auf dem Chromosom 10 kodiert.^[39] Die Struktur am N- und C-Terminus ist ungeordnet und die Kernstruktur besteht ähnlich wie bei IL-8 aus drei β -Faltblättern und einer α -Helix, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 1).^[40] Die sechs Splicevarianten von SDF1 sind alle in den ersten 68 Aminosäuren des N-Terminus identisch.^[41] Da das Chemokin ubiquitär von den meisten Zellen außer den Erythrozyten exprimiert wird und das Gen stark konserviert vorliegt, wird ihm eine wichtige Funktion, die sich von den anderen Chemokinen unterscheidet, zugeschrieben.^[39] Das Chemokin löst eine Aktinpolymerisierung bei peripheren Lymphozyten aus, aber es wurde keine Aktivität von Neutrophilen im Chemotaxisassay beobachtet.^[6] Die Entfernung des Dipeptids KP am N-Terminus sowie des Lysinrestes am C-Terminus durch Serumproteasen führt zu einer starken Verringerung der Affinität zu GAGs und bei T-Lymphozyten wird keine Ca^{2+} -Immobilisierung mehr induziert.^[42] Die Stimulierung der Proliferation von B-Zellvorstufen durch SDF1 α wurde von Nagasawa et al. festgestellt.^[43] CXCL12-defiziente Mäuse bzw. solche ohne Rezeptor (CXCR4) für SDF1 starben vor oder kurz nach der Geburt aufgrund von Fehlern bei der Hämatopoese sowie der Entwicklung des Kleinhirns.^[44] Ein Zusammenhang zwischen den Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 und der SDF1 α -induzierten Regulierung von CD34⁺-Stammzellen im Knochenmark und der Leukozytenwanderung wurde von Balabanian und Mitarbeitern bestätigt.^[45] SDF1 α verstärkt die Lebensdauer und Vermehrung von hämatopoetischen Stammzellen.^[41] Daraus wurde gefolgert, dass SDF1 α eine wichtige Rolle bei der Stammzellenrekrutierung, Organogenese und Hämatopoese spielt.^{[44],[45]}

3.1.3 Eotaxin-1

Eotaxin-1 (CCL11) gehört zur Familie der CC-Chemokine und aktiviert Eosinophile.^[2] Das Chemokin wurde erstmals von Jose et al. aus dem Bronchialschleim von Meerschweinchen, die einem Allergen ausgesetzt waren, isoliert.^[7] Das Chemokin wird von verschiedenen Gewebearten wie Endothel- und Epithelzellen, Herz, Darm, Niere und Bauchspeicheldrüse exprimiert.^[46] Eotaxinhomologe von Mäusen und Menschen zeigen eine 60%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz mit dem Eotaxin der Meerschweinchen und sind ebenfalls selektiv für Eosinophile. Eotaxin-1 besteht aus 97 Aminosäuren und enthält ein Signalpeptid aus 23 Aminosäuren. Das reife Protein besteht demnach aus 74 Aminosäuren, ist stark basisch (pI 10) und verwandt mit den MCPs (Monocyte chemoattractant proteins). Im Vergleich zu allen anderen CC-Chemokinen fehlen Eotaxin zwei Aminosäuren im N-Terminus und es enthält als erste Aminosäure ein Glycin statt Glutamin wie die MCPs.^[46] Zusätzlich enthält Eotaxin-1 drei stark konservierte aufeinanderfolgende Lysinreste im C-Terminus.^[46] Die Kernstruktur von Eotaxin-1 enthält ebenfalls drei β -Faltblätter gefolgt von einer C-terminalen α -Helix (Abb. 1).^[47]

Humane Eosinophile exprimieren eine große Menge des Rezeptors CCR3. Eotaxin bindet an die Rezeptoren CCR3 und 5, wobei die Bindung an ersteren sehr affin ist und an letzteren nur im Mikromolarbereich stattfindet.^{[48],[49]} Es aktiviert keine Neutrophilen und Monozyten, aber

3. Einleitung

löst eine geringe Chemotaxis von IL-2 konditionierten T-Lymphozyten aus.^{[50],[51]} Die Einwanderung von Eosinophilen in das Gewebe ist eine Folge von Infektionen mit Parasiten und allergischen Erkrankungen.^[52] Die Freisetzung verschiedener Mediatoren aus aktivierten Eosinophilen führt zur Abtötung der Parasiten und ist mit einer Schädigung des umliegenden Gewebes verbunden.^[53] Aufgrund des starken Einflusses auf Eosinophile ist Eotaxin das meistrelevante Chemokin bei der Entstehung von Allergien und Asthma.^[54]

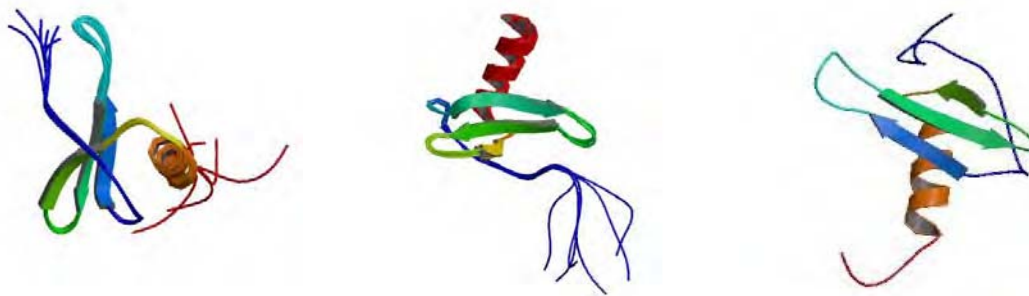


Abb. 1: Monomere von Interleukin-8 (CXCL8), *pdb1ikm*, SDF1 (CXCL12), *pdb2kec* und Eotaxin-1 (CCL11), *pdb1eot*

3.2 Chemokine und ihre Rolle bei Erkrankungen

Chemokine sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems und haben einerseits eine große Bedeutung für die Abwehr von Krankheitserregern sowie die Regenerierung von geschädigtem Gewebe und andererseits einen großen Einfluss auf den Verlauf vieler chronischer Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Krebs.^[55] CXC-Chemokine mit dem ELR-Motiv wie IL-8 induzieren die Angiogenese und beeinflussen daher die Entwicklung von Tumoren und die Bildung von Metastasen.^{[27],[56]} Bei chronischen Erkrankungen und Allergien führt die übermäßige Expression von IL-8 oder Eotaxin-1 und die dadurch einwandernden Neutrophilen bzw. Eosinophilen, die ihre reaktiven Granulasubstanzen freisetzen, zu einer Schädigung des umliegenden Gewebes.^{[57],[58],[59]} In der Studie von Abbott et al. wurden hohe Expressionsraten von SDF1 im geschädigten Gewebe nach einem Herzinfarkt und die daraus resultierende Einwanderung von Stammzellen nachgewiesen.^[60] Die Rekrutierung von epidermalen Stammzellen in durch Frost geschädigtem Gewebe sowie neuronaler Stammzellen in geschädigten Gehirngewebe durch die Sekretion von SDF1 α wurde ebenfalls in Mäusen beobachtet.^{[61],[62]} Dieses Chemokin spielt also eine wichtige Rolle bei der Regenerierung verschiedener Gewebearten nach Verletzungen.

In den 90er Jahren wurden Chemokinrezeptoren, z.B. CCR5 und CXCR4, als Corezeptoren für den *Env*-Glykoproteinkomplex vieler HIV-Stämme identifiziert.^{[63],[64]} In der Studie von Altenburg et al. wurde eine Korrelation zwischen der Fähigkeit HIV-Infektionen zu inhibieren und den verschiedenen Splicevarianten des SDF1 festgestellt. Außerdem wurden signifikante Unterschiede bei der Induktion von Chemotaxis durch die verschiedenen Splicevarianten beobachtet. SDF1 γ zeigte die höchste Anti-HIV-Wirkung und die geringste Chemotaxisaktivität.^[41]

Der SDF1 α bindende Rezeptor CXCR7 wurde auf mehreren Tumorzelllinien nachgewiesen und erhöht das Zellwachstum, die Überlebensdauer sowie die Adhäsionsfähigkeit der Zellen.^[65] Weitere Arbeiten belegen auch den Einfluss des SDF1 α -bindenden Rezeptors CXCR4 auf die Metastasenbildung verschiedener Tumorarten.^[66]

Einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten IL-8 Sekretion und verschiedenen chronischen Erkrankungen wie Colitis ulcerosa, Bronchiolitis obliterans und *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) sowie bei der Tumorentwicklung und Metastasenbildung wurde in verschiedenen Studien gezeigt.^[67] Eine hohe Anzahl von eingewanderten Neutrophilen im Muskelgewebe der Lunge wurde in COPD-Patienten von Baraldo et al. nachgewiesen.^[68] Die Freisetzung von IL-8 wird z. B. durch die Abgabe von Tryptase aus den Granula der Mastzellen bei inflammatorischen Lungenerkrankungen induziert.^[69] Mehrere Allergene von Hausstaubmilben, Schimmelpilzen, Katzen und Küchenschaben sind Proteasen, die an Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) binden und dadurch eine TNF α -induzierte IL-8-Expression zur Folge haben. Diese Rezeptoren werden von mehreren Zelltypen exprimiert. Da sie auch auf Epithel- und glatte Muskelzellen der Bronchien sowie Eosinophilen zu finden sind, wird ein Zusammenhang zwischen der IL-8-Expression und den inflammatorischen Prozessen bei Allergien vermutet.^{[70],[71],[72],[73]}

Umgekehrt wurde ein Zusammenhang zwischen der Entstehung einer juvenilen Parodontitis und einer Dysfunktion der Chemotaxis von Neutrophilen festgestellt.^[74] Eckmann et al. zeigten in ihrer Studie, dass Epithelzellen und Fibroblasten nur IL-8 sekretierten, wenn Bakterien in sie eingedrungen waren. Eine *Salmonella Dublin*-Mutante, die fünfzigmal weniger effizient Epithelzellen befiel, konnte keine IL-8 Sekretion induzieren. Ebenso wurden keine signifikanten Effekte auf die IL-8 Produktion bei Zugabe von nicht invasiven Bakterien wie *E. coli* und *E. faecium* beobachtet.^[34] Eine starke Sekretion mehrerer Chemokine, darunter IL-8, von Monozyten und Makrophagen erfolgte bei Kontakt mit Lipoarabinomannan, dem Hauptbestandteil der Zellwand von *Mycobacterium tuberculosis*.^[31] Eine Freisetzung von IL-8 und anderen Faktoren aus Alveolarmakrophagen wurde bei der Infektion mit dem Respiratorischen Synzytialvirus beobachtet. Anscheinend war hier die Expression von TNF, IL-6 und IL-8 für die Modulierung der Immunantwort wichtiger als die direkte Interaktion mit den virusinfizierten Zellen.^[33]

Dass IL-8 eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren sowie Metastasenbildung spielt, wurde in den letzten Jahren in mehreren Studien beobachtet.^[75] Die Transfektion von nicht metastasenbildenden Hautkrebstumoren mit dem IL-8-Gen führte zu einem starken Tumorstadium und einer Erhöhung der Metastasenbildung.^[56] Freund et al. fanden heraus, dass nur Östrogenrezeptor-negative Brustkrebszellen hohe Expressionslevel von IL-8 enthielten. Diese Art von Brustkrebs hat aufgrund der höheren Aggressivität und dem höheren Potenzial Metastasen zu bilden, eine deutlich schlechtere Prognose.^[36] Auch die IL-8 Sekretion von verschiedenen Darmkrebsarten führt zu einer Autoinduktion des Zellwachstums und der Angiogenese. Der Einsatz von Anti-IL-8-Antikörpern und IL-8-Antagonisten verringerte hier das Tumorstadium um 50%. Ebenfalls gibt es ähnliche Befunde zum Einfluss der IL-8-Sekretion auf die Metastasenbildung bei Prostata- und Bauchspeicheldrüsenkrebs.^{[76],[77],[78]}

Eosinophile sind notwendig bei der Abwehr von Parasiten. Wenn das umliegende Gewebe Eotaxin ausschüttet, werden Eosinophile rekrutiert. Nach der Bindung von Eotaxin an den Rezeptor CCR3 sammeln sich die Zellen in großer Anzahl um den Parasiten und setzen ROS und toxische Granulaproteine frei, um den Eindringling zu schädigen.^[79] Dass Eotaxin eine Rolle bei Allergien und Asthma spielt, wurde schon bei der Entdeckung des Chemokins vermutet.^[7] Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der hohen Expressionsrate von Eotaxin, der daraus resultierenden Einwanderung von Eosinophilen und den Symptomen von Asthma, Chronischer Nasennebenhöhlenentzündung und allergischem Schnupfen wurde in mehreren Studien belegt.^{[80],[58],[59]} In der Arbeit von Vasudevan et al. wurden hohe Expressionslevel von Eotaxin im Fettgewebe sowohl bei übergewichtigen Mäusen als auch übergewichtigen Menschen gemessen. Damit konnte eine Korrelation zwischen Fettleibigkeit und der Prädisposition zu Asthma und Allergien gezeigt werden.^[81] Erhöhte Eotaxinmengen werden auch bei Patienten mit chronischen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gemessen. Dies führt zu einer Einwanderung von Eosinophilen in die Darmschleimhaut, die aufgrund der freigesetzten Granulasubstanzen massiv gereizt und geschädigt wird.^[79]

Aufgrund des großen Einflusses der Chemokine und ihrer Rezeptoren auf die Entstehung und den Verlauf vieler chronischer Erkrankungen wie Darmentzündungen, Asthma, Rheumatoide Arthritis und Krebs sind sie ein wichtiges Ziel für die Entwicklung von Therapien.

3.3 Chemokine in der Forschung

Chemokine sind ein wichtiges Forschungsobjekt sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der angewandten Forschung. Das Ziel ist, einerseits die Struktur und Funktion und andererseits die Wechselwirkung mit den Rezeptoren und Zellen zu verstehen. Mit diesen Erkenntnissen sollen dann Therapeutika, z.B. Chemokinantagonisten, für bestimmte Erkrankungen entwickelt werden.

In den neunziger Jahren erschienen viele Publikationen über die Entdeckung, die Strukturaufklärung und das Vorkommen von Chemokinen.^{[29],[82],[39],[7]} Später folgten Forschungsberichte über den Zusammenhang zwischen der Struktur und den Mechanismen im Körper bzw. den Bindungen an Glykosaminoglykanen (GAG) und den Rezeptoren. Um einen Chemokingradienten zu erzeugen, werden die Proteine durch die Interaktion mit Glykosaminoglykanen an den Zelloberflächen immobilisiert.^[17] Die Glykosaminoglykanvarianten hängen vom Zelltyp ab und die Chemokine binden daran mit unterschiedlichen Affinitäten. Diese selektive Immobilisierung hat einen regulatorischen Effekt, der die Aktivität der Chemokine in bestimmten Geweben und Entzündungsstadien beeinflusst.^{[18],[19],[20]} Die Wechselwirkungen mit den Glykosaminoglykanen beeinflussen die Dimerisierung bzw. Oligomerisierung der Chemokine und dadurch die Bindung an die Chemokinrezeptoren.^{[83],[84],[19],[85]} Zusätzlich wird die Proteolyse verschiedener Chemokine durch die Bindung an GAGs inhibiert.^{[86],[87]}

Ein großes Feld in der Chemokinforschung sind die Rezeptor-Ligand-Interaktionen und die Aktivierung der Zellen. Für die Bindung an Rezeptoren und die Aktivierung der Zellen sind die N-Termini der Chemokine relevant. Diese Erkenntnis stammt aus Studien, in denen, z.B. Alaninmutagenesescans mit dem N-Terminus von IL-8 durchgeführt wurden.^[88] Ebenso wurden auch Rezeptor- und Chemokinchimären getestet, um die bindungsrelevanten Proteinab-

schnitte zu identifizieren.^{[89],[90]} Chemokinanaloge mit verkürzten oder verlängerten N-Termini zeigten zwar die gleiche Bindungsstärke zu den Rezeptoren aber eine verminderte Aktivität gegenüber dem Wildtyp.^{[91],[92],[93]} In der CXC-Familie werden zwei Untergruppen unterschieden, die ELR⁺ und die ELR⁻-Chemokine. ELR steht für das aus Glutaminsäure, Leucin und Arginin bestehende Aminosäuretriolett. Dieses Motiv liegt im N-Terminus und ist essentiell für die Aktivierung der jeweiligen Chemokinrezeptoren (CXCR1/2). Da Rezeptoren, die ELR⁺-Chemokine binden, eine große Rolle bei der Angiogenese spielen und dadurch verschiedene Erkrankungen, z.B. Krebs beeinflussen, wurden viele Therapeutika entwickelt, die diese Aktivierung hemmen. Dazu zählen Antikörper, N-terminal modifizierte Chemokine, kompetitive Antagonisten und allosterische Inhibitoren.^{[94],[67]} Der Einsatz von Anti-IL-8-Antikörpern im Mausmodell verringerte sowohl das Tumorwachstum von Lungenkrebs um mehr als 40% als auch die Metastasenbildung.^[95] Andere Oligopeptide, die das ELR⁺-Motiv enthielten, zeigten keine Bindung an den Rezeptor. Dadurch wurde ersichtlich, dass noch ein anderer Bereich außerhalb des N-Terminus des Chemokins für die Rezeptor-Ligand-Interaktion wichtig ist.^[90] Der Austausch der Aminosäuren des ELR-Motivs in IL-8 brachte gut bindende Antagonisten hervor. Das ELR-Motiv ist also für die Rezeptoraktivierung notwendig.^[96]

Bei HIV-Infektionen spielen die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5, die als Corezeptoren für das virale Fusionsprotein gp120 dienen, eine wichtige Rolle. Bei bestimmten Chemokinen wie SDF1 γ , das an dem Rezeptor CXCR4 bindet, wurde eine antivirale Wirkung festgestellt.^[41, 97, 98] Eine am N-Terminus chemisch modifizierte Variante von RANTES wirkte im nanomolaren Bereich als CCR5-Antagonist und inhibierte die HIV-1-Infektion verschiedener Zelltypen wie Makrophagen und Lymphozyten.^[99] Wu et al. produzierten verschiedene Antikörper gegen CCR5 und beobachteten, dass der Antikörper 2D7 bei der Bindung an die zweite extrazelluläre Schleife des Rezeptors die Aktivität der Chemokine und auch die Infektion mit HIV-1 inhibierte. Die Bindung eines Antikörpers an den N-Terminus des Rezeptors verhinderte die Infektion, hemmte aber nicht die Aktivierung durch die Chemokine.^[100]

Der Nachteil von Chemokinderivaten und peptidischen Inhibitoren ist, dass sie keine idealen Medikamente aufgrund der schwierigen Herstellung und der Verabreichung darstellen. Die orale Aufnahme und auch die intravenöse Verabreichung sind wegen des Abbaus durch Proteasen, d.h. der geringen Halbwertszeit der Substanzen, nicht möglich. Daher geht der Trend immer mehr zu Inhibitoren, die nicht proteinogen sind.^{[101],[102]}

Um Bindungsstudien durchführen zu können, werden große Mengen Chemokine benötigt. Einige Gruppen stellten ihre zu untersuchenden Chemokine mittels Festphasensynthese synthetisch her.^{[103],[104],[47]} Häufig werden aber Eukaryonten und auch Bakterien für die heterologe Expression der Chemokine eingesetzt.^{[105],[106],[107],[108]}

3.4 Klonierung und Expression in *Escherichia coli*

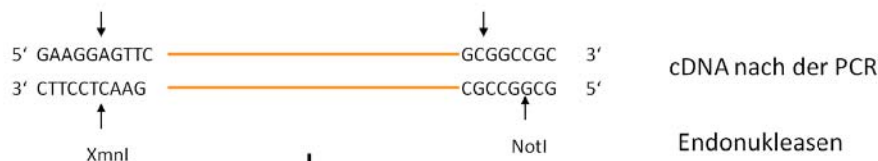
Unter den vielen verfügbaren Expressionssystemen für die heterologe Proteinproduktion ist das Bakterium *Escherichia coli* eines der attraktivsten aufgrund der hohen Wachstumsrate und der dadurch entstehenden hohen Zelldichten in kostengünstigen Nährmedien. Zudem ist

das Genom sehr gut charakterisiert und eine große Anzahl an Klonierungs- und Expressionsvektoren sowie verschiedene Stämme stehen zur Verfügung.^[109] Das Genom der biotechnologisch verwendeten *E. coli*-Stämme wurde gegenüber natürlichen Varianten um ca. 14% verkleinert, um unbekannte bzw. nicht lebensnotwendige sowie mögliche pathogene Eigenschaften zu entfernen.^[110] Ein anderer Vorteil ist die geringe Wahrscheinlichkeit einer Allergieinduktion, da es ein natürlicher Bestandteil des menschlichen Organismus ist.

Vor der Herstellung rekombinanter Proteine muss die genetische Information in einen Wirtsorganismus überführt werden. Die Übertragung eines DNA-Fragments, z.B. ein Gen, das ein Chemokin kodiert, in ein sich selbst replizierendes Trägermolekül, wird als DNA-Klonierung oder Molekulare Klonierung bezeichnet. Als Trägermoleküle, auch Vektoren genannt, werden häufig die bakteriellen Plasmide, ringförmige extrachromosomale DNA-Moleküle, die sich unabhängig vom Genom innerhalb der Zelle vermehren können, verwendet. In der Natur enthalten viele dieser Plasmide Resistenzgene und verleihen dem jeweiligen Bakterium einen Überlebensvorteil bei Kontakt mit dem entsprechenden Antibiotikum. Die in der Molekularbiologie verwendeten Plasmidvektoren sind von den natürlichen abgeleitet. Sie enthalten einen Replikationsstartpunkt (*ori*), ein Resistenzgen und eine künstlich eingefügte Multiple Cloning Site (MCS). Diese Region enthält mehrere Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Damit lässt sich der Vektor an einer Stelle gezielt öffnen. Das DNA-Fragment (Insert) wird mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert und ihm werden gleichzeitig Restriktionsschnittstellen am 5'- und am 3'-Ende des Moleküls angehängt, die auch zum Schneiden des Vektors verwendet werden. Mit dem Einsatz der Restriktionsenzyme werden am Vektor sowie am Insert glatte oder überhängende komplementäre DNA-Enden erzeugt (Abb. 2), die dann im nächsten Schritt, bei der Ligation miteinander verknüpft werden (Abb. 3). Die Ligation erfolgt mittels T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym, aus dem Bakteriophagen T4, bildet Phosphodiesterbindungen zwischen den Enden der beiden DNA-Moleküle und generiert somit den Ringschluss. Der so entstandene rekombinante Vektor wird in den Wirtsorganismus transformiert. Nur Bakterien, die den Vektor enthalten, wachsen auf dem antibiotikumhaltigen festen Nährmedium (Agar-LB) und werden von nicht-rekombinanten Zellen selektiert. Eine Bakterienkolonie besteht aus genetisch identischen Zellen, die durch Zellteilung aus einer einzelnen rekombinanten Zelle hervorgegangen sind. Die rekombinanten Bakterienzellen werden zur Amplifikation in ein flüssiges Medium überführt. Durch weitere Zellteilung entsteht dabei eine große Anzahl der Bakterien, die den Vektor mit der eingefügten Fremd-DNA enthalten.

Um die DNA-Fragmente für die Klonierung zu erhalten, gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten. Die mRNA aus den exprimierenden Zellen wird isoliert. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase und entsprechenden Primern wird aus der mRNA eine DNA-Kopie des Gens, das z.B. IL-8 kodiert, erzeugt, die als komplementäre DNA (cDNA) bezeichnet wird. Heutzutage ist die Gensequenz vieler humaner Proteine bekannt und kann synthetisch hergestellt werden. Diese cDNAs werden in Klonierungsvektoren eingefügt und können vermehrt und als Templat für die Amplifikation des DNA-Fragments eingesetzt werden.

- Insert (cDNA)



- Vektor (Plasmid)

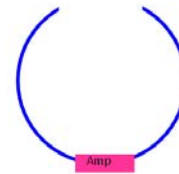


Abb. 2: DNA-Fragment (Insert) und Vektor nach Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *XmnI* und *NotI*

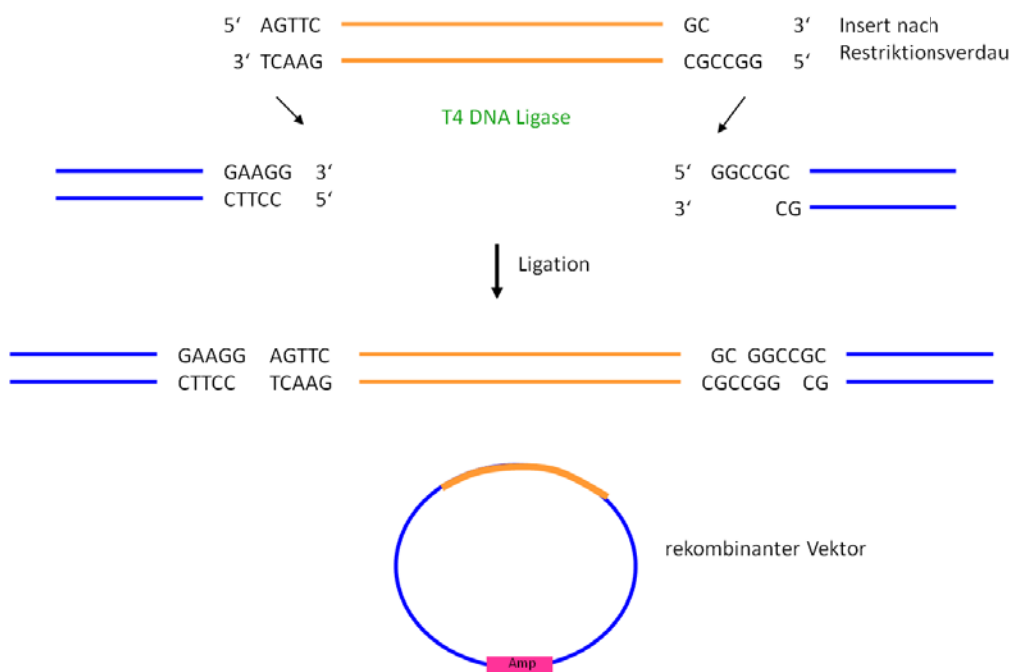


Abb. 3: Ligation der DNA-Fragmentenden mit den Enden des geöffneten Vektors

Das meistverwendete Expressionssystem in *E. coli* ist das von Studier et al. entwickelte pET-System (Expression durch T7-RNA-Polymerase). Die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 ist spezifisch für einen bestimmten Promotor und wird von wenigen Terminationscodons gestoppt. Zudem arbeitet sie fünfmal schneller als die RNA-Polymerase von *E. coli*.^[111] Das Gen für die Polymerase wurde bei bestimmten Bakterienstämmen, die die Abkürzung DE3 enthalten in das Genom integriert. D.h. diese Expressionstämme können für die Expression von Genen mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase genutzt werden. Häufig genutzte Stämme sind die BL21 DE3-Derivate.^{[112],[113]}

3. Einleitung

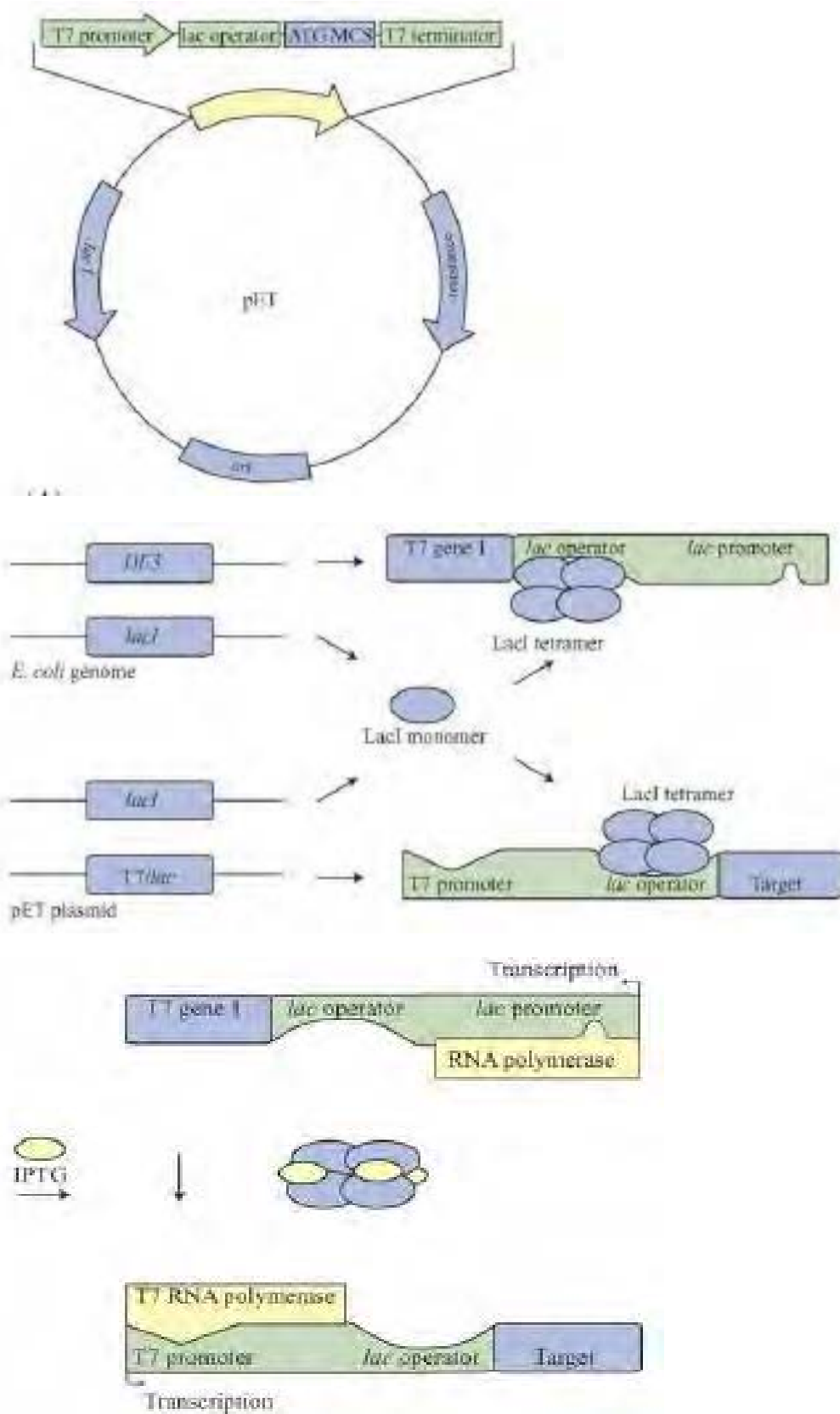


Abb. 4: pET-System mit lac-Operator und lacI-Gen^[114]

Die Regulierung der T7-RNA-Polymerase und des T7-Promotors erfolgt über den Regulationsmechanismus des lac-Operons. Das *lacI*-Gen, das den Repressor codiert, ist sowohl vor dem T7-RNA-Polymerase-Gen im Genom als auch vor dem T7-Promotor im Vektor einge-

fügt. Der Repressor, ein homotetrameres Protein, bindet an den *lac*-Operator direkt hinter der Promotorsequenz und verhindert dadurch die Bindung der RNA-Polymerase (Abb. 4).

Durch Zugabe eines Galaktosederivates, z.B. Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), wird die Expression induziert. Das IPTG bindet an das Repressorprotein und verändert dessen Konformation. Dadurch löst sich das Protein vom Promotor und gibt die Bindungsstelle für die T7-RNA-Polymerase frei (Abb. 4).

Weitere Vektoren mit anderen Regulationsmechanismen sind kommerziell erhältlich. Es gibt Expressionsvektoren mit verschiedenen Promotoren bzw. Hybridpromotoren. Der Promotor λP_L wird über die Temperatur reguliert.^[115] Die Promotoren P_{trp} und P_{phoA} werden über die Tryptophan- bzw. Phosphatkonzentration reguliert.^[82] Ebenfalls gibt es Promotoren, die über die Glucosekonzentration, den pH-Wert oder die Sauerstoffkonzentration geregelt werden.^[116] Die Verwendung von kälteinduzierten Promotoren (P_{cspA}) ermöglicht eine langsamere Transkription und Translation, aber verringert nicht die Proteinfaltung. Dadurch wird die Bildung aktiver Proteine erhöht und die von unlöslichen Aggregaten reduziert.^[117]

Ein anderes Expressionssystem ist das *araBAD*-System, das eine L-Arabinose induzierte lineare Expression des Zielproteins ermöglicht. D.h. die Genexpression steigt linear mit ansteigender Induktorkonzentration.^[118] Der Regulationsmechanismus beruht auf dem *ara*-Operon, das analog zum *lac*-Operon ist. Bei Zugabe von L-Arabinose ändert der Repressor seine Konformation und die Bindungsstelle für die RNA-Polymerase wird freigegeben.^[114]

Nicht nur der Expressionsvektor beeinflusst die Biosynthese rekombinanter Proteine, sondern auch der verwendete Bakterienstamm. Keine oder eine geringe Expression beruht oft auf einer instabilen mRNA oder dem Vorhandensein der vom Wirtsorganismus selten verwendeten Codons in der cDNA. Durch gezielte Mutagenese der Codons oder dem Einsatz von synthetisch codonoptimierten DNA-Sequenzen kann die DNA für die Expression im Wirtsorganismus optimiert werden. Zusätzlich können Expressionsstämme, die tRNAs seltener Codons überexprimieren, die Expressionsrate erhöhen.^{[119],[116],[114]} Um den Abbau der rekombinanten Proteine zu verhindern, wurden in vielen Expressionsstämmen mehrere cytosolische Proteasen entfernt. Die Aggregatbildung (*inclusion bodies*), die oft eine Folge der Überproduktion ist, ist ein großes Problem bei der Herstellung von Proteinen in *E. coli*. Einschlußkörperchen (*inclusion bodies*) sind Aggregate, die aus nicht korrekt gefalteten Proteinen bestehen.^[120] Eine niedrige Temperatur, gleichzeitige Expression von Chaperonen oder die Expression des Zielproteins als Fusionsprotein kann die Bildung von *inclusion bodies* vermindern. Die Verwendung von Thioreduktase-defizienten Stämmen oder die Coexpression von Thioredoxin erhöht die Ausbildung von Disulfidbrücken, begünstigt daher die Faltung des Proteins und hat eine geringere Aggregatbildung zu Folge.^{[121],[122]}

3.5 Reinigung von rekombinanten Proteinen

Die Reinigung eines Proteins ist von seinen physikalischen Eigenschaften abhängig. Die Größe, der isoelektrische Punkt, bestimmte Bindungsstellen und die Stabilität beeinflussen einerseits den Reinigungsprozess und können andererseits dafür genutzt werden. Das Ausgangsmaterial bzw. wo und wie die rekombinanten Proteine vorliegen, ist ein weiterer Faktor der

3. Einleitung

den Anfang des Reinigungsprozesses bestimmt. Das Zielprotein kann intrazellulär, periplasmatisch oder extrazellulär vorliegen. Bei intrazellulären Produkten werden lösliche von unlöslichen (*inclusion bodies*) unterschieden.

Sekretierte Proteine werden häufig beim Einsatz von Säugetier- und Hefezellen erhalten, da sie fähig sind, die Signalpeptide sekretorischer Proteine wie die der Chemokine zu erkennen. Liegt das Zielprotein im Medium vor ist es stark verdünnt und wird durch Zentrifugation von den Zellen getrennt. Eine Konzentrierung erfolgt meistens mit Hilfe der Ultrafiltration oder auch durch Zugabe von Ionenaustauscherharzen ins Medium.^{[123],[124]} Die Reinigung kann dann je nach den Eigenschaften des Proteins mit der Ammoniumsulfatfällung und/oder verschiedenen Chromatographieschritten durchgeführt werden.^[106]

Rekombinante Proteine, die innerhalb der Zellen vorliegen, werden über die Zelllyse freigesetzt. Um große Mengen eines rekombinanten Proteins aus *E. coli* zu erhalten, ist die Wahl der Lysemethode, von der die Freisetzung der Proteine aus den Zellen in den Zellysätüberstand abhängt, sehr wichtig. Zu den Verfahren, um Bakterienzellen aufzuschließen, gehören mechanische Methoden wie Ultraschall und French press. Hierbei werden die Zellen über Kavitations- oder Scherkräfte zerstört. Ebenfalls werden die Zellwände durch Eiskristalle beim Gefrier-Tau-Zyklus geschädigt. Der Einsatz von Lysozym und DNase zählt zu den enzymatischen und die Zugabe von Detergenzien sowie Natronlauge zu den chemischen Lysemethoden. Bei Gram-negativen Bakterien, z.B. *E. coli* wird durch Zugabe von EDTA die Lipopolysaccharidschicht durch Bindung der Ca^{2+} -Ionen destabilisiert. Lysozym spaltet die Peptidoglykanschicht der Bakterien. Mit der Zugabe eines nichtionischen Detergenz, z.B. Triton X-100 oder CHAPS, wird die Zellmembran zerstört und zusätzlich werden die hydrophoben Interaktionen zwischen den freigesetzten Proteinen inhibiert. Die Zugabe von Proteasehemmern und das Arbeiten bei niedrigen Temperaturen verhindern den Abbau des rekombinanten Proteins durch Proteasen. Nach der Zelllyse werden die Zellmembran- und Zellwandbestandteile vom Zielprotein ebenfalls durch Zentrifugation getrennt.^{[125],[82]}

Lösliche Proteine befinden sich nach der Abtrennung der Zelltrümmer im Zellysätüberstand, der dann mittels Chromatographiemethoden gereinigt wird. Je nach isoelektrischem Punkt des Proteins ist die Ionenaustauschchromatographie oft der erste Reinigungsschritt. Stark basische Proteine wie Lysozym, Chemokine und Cytochrom C werden mittels Kationenaustauschchromatographie und saure Proteine wie Gonadotropin und Insulin mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Da der Zellysätüberstand meist mehrere gleich geladene Proteine enthält, ist die Ionenaustauschchromatographie selten als einziger Reinigungsschritt ausreichend. Weitere Eigenschaften wie Affinitäten zu anderen Molekülen, z.B. Glykosaminoglykane oder die Hydrophobizität des Zielproteins dienen den nachfolgenden Chromatographieschritten. Chemokine werden häufig mit zwei bis drei Chromatographiemethoden gereinigt. Dazu werden oft Kationenaustauscher und Heparinsäulen verwendet.^{[126],[127]} Als zweiter oder dritter Chromatographieschritt wird von einigen Gruppen die RP-HPLC oder Gelfiltration genutzt.^{[128],[124]}

Durch Zugabe von denaturierenden Substanzen wie Harnstoff oder Guanidin und Reduktionsmitteln können unlösliche Proteine in die lösliche Form überführt werden.^{[128],[129],[130]}

Um die Proteine in ihren nativen Zustand zu überführen, werden sie durch langsames Entfernen der denaturierenden und reduzierenden Substanzen und gleichzeitiger Zuführung von Oxidationsmitteln zurückgefaltet.^{[131],[132],[133]} Der Austausch der Puffersubstanzen kann mit der Dialyse oder an der Säule erfolgen.^{[134],[113],[130]} Sowohl der Gebrauch von Größenausschluss- als auch Ionenaustauscher- und Affinitätssäulen sind für die Rückfaltung üblich.^{[135],[130]} Danach können die rückgefalteten nativen Proteine wie lösliche Proteine mit Hilfe ihrer physikalischen Eigenschaften endgereinigt werden.

Mehr als die Hälfte aller rekombinant in *E. coli* produzierten Proteine fallen als *inclusion bodies* aus, wenn sie überexprimiert werden.^[136] Die Absenkung der Zellkulturtemperatur ist eine übliche Methode, um die Löslichkeit zu verbessern. Die Faltung und die daraus resultierende Löslichkeit des Proteins kann durch Affinitätstags positiv beeinflusst werden. Die Affinitätstags *Maltose binding protein* (MBP) und *N utilization substance A* (NusA) verbessern die Löslichkeit und erster wird auch zur Reinigung eingesetzt.^{[137],[138]} Rekombinant hergestellte Proteine mit Affinitätstags ermöglichen eine einfache Reinigung mittels Affinitätschromatographie.

Affinitätstags werden in zwei Klassen eingeteilt. Eine Klasse sind kleine Peptide oder Proteine, z.B. FLAG-, *Strep*- und *cbp*-tag, die spezifisch an andere Proteine, z.B. Anti-FLAG-Antikörper und *Strep*-Tactin binden. Die Affinitätssäulen mit den immobilisierten Proteinen sind meistens sehr teuer. Die andere Klasse der Affinitätstags beinhaltet größere Proteine, z.B. GST- und MBP-tags (26 und 40 kDa), die an kleinere Liganden binden und die dafür genutzten Säulenmatrices sind kostengünstiger und stabiler. Der 6× Histidin-tag, der an immobilisierte zweiwertige Metallionen bindet, ist der meist verwendete Affinitätstag (Abb. 5).^{[139],[140]}

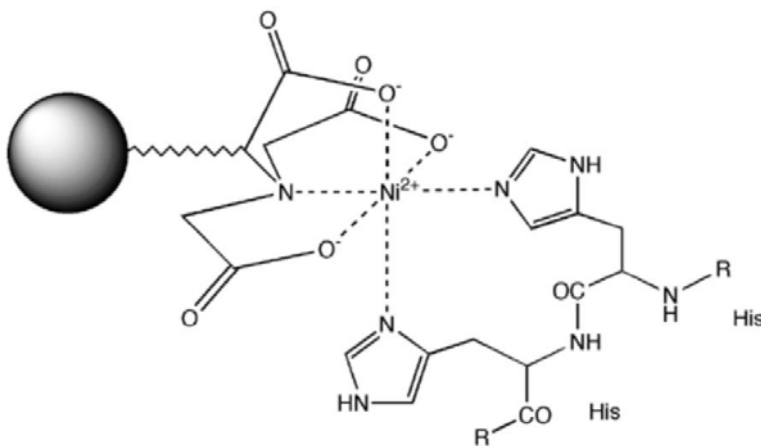


Abb. 5: Bindung des His₆-tag an Ni²⁺-Nitriloessigsäure, www.nanoprobes.com

Der His₆-tag funktioniert unter nativen und denaturierenden Bedingungen, weshalb auch Proteine, die als Aggregate vorliegen nach Zugabe von Harnstoff an die Säule gebunden werden.^[140] Solange das denaturierte Protein gebunden ist, kann eine Rückfaltung direkt an der Säule erfolgen.^[130] Für die Elution wird oft Imidazol oder ein niedriger pH genutzt. Das Säulenmaterial kann mehrfach verwendet werden, wenn die Regenerierungsprotokolle eingehalten werden.

Ein Problem bei der Anwendung von Affinitätstags ist die mögliche Interaktion mit dem Zielprotein bzw. der Einfluss auf die Funktion und Aktivität des Proteins. Für die Strukturbestimmung und die Anwendung in Bindungsstudien können die Anhänge hinderlich sein. Daher ist es wichtig den Affinitätstag nach der Reinigung zu entfernen. Dies wird durch den Einsatz bestimmter Proteasen gewährleistet, wenn bei der Klonierung zwischen dem Affinitätstag und dem Zielprotein eine Proteaseerkennungssequenz eingefügt wurde. Die Proteasen Enterokinase und Faktor Xa können aufgrund der Erkennungssequenzen den korrekten N-Terminus des Zielproteins nach dem Abschneiden eines N-terminalen tags freisetzen. Oft finden jedoch unspezifische Schnitte in anderen Bereichen des Fusionsproteins statt.^{[141],[142],[143]} Eine höhere Sequenzspezifität weisen die Tobacco Etch Virus (TEV)-Protease, die Rhinovirus-Protease und Thrombin auf. Diese Proteasen hinterlassen, nach der Entfernung eines N-terminalen Affinitätstags, ein oder zwei Aminosäuren am Zielprotein. Allerdings kann die C-terminale Aminosäure der Schnittstelle der TEV-Protease variiert und daher dem N-Terminus einiger Proteine angepasst werden.^[144] Ein größeres Problem ist die Entfernung von C-terminalen Affinitätstags. Da die erkenntungsspezifischen Aminosäuren der meisten Endoproteasen auf der N-terminalen Seite der Sequenz liegen, bleiben nach dem Proteaseverdau vier bis sechs Aminosäuren am C-Terminus des Zielproteins zurück.^[140]

3.6 Endotoxine

Eine der Hauptkontaminationen in Lösungen von rekombinanten Proteinen, die in *E. coli* hergestellt wurden, sind die Endotoxine (Abb. 6). Die Lipopolysaccharide (LPS) der gramnegativen Bakterien binden im Blut eines Menschen an das Serumprotein Lipopolysaccharidbindendes-Protein (LBP). Dieser Komplex kann an den Oberflächenrezeptoren von Leukozyten, z.B. Monozyten binden und löst dadurch die Freisetzung proinflammatorischer Substanzen wie Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-1 β aus. Diese Reaktionen können dann zu Fieber oder sogar zu einem septischen Schock führen.

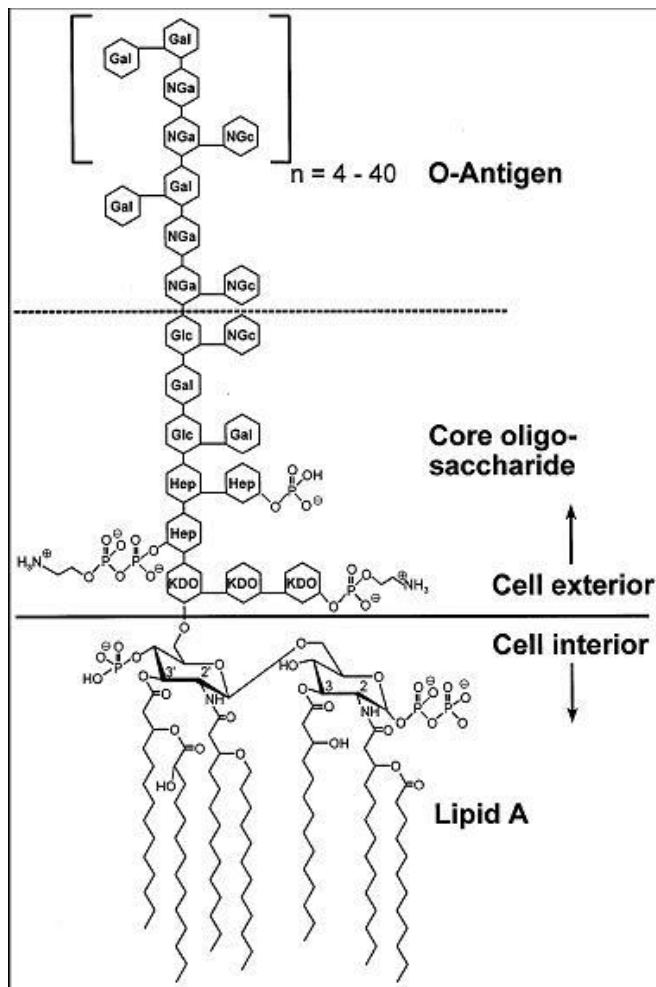


Abb. 6: Struktur von Lipopolysacchariden^[145]

Schon extrem geringe Mengen verursachen eine Reaktion bei Leukozyten, so dass bei Aktivitätstests starke Nebeneffekte auftreten würden. Daher ist es absolut notwendig, diese Moleküle aus Medikamenten und anderen biologischen Wirkstoffen zu entfernen. Die höchste Konzentration für intravenöse Verabreichungen von pharmazeutischen und biologischen Produkten sind 5 Endotoxineinheiten (EU) pro kg Körpergewicht.^[146] Eine EU entspricht 120 pg Endotoxine von *E. coli*. Die Lipopolysaccharide sind sehr stabile Moleküle und bleiben auch bei hohen Temperaturen und extremen pH-Werten intakt. Das heißt, durch das Autoklavieren von Labormaterial können Endotoxine nicht deaktiviert werden.^[147] Mehrere Methoden wurden in den letzten Jahren für die Entfernung von LPS entwickelt. Dazu zählen die Affinitätschromatographie mit Polymyxin B, die Ultrafiltration, hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC), Ionenaustauschchromatographie (IEX) und die Phasentrennung mittels Triton X-114. Der Erfolg bei der Abtrennung von Endotoxinen hängt stark von den Eigenschaften des rekombinanten Zielproteins ab. Aufgrund der negativen Ladung der LPS ergeben sich elektrostatische Wechselwirkungen mit einigen positiv geladenen Proteinen wie Lysozym und Lactoferrin.^[148, 149] Bei der Anwendung der Anionenaustauschchromatographie führt die Komplexbildung zwischen Protein und LPS dazu, dass positiv geladene Proteine die Endotoxine durch die Säule mitziehen und die Effizienz der Entfernung deutlich verringert wird.^[150]

Polymyxin B ist ein antibiotisches Peptid, das mit einer hohen Affinität an den Lipid A-Teil von Lipopolysacchariden bindet.^[145] Die Verwendung von Polymyxin B-Säulen reduziert die Endotoxinkonzentration in Wasser und Lösungen, in denen Endotoxine ungebunden vorliegen.^[151] Weniger effektiv war die LPS-Entfernung aus Proteinlösungen. Eine Verbesserung wurde von Karplus 1989 durch die Zugabe eines nicht ionischen Detergenz erbracht. Dieses Detergenz führte zu einer Dissoziation der Protein-LPS-Komplexe, was eine effektivere Bindung der Endotoxine an die Polymyxin B-Säule zur Folge hatte.^[152]

Die Zweiphasenmethode beruht auf den hydrohoben Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten des Lipids A der LPS und einem Detergenz. Oberhalb einer bestimmten Temperatur (*cloud point*) aggregieren die Micellen zu Tropfen und bilden eine separate micellenreiche Phase, in der die Endotoxine gebunden vorliegen. Durch eine weitere Temperaturerhöhung und Zentrifugation werden die wässrige und micellenreiche Phase voneinander getrennt, wobei letztere am Boden des Gefäßes abgelagert wird.^{[153],[154]} Besonders geeignet dafür, ist das Detergenz Triton X-114, das seinen *cloud point* bei 22°C hat. Damit werden die Endotoxine von den Proteinen bei niedrigen Temperaturen dissoziiert und durch eine Temperaturerhöhung auf über 22°C mit der Bildung der micellenreichen Phase aus der Lösung entfernt. Um die Endotoxinkonzentration auf ein Minimum zu reduzieren, sollte der Prozess mehrmals durchgeführt werden.^[153, 154] Reichelt et al. testeten die Möglichkeit Endotoxine während der Chromatographie mit Hilfe von Triton X-114 zu eliminieren. Nach Bindung von His-tag oder GST-tag gekoppelten Proteinen an die Säule wurde die Endotoxinkonzentration durch das Waschen mit Puffer, der 0,1% Triton X-114 enthielt, deutlich reduziert.^[155] Ebenfalls wurde durch Spülen mit einem 1% Triton X-114-haltigen Waschpuffer die LPS-Menge von am Kationenaustauscher gebundenen Proteinen verringert.^[129]

3.7 Zielsetzung

Die Bedeutung der Chemokine bei verschiedenen chronischen Erkrankungen wie Asthma, Morbus Crohn und Krebs führt dazu, dass sich viele Forschungsgruppen mit der Struktur und Funktion dieser kleinen Proteine beschäftigen. In unserer Arbeitsgruppe liegt der Fokus auf den Rezeptor-Ligand-Interaktionen. Dabei werden momentan die Wechselwirkungen von Chemokinen mit Leitstrukturen von Inhibitoren getestet.

Da für die Bindungsstudien, Aktivitätstests und Zellmigrationstests große Mengen Chemokine benötigt werden und diese sehr teuer sind, sollten in dieser Arbeit die Proteine rekombinant hergestellt werden. Zudem sollte ein Expressionssystem etabliert werden, das sowohl die Herstellung großer Proteinmengen als auch die Vorteile für die Herstellung abgewandelter Produkte durch Punktmutationen, Aminosäuredeletionen und Isotopenmarkierung ermöglicht.

Es sollten drei verschiedene synthetische cDNAs, die die humanen Chemokine Interleukin-8, SDF1 α und Eotaxin-1 kodieren, in verschiedene Expressionsvektoren kloniert werden. Um Bindungsstudien durchführen zu können, sollten die rekombinanten Chemokine den korrekten N-Terminus, der die Bindung an den Rezeptor gewährleistet, enthalten. Daher sollten die Chemokine tagfrei exprimiert werden bzw. bei der Verwendung von Affinitätstags so konstruiert sein, dass der Anhang entfernt werden kann.

Als Wirtsorganismus sollte das einfach zu kultivierende Darmbakterium *Escherichia coli* verwendet werden. Es standen verschiedene Expressionsstämme zur Verfügung. Bei den Expressionsanalysen im Testmaßstab sollte einerseits ein geeigneter Expressionsstamm identifiziert und andererseits die Expressionsbedingungen getestet und optimiert werden. Rekombinante Zellen, die ein Chemokin stark exprimieren, sollten in einem größeren Maßstab für die Produktion und Reinigung großer Mengen angesetzt werden.

Weiterhin war das Ziel der Arbeit, eine Methode zu etablieren mit der die rekombinanten humanen Chemokine gereinigt werden können. Für die Reinigung sollten die physikalischen und strukturellen Eigenschaften der Chemokine genutzt werden. Die Reinigung sollte mittels verschiedener chromatographischer Methoden getestet werden. Außerdem sollten mehrere Methoden zur Entfernung der Lipopolysaccharide aus Proteinlösungen getestet werden. Die Eliminierung der Endotoxine ist besonders wichtig, wenn die rekombinanten Chemokine in Aktivitäts- und Zellmigrationstests mit Leukozyten eingesetzt werden sollen.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Material

Tab. 1: Chemikalien und Material

Chemikalie/Material	Hersteller
Acetonitril Chromasolv für HPLC	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Agar-Agar, Kobe I pulv.	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Alexa Fluor Phalloidin 488	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Ammoniumperoxodisulfat zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Bacillo [®] AF	Bode Chemie GmbH, Hamburg, DE
BCA-Assay	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Calciumchlorid-Dihydrat z.A. ACS	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Color Plus Prestained Protein Marker Broad Range 7-175 kDa	New UK Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
Complete Mini Proteasecocktail	Roche, Basel, CH
Coomassie Brilliant Blue	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Cytochrome C from bovine heart	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Desoxyribonuclease I from bovine pancreas (3550 u/mg)	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Desoxyribonuclease II Type V from bovine spleen	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dithiothreitol DTT	Molecular, Watertown, MA, USA
Endotoxin Removal Kit	Genscript, Piscataway, NJ, USA
Eppendorfreaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Essigsäure Rotipuran [®] 100% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol ≥96 % vergällt, mit ca. 1 % MEK	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol Rotipuran [®] 99,9% p.a. ACS, ISO	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure EDTA	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Falcons 15 ml und 50 ml	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Filterpapier	BioRad, Hercules, CA, USA
Glasfaserfilter	Schleicher&Schuell MicroScience GmbH, Dassel, DE
Glycerol Laboratory reagent grade	Fisher Scientific, Schwerte, DE

4. Material und Methoden

Chemikalie/Material	Hersteller
Glycin $\geq 99\%$ p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Harnstoff $\geq 95\%$ p.a., Ultra Qualität Carbamid, Urea	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hepes Pufferan [®] $\geq 99,5\%$ p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Imidazol $\geq 99\%$ Puffersubstanz ACS	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside IPTG für die Biochemie	Acros Organics, Fisher Scientific, Schwerte, DE
Kanamycin Sulfat	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Latexhandschuhe	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
LB-Medium (Luria/Miller) f. Molekularbiologie	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Lysozym aus Hühnereiweiß (7864 u/mg)	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Magermilchpulver for microbiology	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Magnesiumsulfat zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Methanol Rotipuran [®] $\geq 99,9\%$ p.a. ACS, ISO	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid $\geq 99,9\%$ p.a. ACS, ISO	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat Ph. Eur.	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumfluorid $\geq 99\%$ p.a. ACS, ISO	Carl Roth, Karlsruhe, DE
N-Formyl-Met-Leu-Phe fMLP	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Nitrilhandschuhe	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Ortho-Phosphorsäure 85%	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Platelet activating factor PAF $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Pipettenspitzen 0,5-10 μ l, 2-200 μ l, 0,1-1 ml, 1-5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Propanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ribonuclease A Type I-A from bovine pancreas	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Rotiphorese Gel 30 (37; 5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Roti-PVDF-Membran	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Saccharose für mikrobiologische Zwecke	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Salzsäure 25% p.a.	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Superloop 50 ml	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
SUPRASIL [®] Quarzküvette 1 mm	Hellma Optik GmbH, Müllheim, DE
TEMED 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine liquid substrate system for electrophoresis	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
ToxinSensor [™] Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit	Genscript, Piscataway, NJ, USA
Trifluoressigsäure for protein sequencing $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA

Chemikalie/Material	Hersteller
Tris \geq 99% Ph. Eur.; USP	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Triton X-114	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA
α -Cyano-4-hydroxymizsäure	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA

4.2 Geräte und Software

Tab. 2: Geräte und Software

Geräte/Software	Hersteller
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems DE GmbH, Darmstadt, DE
4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer	AB/MDS SCIEX, Darmstadt, DE
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
ÄKTA Purifier	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
BioEdit	Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA
Brutschrank Heraeus	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Elektrophoresekammer MIDI 1	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Elektrophoresekammer MIDI Plus	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fluoreszenzreader infinite F200	Tecan Trading AG, Männedorf, CH
Horizontale Gelelektrophoresekammer	Carl Roth, Karlsruhe, DE
IKA [®] RH basic 2 Magnetrührer	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
IKAMAG [®] RET Magnetrührer	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Image Master [®] VDS Geldokumentieranlage	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA
Incubator Shaker innova [™] 4400	Artisan Scientific Corporation, Champaign, IL, USA
Inkubator IKA [®] KS 4000i control	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
J-815 CD-Spektrometer	JASCO Inc., Easton, MD, USA
Kombinationschüttler ROTO SHAKE GENIE	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
LumiAnalyst 3.1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Lumi-Imager F1 [™]	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Mikrowelle R-208	SHARP Electronics GmbH, Hamburg, DE
MINI Semi-Dry-Blotter	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad, Hercules, CA, USA
pH-Meter HI 221 pH/mV/°C Bench Meter	HANNA instruments [®] , Inc., Woonsocket, RI, USA
Power Ease 500 Power Supply	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Rotina 420R	Hettich AG, Bäch, CH
Schweißgerät Severin Folio	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, DE
Sterilisator 135-MS SHP LABOKLAV	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, DE

4. Material und Methoden

Geräte/Software	Hersteller
Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, DE
Ultraschallbad Bandelin Sonorex	Bandelin electronic, Berlin, DE
Ultraschallgerät Bandelin Sonopuls	Bandelin electronic, Berlin, DE
Ultrazentrifuge BHG Hermle ZK 401	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, DE
UNICORN™ 5.0	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
UV-VIS-Spektrometer Nanodrop	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
UV-VIS Spektrophotometer G1103A	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Vertikale Gelelektrophoresekammer	BioRad, Hercules, CA, USA
Vortexer Labdancer	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Waage Adventurer	OHAUS, Pine Brook, NJ, USA
Waage PG 5002-S Delta Range	Mettler Toledo GmbH, Giessen, DE
Wasserbad SW23	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach, DE
Wasserspritzpumpe	Eigenbau

4.3 Bakterienstämme

Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme (*E. coli*)

Bezeichnung	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen, Karlsruhe, DE
<i>E. coli</i> BL21 DE3	Novagen, Merck KGAA, Darmstadt, DE
<i>E. coli</i> BL21 DE3 RIL	Novagen, Merck KGAA, Darmstadt, DE
<i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS	Novagen, Merck KGAA, Darmstadt, DE
<i>E. coli</i> Rosetta DE3	Novagen, Merck KGAA, Darmstadt, DE

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Zellkultur

Tab. 4: Verwendete Medien und Antibiotika in der Zellkultur

Medien/Antibiotika	Zusammensetzung
LB-Medium	25 g/l LB Luria/Miller in Wasser autoklaviert
LB-Agar	25 g/l LB Luria/Miller 15 g/l Agar-Agar in Wasser autoklaviert
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml in Wasser:Ethanol (1:1)
Kanamycin-Stammlösung	50 mg/ml in Wasser
Chloramphenicol-Stammlösung	30 mg/ml in Ethanol

Medien/Antibiotika	Zusammensetzung
Antibiotika	Ampicillin 60 µg/ml Arbeitskonzentration Kanamycin 30 µg/ml Arbeitskonzentration Chloramphenicol 30 µg/ml Arbeitskonzentration
Glycerollösung steril	60% Glycerol (v/v) in Wasser

4.4.1.1 Übernachtskulturen

Für die Flüssigkulturen wurden je 20 ml steriles LB-Medium in 50 ml-Falcongefäße gefüllt, mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und 50 µl frisch aufgetaute Zellen eines Glycerolstocks oder eine Einzelkolonie dazu gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C mit 190 rpm in einem Incubator Shaker.

4.4.1.2 Glycerolstocks

Zur Herstellung von Glycerolstocks wurden die Übernachtskulturen 7 min mit 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Lagerung von Zellen über einen längeren Zeitraum wurde das Pellet in 650 µl sterilem LB-Medium und 350 µl Glycerollösung (60% v/v) resuspendiert. Davon wurden 200 µl-Aliquote in sterile Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert und bei -80°C gelagert.

4.4.2 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Für die Herstellung der kompetenten Bakterienzellen wurden die Übernachtskulturen 7 min mit 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet einer Übernachtskultur wurde auf Eis in 1 ml steriler 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert, mit 100 mM eisgekühlter CaCl₂-Lösung auf 15 ml aufgefüllt und zwei Tage bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde 7 min bei 4°C mit 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Zellpellet wurde in 650 µl 100 mM CaCl₂-Lösung und 350 µl 60%iger Glycerollösung ohne Bildung von Luftblasen resuspendiert. Die 200 µl-Aliquote wurden in sterile Eppendorfreaktionsgefäße gegeben und bei -80°C gelagert.

Um Einzelkolonien auf festem Nährmedium zu gewinnen, wurde das entsprechende Antibiotikum in die flüssige LB-Agarlösung pipettiert. Die LB-Agarlösung wurde in sterile Petrischalen gegossen. Nach Erkalten wurden auf dem festen Nährmedium je 200 µl einer Zellkultur ausplattiert und bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Zur Transformation von Vektoren in die Amplifikations- bzw. Expressionsstämme wurden 10 µl der Plasmidlösung zu 200 µl kompetenten Zellen gegeben und 35 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 50 s bei 42°C. Die Zellen wurden sofort für 5 min auf Eis gestellt, 800 µl LB-Medium zugegeben und für 2 h bei 37°C geschüttelt. Der Ansatz wurde 3 min mit 1200 rpm zentrifugiert, 850 µl Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in dem restlichen Überstand resuspendiert und auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Nach einer erfolgreichen Transformation wurden am nächsten Tag mindestens zwei Einzelkolonien von der Agarplatte entnommen, in je 20 ml Flüssigkultur überführt

4. Material und Methoden

und bei 37°C über Nacht auf dem Inkubatorschüttler amplifiziert. Die Übernachtskulturen wurden für weitere Versuche, z.B. Expressionsansätze oder pDNA-Isolierung verwendet.

4.5 Arbeiten mit DNA

Um eine Kontamination der DNA-Lösungen zu vermeiden, wurden alle verwendeten Materialien und das Milli Q-Wasser autoklaviert.

Tab. 5: *Verwendete cDNA (complementary DNA)*

cDNA* (complementary DNA)	im Vektor	Hersteller	Verwendung
Eotaxin-1	pReceiver	imaGenes GmbH, Berlin, DE	Amplifikation und Expression
SDF-1 α	pReceiver	imaGenes GmbH, Berlin, DE	Amplifikation und Expression
Interleukin-8 optimiert	pMA	Mr. Gene GmbH, Regensburg, DE	Amplifikation
Eotaxin-1 optimiert	pMA	Mr. Gene GmbH, Regensburg, DE	Amplifikation
SDF-1 α optimiert	pMA	Mr. Gene GmbH, Regensburg, DE	Amplifikation

*Alle eingesetzten cDNAs codieren humane Chemokine.

Tab. 6: *Verwendete Expressionsvektoren*

Expressionsvektoren	Antibiotikaresistenz	Hersteller	Verwendung
pReceiver	Ampicillin	imaGenes GmbH, Berlin, DE	Expression
pET-22b	Ampicillin	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, DE	Expression
pET-28a	Kanamycin	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, DE	Expression
pIL8tac	Ampicillin	Bayer Schering Pharma AG, Berlin, DE	Expression

Tab. 7: *Verwendete Enzyme, Puffer und Lösungen für die Arbeiten mit DNA*

Enzyme und Puffer	Hersteller
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (<i>Phu</i> -DNA Polymerase)	Finnyzyme, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA

Enzyme und Puffer	Hersteller
5× Phusion High-Fidelity Buffer	Finnzyme, New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
10 mM dNTPs	New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
<i>Taq</i> -Polymerase	New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
10× Reaktionspuffer	New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
DpnI (20 u/μl)	New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
NEBuffer 4	New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
NEBuffer 3	New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
XmnI (20 u/μl)	New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
MscI (3 u/μl)	New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
NcoI (10 u/μl)	New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
NdeI (20 u/μl)	New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
NotI (10 u/μl)	New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
ExoSAP-IT	USB Corporation, Cleveland, OH, USA
BigDye Terminator v1.1 cycle	Applied Biosystems, CA, USA
Hi-DiFormamid	Applied Biosystems, CA, USA
10× Ligase Reaktionspuffer	New England Biolabs, Inc. Ipswich, MA, USA
100× BSA	New England Biolabs, Inc. Ipswich, MA, USA
T4-DNA-Ligase (400 u/μl)	New England Biolabs, Inc. Ipswich, MA, USA
Dye Ex 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden, DE
Quick-Load 1kb DNA Ladder (50 μg/ml)	New England Biolabs, Inc. Ipswich, MA, USA
Low Molecular Weight DNA Ladder (500 μg/ml)	New England Biolabs, Inc. Ipswich, MA, USA

4.5.1 Plasmid-DNA-Isolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA (pDNA) erfolgte mittels des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab) nach den Angaben des Herstellers.

20 ml Übernachtskultur der plasmidtragenden Bakterien wurden 8 min mit 3500 rpm bei 8°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 μl Lösung I/RNase resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml-Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 250 μl Lösung II zur alkalischen Lyse wurde die Probe invertiert, durch Zugabe von 350 μl Lösung III neutralisiert und invertiert. Anschließend wurde die Probe mit 10.000× g für 10 min in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde auf die HiBind-DNA-Säule gegeben, um die pDNA an die Silicamembran zu binden. Nach einminütiger Zentrifugation bei 10.000× g wurde der Durchfluss verworfen. Es erfolgten mehrere Waschschrte mit 500 μl PW-Puffer und zweimal 750 μl DNA-Waschpuffer. Nach jedem Waschschrte wurde 1 min bei 10.000× g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Vor Zugabe des Elutionpuffers wurde die Säule 2 min bei 10.000× g trocken zentrifugiert. Dieser Schritt ist essentiell, da die Überreste des Waschpuffers die Elution stören. Die Säule wurde auf ein steriles 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt und die pDNA mit 50 μl Elutionspuffer eluiert. Nach zweiminütiger Inkubation wurde

4. Material und Methoden

die pDNA-haltige Lösung bei 5000× g für 1 min in das Gefäß überführt und die Säule verworfen.

Die Bestimmung der pDNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrometers (NanoDrop) bei 260 nm. Es wurden immer Dreifachbestimmungen durchgeführt.

4.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Tab. 8: Lösungen und Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Agarosegel 1%	0,5 g Agarose 50 ml 1× TAE-Puffer 3 µl Ethidiumbromidlösung
10× DNA-Ladepuffer	0,7 ml Glycerol 1,3 ml 50 mM EDTA 5 mg Bromphenolblau 5 mg Xylencyanol
50× TAE-Puffer	2 M Tris 50 mM EDTA in Wasser mit Essigsäure pH 8,0 eingestellt
DNA-Marker	GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas) Low Molecular Weight DNA Ladder (NEB)
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ml in Wasser

DNA-Fragmente können mittels Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Agarosekonzentrationen von 1% wurden zur Auftrennung von Plasmid-DNA (> 4000 bp) und 2% zur Auftrennung von PCR-Produkten (< 500 bp) eingesetzt. Hierzu wurde die Agarose in einfachem TAE-Puffer durch Erwärmen gelöst und nach Zugabe von 3 µl Ethidiumbromidlösung in eine horizontale Gelkammer mit Probenkamm gegossen. Nach dem Erkalten des Agarosegels wurde der Probenkamm entfernt. In die erste Geltasche wurde der entsprechende DNA-Marker pipettiert. Die Proben wurden mit Ladepuffer (1 µl/ 10 µl Probe) versetzt und in die Probenaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 30-90 min in 1x TAE-Puffer. Zur Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Gel in einer Geldokumentieranlage mit UV-Licht belichtet und fotografiert.

4.5.3 Site-directed mutagenesis-Polymerase-Kettenreaktion (sdmPCR) mit den rekombinanten Plasmiden pReceiver Eotaxin und pReceiver SDF1α

Die *site-directed mutagenesis*-PCR ist eine Methode bei der mittels speziell konstruierter komplementärer Oligonukleotide (Primer) durch Bindung an den codogenen DNA-Strang eine Mutation in einem DNA-Abschnitt eingefügt wird. Der *forward* Primer wird so gestaltet, dass die ausgetauschte Base in der Mitte der Oligonukleotidsequenz liegt. Während des PCR-Zyklus bindet der Primer an den codogenen Strang, wird mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase mit hoher Lesegenauigkeit (*Phu*-Polymerase) verlängert und dadurch ein kom-

plementärer DNA-Strang mit einer veränderten Base gebildet. Dieser Vorgang wiederholt sich in mehreren nacheinander ablaufenden Zyklen, so dass eine bestimmte Menge an veränderten DNA-Fragmenten entsteht. Die ursprüngliche DNA (Vorlage-DNA, Templat) wird mit Hilfe des Enzyms Dpn I verdaut. Das Restriktionsenzym DpnI zerschneidet nur methylierte oder hemimethylierte DNA-Stränge. Plasmide aus *E. coli* sind im Gegensatz zur neusynthetisierten, mutierten DNA immer methyliert. Die neu entstandene DNA wird dabei nicht abgebaut und kann zur Transformation in einem Bakterienstamm verwendet werden.

Tab. 9: Verwendete cDNA und Primer für die sdmPCR

Gen/cDNA	Primerbezeichnung	Primersequenz (5'→3')
Eotaxin-1	O003 Eotaxin cga→cgt Austausch	ccc ctt cag cgt cta gag agc
SDF1 α	O004 SDF1 α cga→cgt Austausch	tgc cca tgc cgt ttc ttc gaa

Als Templat für die sdmPCR wurden die gekauften rekombinanten Expressionsvektoren pReceiver Eotaxin-1 und pReceiver SDF1 α verwendet. Zu jedem Ansatz wurde ein Primer, der die ausgetauschte Base enthält dazu gegeben. Folgende Ansätze wurden in sterile 0,2 ml-PCR-Tubes auf Eis zusammen pipettiert. Für jedes Templat wurde ein Doppelansatz pipettiert.

Tab. 10: Zusammensetzung der Ansätze für die sdmPCR

Ansatz (50 μ l)	1	2
Wasser	35,0 μ l	35,0 μ l
5 \times Phusion HF Buffer	10,0 μ l	10,0 μ l
10 mM dNTPs	1,0 μ l	1,0 μ l
10 μ M Primerlösung	2,5 μ l O003	2,5 μ l O004
2 u/ μ l Phusion DNA-Polymerase	0,5 μ l	0,5 μ l
300-400 ng/ μ l Templat	1,0 μ l pReceiver Eotaxin	1,0 μ l pReceiver SDF1 α

Die sdmPCR wurde in einem Thermocycler bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt.

95°C	30 s	Initiale Denaturierung	} 35 Zyklen
95°C	10 s	Denaturierung	
53°C	30 s	Annealing	
72°C	2.30 min	Elongation	
72°C	7 min	Finale Elongation	
4°C	5 min-ÜN	Kühlung	

Die Annealingtemperatur ist von dem verwendeten Primer abhängig. Sie sollte ca. 5°C unterhalb der Schmelztemperatur T_{melt} des Primers liegen.

Nach dem Beenden der PCR wurden die Ansätze auf Eis gestellt. Um das Templat, das nicht das veränderte Codon enthält, aus dem Ansatz zu entfernen, wurde das Enzym DpnI eingesetzt.

4. Material und Methoden

Zu jedem PCR-Ansatz wurden 5,5 µl 10fach NEBuffer 4 und 1 µl DpnI-Lösung zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 20 µl von jedem Ansatz zur Transformation mit 200 µl kompetenten DH5α-Zellen eingesetzt. Insgesamt wurden 4 Kolonien pro Ansatz in einer Flüssigkultur angezogen und nach der pDNA-Isolierung mit Hilfe der Sequenzierung überprüft.

4.5.4 Klonierung

Bei der Klonierung wird ein gewünschtes DNA-Fragment (z. B. ein Gen) in einen Vektor (z. B. ein Plasmid) integriert. Damit können ein oder mehrere Gene auf fremde Organismen übertragen werden. Für die Klonierung werden verschiedene Organismen, z.B. *E.coli*, als Wirt genutzt. Da die Plasmide einen Replikationsursprung sowie ein Antibiotikaresistenzgen enthalten, werden sie bei der Zellteilung vervielfältigt und selektiert. Es entsteht eine Population von Zellen, die alle eine Kopie des Vektors mit dem gewünschten DNA-Fragment enthalten. Die Zellen können dann dieses Gen als rekombinantes Protein exprimieren.

4.5.4.1 PCR zur Gewinnung der cDNA-Fragmente (Inserts) für die Klonierungen und Kontroll-PCR

Tab. 11: Verwendete Primer für die Klonierungen und Kontroll-PCR

Primer	Primersequenzen 5'-3'
O001	taatacgactcactataggg
O002	ttcatctctgagttcggcatg
O010	gaaggagttcatggggccagcttctgtcccaacc
O014	aaactggcggccgcctatggctttggagttggagatTTTTGGTC
O012	gaaggagttcatgaagcccgtcagcctgagc
O015	aaatcggcggccgcctacatcttgaacctcttgTTTTAAAGC
O018	agttcatgaaaaaaaaatggcgtgag
O019	agttcatgggtccagcatcagttcc
O020	aaactggcggccgccttatggtttcggggtcgggc
O021	agttcatggaaggtgccgtactgcctcgttc
O022	aaactggcggccgccttaggaattctcggcacg
O023	gaattccatatggaaaacctgtatTTCCAGGGTCCAGCATCAGTTCCTAC
O024	ggaattccatatggaaaacctgtatTTCCAGTCAGCAAAAGAACTGCG
O025	ccggtccagcatcagttcctacaacg
O026	cctcagcaaaagaactgcgttgtc
O029	catgccatgggtccagcatcagttcctacaacg
O030	catgccatgggttcagcaaaagaactgcgttg
O035	catgccatgggtcaccaccaccatcaccacgag
O036	ccaaaccggtcagtctgtcttatcgc
O037	aaactggcggccgcctcatttggttcagagctttc

Alle PCR-Ansätze für die Amplifikation der cDNAs wurden als 25 µl-Ansätze wie folgt zusammen pipettiert. Die Ansätze sowie die verwendeten DNA-Lösungen, Enzyme und Puffer wurden immer auf Eis gestellt.

MilliQ-Wasser	16,25 µl
5fach <i>Phusion</i> HF Puffer	5,00 µl
10 mM dNTPs	0,50 µl
Primer <i>forward</i> (10 µM)	1,00 µl
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	1,00 µl
Templat	1,00 µl
<i>Phu</i> -DNA-Polymerase	0,25 µl

Die PCRs wurden in einem Thermocycler bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

95°C	5 min	Initiale Denaturierung	} 25 Zyklen
95°C	30 s	Denaturierung	
58°C	30 s	Annealing	
72°C	30 s	Elongation	
72°C	7 min	Finale Elongation	
4°C	5 min-ÜN	Kühlung	

Die Annealing-Temperatur wurde abhängig von den verwendeten Primern dem jeweiligen Ansatz angepasst. Die Annealing-Temperatur sollte nicht unter 55°C liegen, da es sonst zu unspezifischen Bindungen der Primer ans Templat kommen kann.

Die amplifizierte cDNA (Insert) mit den Restriktionsenzymststellen wurde nach der PCR vollständig auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Mit Hilfe der DNA-Agarosegelelektrophorese wurde einerseits überprüft, ob die PCR korrekt verlief, und andererseits wurden die DNA-Polymerase und Primer vom PCR-Produkt abgetrennt.

Für Kontroll-PCRs von Klonierungsversuchen wurden je 500 µl von den Übernachtskulturen (*DH5α* mit rekombinantem Vektor) abgenommen und 10 min bei 95°C erhitzt, um die Zellen zu lysieren und die pDNA als Templat freizusetzen. Die 25 µl-Ansätze wurden wie folgt in PCR-Reaktionsgefäßen zusammengegeben.

MilliQ-Wasser	18,9 µl
10× <i>Taq</i> Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer <i>forward</i> (10 µM)	1,0 µl
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	1,0 µl
Templat (Vektor mit cDNA)	1,0 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,1 µl

Die PCR wurde im Thermocycler bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

4. Material und Methoden

95°C	5 min	Initiale Denaturierung	} 30 Zyklen
95°C	30 s	Denaturierung	
58°C	30 s	Annealing	
72°C	30 s	Elongation	
72°C	7 min	Finale Elongation	
4°C	∞	Kühlung	

Von jedem PCR-Ansatz wurden 10 µl entnommen, auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und nach der Gelelektrophorese überprüft, ob das Insert amplifiziert wurde.

4.5.4.2 DNA-Gelextraktion

Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mittels des peqGOLD Gel Extraction Kit (Peqlab) nach den Angaben des Herstellers.

Unter UV-Belichtung wurden die DNA-Banden zügig ausgeschnitten, in sterile Eppis gegeben und gewogen. Nach der Zugabe von Binding Puffer (1 ml/ 1 g Gel) wurden die Gelstücke bei 55°C im Thermomixer aufgelöst. Der Ansatz wurde auf eine DNA-Säule aufgetragen und 1 min mit 10.000× g zentrifugiert. Dabei bindet die DNA an die Silicamembran der Säule. In den anschließenden Waschschrritten mit 300 µl Binding Puffer sowie 600 µl CG-Waschpuffer/EtOH und jeweils 1 min Zentrifugation bei 10.000× g wurden die Agarosegelreste entfernt. Nach dem Trockenzentrifugieren der Säule wurde die DNA mit 30 µl Elutionspuffer eluiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrometers.

4.5.4.3 Restriktionsverdau

Beim Restriktionsverdau wird die DNA durch Restriktionsendonukleasen geschnitten. In allen Klonierungsversuchen wurden am Anfang und am Ende des Inserts zwei verschiedene Restriktionsenzymchnittstellen, z.B. MscI bzw. NcoI und NotI angehängt. Der Vektor wurde jeweils mit den gleichen Endonukleasen, deren Erkennungssequenzen in der *Multiple-Cloning-Site* liegen, geschnitten. Anhand der Herstellerangaben wurde ein Reaktionspuffer gewählt, der bei beiden verwendeten Enzymen eine optimale Aktivität im Reaktionsansatz gewährleistete. Die eingesetzten Volumina der Expressionsvektoren und Inserts wurden nach der Bestimmung der DNA-Konzentration berechnet. Danach wurde der Anteil an Wasser berechnet, um den Ansatz auf 50 µl aufzufüllen. Die 50 µl-Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

MilliQ-Wasser	auf 50 µl ergänzen	MilliQ-Wasser	auf 50 µl ergänzen
10x NEBuffer 3	5,00 µl	10x NEBuffer 3	5,00 µl
100x BSA	0,50 µl	100x BSA	0,50 µl
Restriktionsenzym A	0,50 µl	Restriktionsenzym A	0,50 µl
Restriktionsenzym B	0,50 µl	Restriktionsenzym B	0,50 µl
Expressionsvektor	500 ng	Insert (PCR-Produkt)	200 ng

Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler bei folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

Enzymreaktion	3 h bei 37°C
Hitzeinaktivierung	20 min bei 65°C
Kühlung	4°C bis zur weiteren Verwendung

4.5.4.4 Ligationsansätze

Bei der Ligation werden zwei DNA-Fragmente miteinander verknüpft. Die zueinander kompatiblen, überhängenden Enden von Vektor und Ziel-DNA finden sich und hybridisieren miteinander. In der nachfolgenden Ligation, die durch die T4-DNA-Ligase katalysiert wird, werden das 3'-Hydroxyende und das 5'-Phosphatende durch Bildung einer Phosphodiesterbindung verbunden.

Die 20 µl-Ansätze wurden auf Eis in PCR-Reaktionsgefäße folgendermaßen zusammen pipettiert:

MilliQ-Wasser	auf 20 µl ergänzen
10× Ligase Reaktionspuffer	2,0 µl
Vektor*	50-200 ng
Insert*	7,5-50 ng
T4-DNA-Ligase	0,5 µl

*Konzentration wie bei der Gelextraktion erhalten und gemessen

Die Reaktion erfolgte über Nacht bei 16°C im Thermocycler. Je 10 µl des Ligationsansatzes wurden in kompetente DH5α-Zellen transformiert.

4.6 Sequenzierung der rekombinanten cDNAs

Bei der Sequenzierreaktion wird der codogene Strang mittels *forward* Primer amplifiziert. Zu dem Ansatz werden neben der DNA-Polymerase und dNTPs auch Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) gegeben. Werden die ddNTPs in den neusynthetisierten Strang eingebaut, ist eine Verlängerung der DNA durch die DNA-Polymerase nicht mehr möglich, da die Hydroxygruppe am 3'-C-Atom für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt. Dadurch entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Jedes der vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) ist mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Die entstehenden DNA-Fragmente werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragmentes emittieren dadurch Fluoreszenz unterschiedlicher Wellenlänge und können so von einem Detektor erkannt werden. Die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheinen, gibt die Sequenz der Basen des DNA-Strangs wieder.

Das Reagenz ExoSAP-IT enthält die hydrolytischen Enzyme, Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase, in einem speziell zusammengesetzten Puffer, um ungewünschte dNTPs und Primers aus PCR-Ansätzen zu entfernen. Die Exonuklease I entfernt die *single-stranded* DNA (Primer) und die Shrimp Alkaline Phosphatase die überschüssigen dNTPs, welche in nachfolgenden Reaktionen stören können. Durch die Inkubation bei 80°C werden die beiden Enzyme hitzedeaktiviert.

4. Material und Methoden

Von jedem positiven Kontroll-PCR-Ansatz wurden 5 µl als Templat für die Sequenzierreaktion entnommen, mit 2 µl ExoSap-IT gemischt und 15 min bei 37°C sowie 15 min bei 80°C im Thermocycler inkubiert. Nach dem Entfernen der überschüssigen dNTPs und Primer wurden 2 µl des aufgereinigten PCR-Ansatzes für die Sequenzierreaktion eingesetzt.

Die Sequenzierreaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

MilliQ-Wasser	5,5 µl
BigDye Terminator v1.1 cycle	2,0 µl
Primer <i>forward</i> (10 µM) O001	0,5 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt (Templat)	2,0 µl

Die überschüssigen dNTPs, ddNTPs, Primer und die DNA-Polymerase wurden anschließend mittels des Qiagen Dye Ex 2.0 Spin Kit nach Angaben des Herstellers entfernt.

Es wurden 4 µl des gereinigten Sequenzieransatzes mit 16 µl HiDi Formamid versetzt und in ein steriles Probengefäß für die Kapillarelektrophorese gegeben. Die Messung erfolgte an dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Die Chromatogramme wurden mit dem Programm BioEdit ausgewertet.

4.7 Proteinexpression der rekombinanten Chemokine

4.7.1 Testmaßstab

Je 20 ml antibiotikumhaltiges (60 µl/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin) LB-Medium mit 1 ml ÜNK inokuliert und bei 37°C mit 190 rpm inkubiert. Die Expression wurde mit einer Endkonzentration von 0,1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) bei einer Zelldichte von OD₆₀₀ 0,6-0,9 induziert. Die Expression erfolgte bei 30°C und 190 rpm. Es wurden je 400 µl Probe vor (0 h) und 4 h nach der Induktion der Expression und am nächsten Morgen (ÜN) entnommen. Nach der Zentrifugation bei 13.200 rpm wurden 350 µl vom Überstand entfernt, der Rückstand mit 50 µl 2× Laemmli-puffer gemischt und 10 min bei 95°C erhitzt. Diese Proben wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. SDS-PAGE) aufgetrennt.

4.7.2 Größerer Maßstab (800 ml)

Für größere Ansätze wurden 2× 400 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium mit je 5-10 ml ÜNK inokuliert und bei 37°C mit 170 rpm inkubiert, bis eine optische Zelldichte von 0,6-1,0 erreicht wurde. Vor der Induktion der Expression mit einer Endkonzentration von 0,1 mM IPTG wurden die Ansätze eine Minute auf Eis gestellt. Die Expression des rekombinanten Interleukin-8 erfolgte für 2 h, des rekombinanten Eotaxin-1 und des rekombinanten SDF-1α 4 h oder ÜN bei 30°C und 170 rpm. Zur Überprüfung der Expression mittels SDS-PAGE wurden jeweils 400 µl vor und nach der Expression entnommen. Die Expressionsansätze wurden in Zentrifugenbecher überführt und 45 min bei 8°C mit 8555× g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets wurden für die Zelllyse und Proteinreinigung weiter verwendet oder bei 4°C gelagert.

4.8 Proteinanalytik

4.8.1 Bicinchoninsäure-Test

Der Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test) ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Bei dem BCA-Test wird durch Proteine Kupfer(II) in alkalischer Lösung zu Kupfer(I) reduziert und bildet dann mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex. Die Bildung des Farbkomplexes ist temperaturabhängig. Die Absorption des Farbkomplexes wird bei 562 nm gemessen.

Die zu bestimmenden Proben (Zellysate und FPLC-Fractionen) wurden 1:10 oder 1:20 in PBS verdünnt. Der BCA-Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Es wurden je 25 µl Probe mit 200 µl Arbeitsreagenz in einer Mikrotiterplatte gemischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Standardkurve wurde mit dem jeweiligen Chemokin erstellt und diente der Berechnung der Proteinkonzentrationen in den Proben.

4.8.2 Nanodrop

Die Proteinkonzentration wurde mittels Dreifachbestimmung am Nanodrop bei 280 nm und dem eingestellten Extinktionskoeffizienten ermittelt. Für die Messung wurden je 2 µl Probe auf die Messfläche pipettiert.

4.8.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tab. 12: Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
10× SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% SDS (w/v) in Wasser
2× Laemmlipuffer	30% Glycerol (v/v) 2% SDS (w/v) 65 mM Tris pH 6,8 90 mM DTT 0,001% Bromphenolblau (w/v) in Wasser
Coomassiefärbelösung	40% Ethanol (v/v) 10% Essigsäure (v/v) 0,1% Coomassie Brilliant blue (w/v) in Wasser
Entfärbelösung	10% Ethanol (v/v) 7,5% Essigsäure (v/v) in Wasser

4. Material und Methoden

Tab. 13: Marker und Positivkontrollen für die SDS-PAGE

Marker/Protein	Hersteller
Precision Plus Protein Standard 10-250 kDa	BioRad, Hercules, CA, USA
Prestained Protein Marker, Broad Range 7-175 KDa	New UK Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA
rhEotaxin	Peprotech GmbH, Hamburg, DE
rhIL-8	Genscript, Piscataway, NJ, USA
rhSDF1 α	Peprotech GmbH, Hamburg, DE

Die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist eine analytische Methode zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld. Das Gel wird durch radikalische Polymerisation aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Letzteres dient zur Quervernetzung der linearen Polyacrylamidketten. Der pH-Wert des eingesetzten Puffers, die Konzentration von Acrylamid (%) und der Gehalt an Bisacrylamid bestimmen die Trennungseigenschaften des Gels.

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Tensid und bindet an Proteine. Etwa 1,4 g SDS bindet an 1 g Proteine, überdeckt somit deren Eigenladung und verleiht ihnen eine konstante negative Ladungsverteilung. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode, wobei kleinere Moleküle schneller vorankommen als große. Die Proteine werden also aufgrund ihrer Größe aufgetrennt und nach der Gelelektrophorese mittels Coomassiefärbung im Gel sichtbar gemacht.

Für die SDS-PAGE wurden Gele mit einem 18%igen Trenn- und 5%igen Sammelgel verwendet.

Tab. 14: Zusammensetzung der Trenngellösung und Sammelgellösung für die SDS-PAGE

Bestandteil	18% Trenngellösung	Bestandteil	5% Sammelgellösung
Wasser	1,3 ml	Wasser	1,7 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	0,5 M Tris pH 6,8	1,0 ml
10% SDS	0,1 ml	10% SDS	0,40 ml
30% Acrylamidlösung	6,0 ml	30% Acrylamidlösung	0,67 ml
APS	0,1 ml	APS	0,40 ml
TEMED	0,005 ml	TEMED	0,005 ml

Nach der Polymerisation des Gels wurde es in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und diese mit $1\times$ SDS-Laufpuffer gefüllt. Es wurden folgende Probenvolumen in die Geltaschen pipettiert. Um die gleiche Menge Zellen aufzutragen, wurden die Probenvolumen über die OD-Werte ermittelt.

Tab. 15: Eingesetzte Probenvolumina bei der SDS-PAGE

Probe	Volumen
Proteinmarker (NEB oder BioRad)	15 μ l

Probe	Volumen
Rekombinantes Chemokin (Positivkontrolle)	5-10 µl
Bakterienstamm ohne Vektor (Negativkontrolle)	10 µl
Nullprobe (0 h)	20 µl
Expressionsprobe (2 h, 4 h, 6 h, ÜN)	10 und 8 µl

Der obere und untere Teil der Gelkammer wurden mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt und die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 80 V 1 h 30 min, 100 V 1 h und 80 V 1 h bis die Lauf-front das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Das Gel wurde nach der Gelelektrophorese entweder über Nacht oder in der Mikrowelle mit der Coomassiefärbelösung gefärbt oder für den Western Blot verwendet.

4.8.4 Western Blot

Tab. 16: Verwendete Puffer für die Western Blots

Puffer	Zusammensetzung
Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 10% Methanol (v/v)
10× TBS-Puffer	1,5 M NaCl 100 mM Tris pH 7,8
TBSt	1× TBS + 0,1% Tween 20 (v/v)

Tab. 17: Verwendete Antikörper für Western Blots

Antikörperlösungen	Hersteller	Verdünnung für Immundetektion
Anti-Interleukin-8 aus Maus	Sigma-Aldrich-Fluka, St. Louis, MO, USA	1:4000
Anti-SDF1 α aus Kaninchen	Peprotech GmbH, Hamburg, DE	1:4000
Anti-Eotaxin aus Kaninchen	Peprotech GmbH, Hamburg, DE	1:2000
Anti-Maus IgG aus Schaf HRP	Amersham, Merck KGaA, Darmstadt, DE	1:4000
Anti-Kaninchen aus Ziege HRP	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA., USA	1:4000

Western Blot bezeichnet die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, um diese anschließend, z.B. durch die Reaktion mit Antikörpern nachzuweisen. Die Übertragung erfolgt durch Elektrophorese. Vor dem Western Blot werden die Proteine eines Proteingemisches mittels SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Beim Western Blot liegt ein senkrecht zum SDS-Gel gerichtetes elektrisches Feld vor. Deshalb wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Gel zur Membran (PVDF (Polyvinylidenfluorid)). Aufgrund hydro-

4. Material und Methoden

phober Wechselwirkungen binden sie an der Membranoberfläche. Das Muster der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine bleibt erhalten. Die Proteine sind danach für weitere Methoden verfügbar. Ein spezifischer Primärantikörper bindet an das nachzuweisende Protein (hier: das Chemokin). An die Fc-Region des Erstantikörpers bindet ein sekundärer Antikörper, der mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, über den die Detektion erfolgt.

Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut. Auf die Anode wurden fünf Lagen Filterpapier, die PVDF-Membran, darauf das Polyacrylamidgel, darauf nochmal fünf Lagen Filterpapier gelegt und der Kathodenteil des Blotters gesetzt. Alle Bestandteile des Blots wurden vor dem Zusammenbau in Blotpuffer equilibriert. Die PVDF-Membran wurde vor dem Einsatz 10 min in Methanol aktiviert.

Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte bei 85 mA für 1 h 05 min.

Nach dem Transfer wurde die Membran 1 h bei RT in 10% Magermilch TBSt geblockt und anschließend kurz mit TBSt gewaschen. Der Primärantikörper wurde mit der entsprechenden Verdünnung in 5% Magermilch TBSt eingesetzt. Die Membran wurde darin 1 h 30 min bei RT inkubiert und danach 3× 3 min auf dem Schüttler in TBSt gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde 1:4000 in 5% Magermilch TBSt verdünnt und darin die Membran für 35 min bei RT inkubiert. Nach 4× 3 min waschen in TBSt wurde für 3 min 2 ml ECL-Lösung zugegeben. Die Detektion erfolgte am Lumianalyzer.

4.9 Zellysemethoden

Die Zellyse ist ein Prozess, bei dem durch Schädigung der Zellwand und/oder -membran die Zelle zerstört wird.

Es werden verschiedene Lysemethoden genutzt, um an Proteine im Zellinneren zu gelangen. Hierbei werden mechanische von chemischen Methoden unterschieden. Die Benutzung von French Press, Ultraschall und Kanülen gehören zu den mechanischen und die Anwendung von Lysozym, Detergenzien und Natronlauge zu den chemischen Zellysemethoden.

Tab. 18: Puffer und Lösungen für die Zellyse

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Lysispuffer 1	20 mM Tris pH 8,0 50 mM NaCl 0,5% Tween 20 (v/v) in Wasser
Lysispuffer 2	50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 90 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5% Triton X 100 (v/v) in Wasser
Lysispuffer 3	50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 90 mM NaCl 1 mM EDTA

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
	0,5% Triton X 114 (v/v) in Wasser
Lysispuffer 4	40 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4 300 mM NaCl 20 mM Imidazol 0,5% Triton X 114
Resuspensionspuffer 1	40 mM Tris pH 8,0 50 mM NaCl in Wasser
Resuspensionspuffer 2	50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 90 mM NaCl 1 mM EDTA in Wasser
Resuspensionspuffer 3	40 mM Tris pH 7,8 300 mM NaCl 20 mM Imidazol
Puffer 1	30 mM Tris pH 8,0, 30% Saccharose in Wasser
Puffer 2	5 mM Mg ₂ SO ₄ in Wasser

4.9.1 Zellysemethode nach Koltermann et al.^[125]

Das Pellet des Expressionsansatzes wurde in Resuspensionspuffer 1 (1 ml/g Zellpellet) gelöst und mit einer Endkonzentration von 1 mM EDTA und 0,2 mg/ml Lysozym versetzt. Der Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert und danach für 1 h in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Volumen des Ansatzes mit Zugabe des Lysispuffers 1 verdoppelt und 1 h auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden mit 4754× g für 45 min abzentrifugiert und der Zellysatüberstand für die Chromatographie verwendet.

4.9.2 Optimierte Zellysemethode

Nach dem Zentrifugieren der Expressionsansätze wurde der Überstand verworfen und das Pellet in Resuspensionspuffer 2 (4 ml pro Pellet von 400 ml ZK) gelöst. Die Zellsuspension wurde mit einer Endkonzentration von 0,4 mg/ml Lysozym, 0,2 mg/ml DNaseI und einer Tablette Complete Mini Proteaseinhibitorcocktail für 2 h auf Eis inkubiert. Danach wurde das Volumen mit der entsprechenden Menge Lysispuffer 2 verdoppelt und für 3× 30 s bei 50% sonifiziert. Der Ansatz wurde für 30 min in Flüssigstickstoff eingefroren, im Wasserbad bei 30°C aufgetaut und bei 8°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde das Zellysat bei 8°C mit 4754× g 45 min zentrifugiert. Der Überstand, der das lösliche Protein enthielt, wurde für die Proteinreinigung weiter verwendet.

Für die Zellyse von Bakterien, die ein rekombinantes Chemokin mit His-tag exprimiert hatten, wurde der Resuspensionspuffer 3 statt 2 verwendet. Unlösliche Proteine wurden mit einer

Endkonzentration von 2 M Harnstoff und 3 mM reduziertem Glutathion im Resuspensionspuffer 3 in den Zellysatüberstand überführt.

4.9.3 Osmotischer Schock zur Gewinnung der periplasmatischen Fraktion

Das Pellet des Expressionsansatzes (40 ml) wurde in 15 ml Puffer 1 (30 mM Tris pH 8,0, 30% Saccharose) resuspendiert und mit einer Endkonzentration von 1 mM EDTA für 20 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation mit 8555× g für 20 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 15 ml Puffer 2 (5 mM Mg₂SO₄) resuspendiert, 20 min bei 4°C inkubiert und nochmals 15 min mit 6000× g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die periplasmatische Fraktion und wurde mit der SDS-PAGE überprüft.

Eine weitere Variante des Osmotischen Schocks wurde wie von Chen et al.^[156] beschrieben durchgeführt. Dazu wurde das Pellet eines Expressionsansatzes (250 ml) in 20 ml 5 mM CaCl₂ resuspendiert und 15 min auf Eis geschüttelt. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren mit 8555× g für 10 min verworfen. Mit 20 ml Puffer 1 und 5 mM EDTA wurde das Pellet nochmals resuspendiert und 15 min auf Eis geschüttelt. Der Ansatz wurde bei 4500× g 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 20 ml destilliertem Wasser aufgenommen und wieder 15 min auf Eis geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand, also die periplasmatische Fraktion, mit SDS-PAGE analysiert.

4.10 Proteinreinigung mittels Chromatographie

Tab. 19: Für die Chromatographie verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Puffer A1	20 mM Tris pH 8,0
Puffer A2	50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 90 mM NaCl in Wasser
Puffer A3	40 mM Tris pH 7,8 300 mM NaCl 15 mM Imidazol in Wasser
Puffer B1	20 mM Tris pH 8,0 2 M NaCl in Wasser
Puffer B2	50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 2 M NaCl in Wasser
Puffer B3	40 mM Tris pH 7,8 300 mM NaCl 800 mM Imidazol in Wasser

Tab. 20: Für die Chromatographie eingesetzte Säulen

Säule	Hersteller
HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade-Säule	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
HiTrap Desalting-Säule	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
HiTrap Heparin-Säule	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
HiTrap SP FF-Säule	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
HisTrap-Säule	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK

Die Chromatographie ist ein Verfahren zur Auftrennung von Stoffgemischen in ihre Einzelbestandteile. Das Substanzgemisch, z.B. ein Proteingemisch wird dabei mittels einer mobilen Phase (wässrige oder organische Lösung) auf eine stationäre Phase (Säulenmaterial) befördert und abhängig von ihren chemischen Eigenschaften an dem Material gebunden oder es fließt hindurch. Dadurch werden Proteine mit der gewünschten Eigenschaft von denen ohne getrennt. Nach den physikalischen Eigenschaften, die zur Trennung genutzt werden, z.B. Ladung, Hydrophobizität und Affinität von Proteinen werden die Chromatographiemethoden benannt.

In diesem Projekt wurden alle Protein-Chromatographiemethoden mit der ÄKTA Purifier von GE Healthcare durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte bei 280 nm und gleichzeitig wurden der Druck sowie die Leitfähigkeit gemessen. Das Gerät wurde über die Software UNICORN 5.0 bedient.

4.10.1 Affinitätschromatographie mit Heparin

Die Heparinsäule (1 ml) wurde mit zehn Säulenvolumen (CV) 2,5% Puffer B1 äquilibriert. Der Zelllysatüberstand (7-10 ml) wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Nach dem Auswaschen der ungebundenen Proteine mit 6 CV wurde das rekombiante IL-8 mit einem linearen Salzgradienten von 2,5-100% B1 über 12 CV eluiert. Die Fraktionen wurden in 15 ml Falcons gesammelt und bei 8°C gelagert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden davon Proben für die SDS-PAGE entnommen.

4.10.2 Kationenaustauschchromatographie

Eine HiTrap SP FF-Säule (1 ml) wurde mit zehn Säulenvolumen mit Puffer A2 äquilibriert. Mit einer Flussrate von 0,5 ml/min wurde der Zelllysatüberstand (8 ml) mittels Superloop aufgetragen. Die ungebundenen Proteine wurden mit mindestens 5 CV Puffer A2 ausgewaschen. Das rekombinante IL-8 wurde mit einem linearen Salzgradienten von 0-50% von Puffer B2 über 12 CV eluiert. Die Elution erfolgte zwischen 200-300 mM NaCl. Die gesammelten Fraktionen wurden bei 8°C gelagert und nach der Proteinkonzentrationsbestimmung mit der SDS-PAGE überprüft.

4.10.3 Affinitätschromatographie mit Nickel-Sepharose

Mit zehn Säulenvolumen Puffer A3 wurde eine HisTrap-Säule (5 ml) mit einer Flussrate von 0,8 ml/min äquilibriert. Der gefilterte Zelllysatüberstand (20 ml) wurde mit einem Superloop aufgetragen und die ungebundenen Proteine mit 20 CV Puffer A3 ausgewaschen. Das rekombinante His-getagte IL-8 wurde mit einem linearen Imidazolgradienten von 0-100% von Puf-

fer B3 über 10 CV eluiert. Mit Hilfe der HiTrap Desalting-Säule wurden die Fraktionen entsalzt und das Imidazol entfernt.

4.10.4 Kombinierte Chromatographiemethoden zur Reinigung rekombinanter Chemokine ohne His-tag

Auf eine HiTrap SP FF-Säule wurde nach der Äquilibration mit Puffer A2 der Zellysätüberstand (ca. 20 ml) mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Nach dem Waschschrift mit 6 Säulenvolumen (CV) Puffer A2 erfolgte die Elution mit einem linearen Gradienten von 0-30% von Puffer B2. Das rekombinante Interleukin-8 wurde zwischen 13 und 18% Puffer B2 (ca.330-430 mM NaCl) eluiert. Die Fraktionen, die das IL-8 enthielten, wurden gepoolt, 1:2 mit Puffer A2 verdünnt und für den. nächsten Chromatographieschritt eingesetzt.

Für die Heparin-Affinitätschromatographie wurde das gleiche Puffersystem verwendet wie für die Kationenaustauschchromatographie. IL-8 wurde bei X mM NaCl mit Puffer B2 eluiert, also wurde die Heparinsäule mit 10 CV X mM/2 NaCl (ca. 180 mM NaCl) äquilibriert. Die Interleukin-8 enthaltende Fraktion wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Heparinsäule geladen. Nach dem Auswaschen der ungebundenen Proteine wurde das IL-8 mit einem linearen Salzgradienten von Y % (X mM/2)-60% B2 eluiert. Die Elution erfolgte zwischen 20-40% B2 (472-854 mM NaCl). Die Fraktionen mit dem rekombinanten Chemokin wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag für den dritten Reinigungsschritt verwendet.

Für den abschließenden Reinigungsschritt (Gelfiltration) wurde eine HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade-Säule mit 1 CV 3% von Puffer B2 mit 1 ml/min äquilibriert. Die 3% (147 mM NaCl) entsprechen näherungsweise der Salzkonzentration in PBS-Puffer. Die gepoolten Fraktionen von der Affinitätsäule wurden mit einer Flussrate von 0,8 ml/min injiziert. Die Elution des rekombinanten Interleukin-8 wurde mit 1,2 CV mit 3% Puffer B2 durchgeführt. Die Fraktion, die das aufgereinigte IL-8 enthielt, wurde bei 8°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde danach mit dem Nanodrop bestimmt.

4.10.5 Kombinierte Chromatographiemethoden zur Reinigung rekombinanter Chemokine mit His-tag

Nach der Äquilibration der HisTrap 5 ml-Säule mit Puffer A3 wurde die Probe mit einer Flussrate von 0,5 ml/min injiziert. Das Auswaschen ungebundener Proteine erfolgte über 20 CV mit Puffer A3. Die Elution des His-getagten Chemokines wurde mit einem Imidazolgradienten von 15-800 mM Imidazol über 11 CV mit Puffer B3 durchgeführt. Alle Fraktionen wurden aufgesammelt und mit der MALDI-MS überprüft. Die Fraktionen, die das Interleukin-8 mit His-tag enthielten, wurden gepoolt, über Nacht lyophilisiert, in 500-1000 µl Wasser gelöst und über eine HiTrap Desalting-Säule entsalzt sowie das Imidazol entfernt. Die entsalzten Proben wurden mit einer Endkonzentration von 3 mM GSH, 0,3 mM GSSG und 40 u/ml TEV-Protease (Invitrogen, Karlsruhe, DE) versetzt.

Die Abtrennung des His-tags erfolgte über Nacht bei 25°C. Der TEV-Proteaseansatz wurde danach auf eine Superdex75 prep grade-Säule nach der Äquilibration mit 140 mM NaCl in 40 mM Trispuffer bei pH 8,0 aufgetragen. Mit der gleichen Pufferzusammensetzung wurden die Proteine bei einer Flussrate von 0,8 ml/min von der Säule eluiert und aufgesammelt. Die Fraktionen wurden mittels Massenspektrometrie analysiert und die Proteinkonzentration ermittelt.

Zelllysatsüberstände, die 2 M Harnstoff und 3 mM reduziertes Glutathion enthielten, wurden mit einer Flussrate von 0,5 ml/min im Puffer A3, der ebenfalls 2 M Harnstoff und 3 mM GSH enthielt auf die Säule gegeben. Die Rückfaltung des Proteins erfolgte mit einem abfallenden Harnstoffgradienten (2-0 M) und gleichzeitiger Zugabe von 0,3 mM oxidiertem Glutathion über 240 CV. Die Elution des rückgefalteten Proteins wurde ebenfalls mit einem Imidazolgradienten von 15-800 mM Imidazol über 11 CV mit Puffer B3 durchgeführt. Die Fraktionen wurden gesammelt und am MALDI-MS analysiert, bevor sie für den TEV-Proteaseansatz lyophilisiert und entsalzt worden sind.

4.11 Matrixunterstützende-Laserdesorption/Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Tab. 21: Verwendete Lösungen für MALDI-MS

Lösung	Zusammensetzung
0,1% TFA	1 µl TFA zu 999 µl Wasser
Matrixlösung	10 mg/ml α -Cyano-4-hydroxymizinsäure in 0,1% TFA in Wasser mit Acetonitril (1:1)

Die Matrix-unterstützende Laserdesorption/Ionisation-Flugzeit-Massenspektrometrie ist eine Methode zur Analyse von Peptid- und Proteinmassen. Hierzu wird der Analyt mit einer Matrix, z.B. α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure gemischt und zum kokristallisieren auf eine metallische Platte aufgetragen. Durch den Laserbeschuss mit Wellenlängen bei 337-355 nm verdampft die Matrix explosionsartig und gleichzeitig wird der Analyt ionisiert. Die meist positiv geladenen Ionen werden in einem elektrischen Feld (10-30 kV) beschleunigt. Die Flugzeit der Ionen im TOF-Analysator ist abhängig von der Masse und den Ladungen. Der Ionendetektor wandelt die ankommenden Ionen in ein elektrisches Signal um. Diese Messung erlaubt die Analyse eines großen Massenbereichs (500 Da bis 500.000 Da) und ist daher zur qualitativen Bestimmung von Proteinlösungen gut geeignet.

Alle relevanten FPLC-Fractionen wurden mit der Matrixunterstützten-Laserdesorption/Ionisierung-Flugzeit-Massenspektrometrie überprüft. Hierzu wurden 5 mg α -Cyano-4-hydroxymizinsäure in 0,5 ml 0,1%TFA in H₂O:ACN (Matrixlösung) gegeben und durch Vortexen gelöst. Die FPLC-Fractionen sowie die Kontrolle wurden 1:10 mit der Matrixlösung verdünnt und davon jeweils 0,5 µl pro Spot auf die MALDI-Target-Platte gegeben. Als Kontrolle wurde das kommerziell erworbene Chemokin verwendet. Die Messungen erfolgten am 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (AB/MDS SCIEX). Die Messungen wurden mit dem linear-positiv-Modus, mit Laserintensitäten zwischen 2500 und 4500 und einer Binsize von mindestens 4 ns durchgeführt.

4.12 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine Methode zur Bestimmung der Struktur optisch aktiver Moleküle, z.B. Proteine. Abhängig von der Struktur wird das circular polarisierte Licht unterschiedlich stark absorbiert. Die Differenz wird bei verschiedenen Wellenlängen (Spektrum) gemessen und daraus ein CD-Spektrum erstellt. Daraus kann dann die Sekundärstruktur des Proteins ermittelt werden.

Vor der Analyse wurde der Puffer der IL-8 enthaltenden FPLC-Fraktion mittels Dialyse in 100 mM NaF ausgetauscht, da Chlorid- und Phosphationen bei der Messung gestört hätten. Als Referenz wurde 100 mM NaF eingesetzt. Die Probe wurde 1:5 in 100 mM NaF verdünnt. Die Referenz und die Probe wurden jeweils 3× bei 190-250 nm gemessen. Die Sekundärstrukturauswertung des CD-Spektrums von IL-8 erfolgte mit dem Algorithmus CDSSTR.

4.13 Limulus-Amöbocyten-Lysat-Test (LAL-Test)

Dieser Test beruht auf die Koagulation von Endotoxinen mit lysierten Amöbozyten aus dem Blut des Pfeilschwanzkrebse (*limulus polyphemus*). Die Endotoxinkonzentration wird in EU/ml angegeben. 1 EU entspricht 120 pg Endotoxine von *E. coli*.

Der Nachweis der Endotoxine wurde mit dem ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit von Genscript nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Standardkurve wurde mit einer Stocklösung von 10 EU/ml Endotoxin von *E. coli* und endotoxinfreiem Wasser als Konzentrationsreihe von 0,0-1,0 EU/ml hergestellt. Die Proben der Standardkurve wurden genauso behandelt wie die zu analysierenden Proben. Die Standardkurve wurde zur Berechnung der Endotoxinkonzentration verwendet.

Die Chemokin enthaltenden FPLC-Fractionen wurden mit endotoxinfreiem Wasser 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:5000 verdünnt. Das rhIL-8 von Genscript wurde 1:100 verdünnt. Zu 100 µl verdünnte Probe wurden 100 µl 2 mM LAL-Substrat gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl Chromogenic-Substrat wurde der Ansatz für 6 min bei 37°C inkubiert, 500 µl Stopplösung dazu pipettiert und gut gemischt. Zu dem Ansatz wurden jeweils 500 µl Colour stabilizer II und III gegeben und bei 545 nm am Photometer gemessen.

5 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Expressionssystems zur Herstellung rekombinanter Chemokine in *E. coli* sowie deren Reinigung mittels Chromatographiemethoden für Bindungsstudien und Aktivitätsassays.

Die Auswahl der humanen Chemokine Eotaxin-1, Interleukin-8 und SDF1 α , die exprimiert werden sollten, beruhte einerseits auf deren Rolle im menschlichen Organismus insbesondere bei Autoimmunerkrankungen, Allergien und Entzündungsprozessen und andererseits auf deren Zugehörigkeit zu verschiedenen Chemokinunterfamilien. Um humane Proteine in Bakterien herstellen zu können, wurden rekombinante Expressionsvektoren mit der cDNA für die jeweiligen Chemokine in *E. coli* transformiert und getestet. Anfangs wurden gekaufte rekombinante Vektoren mit dem vollständigen *open reading frame* (ORF) ausprobiert. Später wurden verschiedenen Varianten der cDNAs, die die Chemokine codieren in verschiedene Expressionsvektoren (pReceiver, pET22b und pET28a) kloniert und danach in Expressionsstämme transformiert. Ein wichtiger Aspekt für die Verwendung in Bindungsstudien und endotoxinfreien Aktivitätstests war die Herstellung tagfreier Chemokine, da der korrekte N-Terminus für die Rezeptorbindung benötigt wird.

Als Wirtsorganismus wurde das Bakterium *Escherichia coli* gewählt, da es einfach zu kultivieren ist und unter optimalen Bedingungen eine hohe Expressionsrate erzielt. Es wurden die vier Expressionsstämme BL21 DE3, BL21 DE3 pLysS, BL21 DE3 RIL und Rosetta DE3 für die Expressionstests ausgewählt. Aufgrund ihrer Fähigkeit die T7-RNA-Polymerase zu exprimieren, gehören diese Bakterienstämme zum Standardrepertoire bei der Verwendung des pET-Systems. pLysS-Stämme enthalten ein Gen für das T7-Lysozym, das die T7-RNA-Polymeraseaktivität abschwächt und somit eine Expression ohne Induktion inhibiert.^[157] RIL-Stämme enthalten Gene, die zusätzliche tRNAs für die von *E. coli* selten genutzten Codons für Arginin, Isoleucin und Leucin kodieren. Für eine Expressionsanalyse wurden vom rekombinanten Expressionsstamm eine Übernachtskultur (ÜNK) und damit ein Testexpressionsansatz inokuliert. Es wurden bei den ersten Ansätzen unterschiedliche IPTG-Konzentrationen und verschiedene Temperaturen getestet. Vor der Expression wurde eine Probe (0 h) und während der Expression wurden eine Probe nach 4 h und eine am nächsten Morgen (ÜN) entnommen. Als Negativkontrolle (nK) wurde ein Ansatz mit dem Expressionsstamm ohne den rekombinanten Vektor verwendet. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Wenn nach der Coomassiefärbung keine Banden im SDS-Gel detektiert worden waren, wurden die Proben im Western Blot überprüft. Gekaufte rekombinante Chemokine wurden für die Analysen als Positivkontrolle (pK) verwendet.

5.1 Aufbau eines Expressionssystems

5.1.1 Verwendung der Wildtyp-cDNA von SDF1 α und Eotaxin-1

Die ersten Versuche zur Expression rekombinanter Chemokine in *E. coli* wurden mit den gekauften rekombinanten Expressionsvektoren pReceiverSDF1 α und pReceiverEotaxin-1 (imaGenes GmbH) durchgeführt. In diesen Expressionsvektoren waren die unveränderten cDNAs, die die komplette *open reading frame* des jeweiligen Chemokins mit Signalpeptid codierten, integriert (Abb. 7).

5. Ergebnisse

Mit den in Abb. 7 gezeigten Wildtyp-cDNAs im Vektor pReceiver wurde keine Expression von SDF1 α und Eotaxin-1 in *E.coli* beobachtet.

A, ORF cDNA von SDF1 α im Expressionsvektor pReceiver, 270 bp, CXCL12 NM_199168.3 GI:291045298, atg Startcodon, bp 1-63 Signalpeptidsequenz, bp 64-267 Sequenz des nativen SDF1 α	
1	atg aac gcc aag gtc gtg gtc gtg ctg gtc ctc gtg ctg acc gcg ctc tgc
52	ctc agc gac ggg aag ccc gtc agc ctg agc tac aga tgc cca tgc cga ttc
103	ttc gaa agc cat gtt gcc aga gcc aac gtc aag cat ctc aaa att ctc aac
154	act cca aac tgt gcc ctt cag att gta gcc cgg ctg aag aac aac aac aga
205	caa gtg tgc att gac ccg aag cta aag tgg att cag gag tac ctg gag aaa
256	gct tta aac aag taa
B, ORF cDNA von Eotaxin-1 im Expressionsvektor pReceiver, 291 bp, CCL11, NM_002986.2 GI:22538399, atg Startcodon, bp 1-69 Signalpeptidsequenz, bp 70-288 Sequenz des nativen Eotaxin-1	
1	atg aag gtc tcc gca gca ctt ctg tgg ctg ctg ctc ata gca gct gcc ttc
52	agc ccc cag ggg ctc gct ggg cca gct tct gtc cca acc acc tgc tgc ttt
103	aac ctg gcc aat agg aag ata ccc ctt cag cga cta gag agc tac agg aga
154	atc acc agt ggc aaa tgt ccc cag aaa gct gtg atc ttc aag acc aaa ctg
205	gcc aag gat atc tgt gcc gac ccc aag aag aag tgg gtg cag gat tcc atg
256	aag tat ctg gac caa aaa tct cca act cca aag cca taa

Abb. 7: vollständige Wildtyp-cDNA-Sequenzen von SDF1 α und Eotaxin-1 im Expressionsvektor pReceiver, A, cDNA von SDF1 α , B, cDNA von Eotaxin-1; braun: Codons für das Signalpeptid, schwarz: Codons für das mature Protein, grün hinterlegt: Startcodon, rot: Stopcodon

5.1.2 site directed mutagenesis PCR (sdmPCR) zur Änderung eines Codons in der Wildtyp-cDNA der Gene SDF1 α und Eotaxin-1 im Expressionsvektor pReceiver

Abhängig von der Spezies werden einige Codons weniger genutzt als in anderen Organismen. *Escherichia coli* verwendet für die Expression bestimmte Codons, z.B. aga, agg, cga und cta seltener, so dass für diese weniger tRNAs zur Verfügung stehen als in menschlichen Zellen. Der tRNA-Mangel kann bei hoher Expressionsrate zu einem Abbruch der Translation führen, so dass kein vollständiges Protein vorliegt. Da *E. coli* mit dem rekombinanten Expressionsvektor pReceiver weder Eotaxin-1 noch SDF1 α exprimierte, wurde die sdmPCR verwendet, um in den Gensequenzen der Chemokine das Codon cga in cgt zu verändern. Aufgrund des an den Organismus (*E. coli*) angepassten Codons standen mehr tRNAs zur Verfügung, so dass die Fähigkeit zur Expression gesteigert werden sollte.

Um die Base in der cDNA auszutauschen, wurde der *forward* Primer so entworfen, dass das zu verändernde Codon in der Mitte der Sequenz stand und anstatt ein Adenin ein Thymin enthielt (Tab. 23). Die flankierenden Basen entsprachen genau der ursprünglich Sequenz und konnten daher optimal an das Templat binden. Für die sdmPCR wurde die *Phu*-DNA-Polymerase, die eine Überprüfungslesefunktion besitzt und eine deutlich geringere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase aufweist, verwendet. Damit der gesamte Vektor amplifiziert wurde, erfolgte die Elongation für 5 min. Durch Zugabe des Enzyms DpnI nach der PCR wurde das Templat (ursprüngliche Vektor mit cDNA) abgebaut. Nach der Transformation und Amplifi-

kation des rekombinanten Vektors mit der neuen cDNA-Sequenz in den *E.coli*-Stamm DH5 α wurde die Sequenz mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger überprüft.

Tab. 22: Eingesetzte cDNA und zu veränderndes Codon mittels sdmPCR

Gen/cDNA	Vektor	urprüngliches Codon	verändertes Codon	codierte Aminosäure
Eotaxin-1	pReceiver	cga	cgt	Arg, Position 22 in der Aminosäuresequenz des reifen Proteins, bp 138 in der cDNA
SDF1 α	pReceiver	cga	cgt	Arg, Position 12 in der Aminosäuresequenz des reifen Proteins, bp 99 in der cDNA

Tab. 23: Verwendete Primer für sdmPCR mit den Gesequenzen von Eotaxin-1 und SDF1 α

Gen/cDNA	Primersequenzen 5'-3'
Eotaxin-1	ccc ctt cag cgt cta gag agc
SDF1 α	tgc cca tgc cgt ttc ttc gaa

Tab. 24: Sequenzen der cDNA für Eotaxin-1 und SDF1 α nach der sdmPCR

cDNA	Ermittelte Sequenzen mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger
Eotaxin-1 Klon 1	Basen 1-498 ttccccctctancaggaggttcgaaccatgaaggtctccgcagcacttctgtggctgctgctcatag cagctgccttcagccccagggctcgtctggccagcttctgtcccaaccacctgctgctttaac ctggccaataggaagataccccttcagcgtctagagagctacaggagaatcaccagtggaatg tccccagaaagctgtgatcttcaagaccaaactggccaaggatatctgtgcccagcccaagaaga agtgggtgcaggattccatgaagtatctggacaaaaatctccaactccaaagccaatagctcgag tgcggccgcaaccagctttctgtacaaaagtgggttgccctgaacgacatcttcggcgctcaga aaatcgaatggcacgaatgaccctaggctgataaaacagaatttgccctggccggcagtagcgcg tgggtcccacctgacccccatgcctgaactcngagggtgaaa
	atg 26-28 Startcodon, cgt 157-159 Argininaustausch (cga→cgt), tag 317-319 Stopcodon
Eotaxin-1 Klon 2	Basen 1-498 ggatacaattccccctctacaggagttcgaaccatgaaggtctccgcagcacttctgtggctgctg ctcatagcagctgccttcagccccagggctcgtctggccagcttctgtcccaaccacctgctg ctttaacctggccaataggaagataccccttcagcgtctagagagctacaggagaatcaccagtg gcaaatgtccccagaaagctgtgatcttcaagaccaaactggccaaggatatctgtgcccagccc aagaagaagtgggtgcaggattccatgaagtatctggacaaaaatctccaactccaaagccaatag ctcgagtgccgcccagccagctttctgtacaaaagtgggttgccctgaacgacatcttcggcg ctcagaaaatcgaatggcacgaatgacctaggctgataaaacagaatttgccctggccggcagtag cgcggtggtcccacctgacccccatgccgaactagaagtgaaa
	atg 33-35 Startcodon, cgt 164-166 Argininaustausch (cga→cgt), tag 325-327 Stopcodon

5. Ergebnisse

cDNA	Ermittelte Sequenzen mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger
SDF1 α Klon 1	Basen 1-483 tacntttcccctctannnggagttcgaaccatgaaacgccaaggtcgtggtcgtgctggcctcgtg ctgaccgcgctctgcctcagcgcagcgggaagcccgtcagcctgagctacagatgcccatgcccgaatt cttcgaaagccatggtgcccagagccaacgtcaagcatctcaaaattctcaaacactccaaactgtg cccttcagattgtagcccggctgaagaacaacaacagacaagtgtgcattgacccgaagctaaag tggattcaggagtacctggagaaaagctttaaacaagaggttcaagatgtagctcgagtgcggccg caaccagctttcttgtacaaaagtgggtggcctgaacgacatcttcggcgctcagaaaatcgaat ggcacgaatgacctaggctgataaaacagaatttgctggcggcagtagcgcgggtggcccacct gacccatgccgaactcagaagtgaataa
	atg 30-32 Startcodon, cga 126-128 Argininaustausch (cga→cgt), tag 313-315 Stopcodon
SDF1 α Klon 2	Basen 1-490 cggatacanttcccctctancaggagttcgaaccatgaaacgccaaggtcgtggtcgtgctggcctc tcgtgctgaccgcgctctgcctcagcgcagcgggaagcccgtcagcctgagctacagatgcccatgccc cgtttcttcgaaagccatggtgccagagccaacgtcaagcatctcaaaattctcaaacactccaaa ctgtgcccttcagattgtagcccggctgaagaacaacaacagacaagtgtgcattgacccgaagc taaagtggattcaggagtacctggagaaaagctttaaacaagaggttcaagatgtagctcgagtgc ggccgcaaccagctttcttgtacaaaagtgggtggcctgaacgacatcttcggcgctcagaaaat cgaatggcacgaatgacctaggctgataaaacagaatttgctggcggcagtagcgcgggtggctcc cacctgaccccatgccgaactcagaaaagtgaataa
	atg 35-37 Startcodon, cgt 130-132 Argininaustausch (cga→cgt), tag 313-315 Stopcodon
SDF1 α Klon 3	Basen 1-489 ggataacaattcccctctagnaggagttcgaaccatgaaacgccaaggtcgtggtcgtgctggcctc tcgtgctgaccgcgctctgcctcagcgcagcgggaagcccgtcagcctgagctacagatgcccatgccc cgtttcttcgaaagccatggtgccagagccaacgtcaagcatctcaaaattctcaaacactccaaa ctgtgcccttcagattgtagcccggctgaagaacaacaacagacaagtgtgcattgacccgaagc taaagtggattcaggagtacctggagaaaagctttaaacaagaggttcaagatgtagctcgagtgc ggccgcaaccagctttcttgtacaaaagtgggtggcctgaacgacatcttcggcgctcagaaaat cgaatggcacgaatgacctaggctgataaaacagaatttgctggcggcagtagcgcgggtggctcc cacctgaccccatgccgaactcagaaaagtgaataa
	atg 35-37 Startcodon, cgt 131-133 Argininaustausch (cga→cgt), tag 318-320 Stopcodon

In Tab. 24 sind die Gensequenzen der cDNAs rekombinanter DH5 α -Klone nach der *sdm*PCR dargestellt. Bei der Gensequenz des SDF1 α Klon 1 wurde die ursprüngliche Sequenz ermittelt. Aufgrund eines möglicherweise unvollständigen Abbaus des Templats durch DpnI nach der *sdm*PCR, konnte die ursprüngliche Gensequenz bei der Transformation von *E. coli* übernommen werden. Ein erfolgreicher Basenaustausch wurde in den Gensequenzen von Eotaxin-1 Klon 1 und 2 sowie SDF1 α bei Klon 2 und 3 festgestellt. Die veränderten cDNAs von SDF1 α Klon 2 und 3 sowie Eotaxin-1 Klon 2 im Expressionsvektor pReceiver wurden im *E. coli*-Stamm BL21 DE3 RIL auf die Expressionsfähigkeit getestet.

In Abb. 8 sind zwei Western Blots mit den Proben der Expressionsansätze von BL21 DE3 RIL mit den rekombinanten Vektoren pReceiverSDF1 α und pReceiverEotaxin-1 nach dem Codonaustausch dargestellt. Bei beiden Blots wurde ein Teil nur mit Sekundärantikörper behandelt, um dessen Spezifität zu testen.

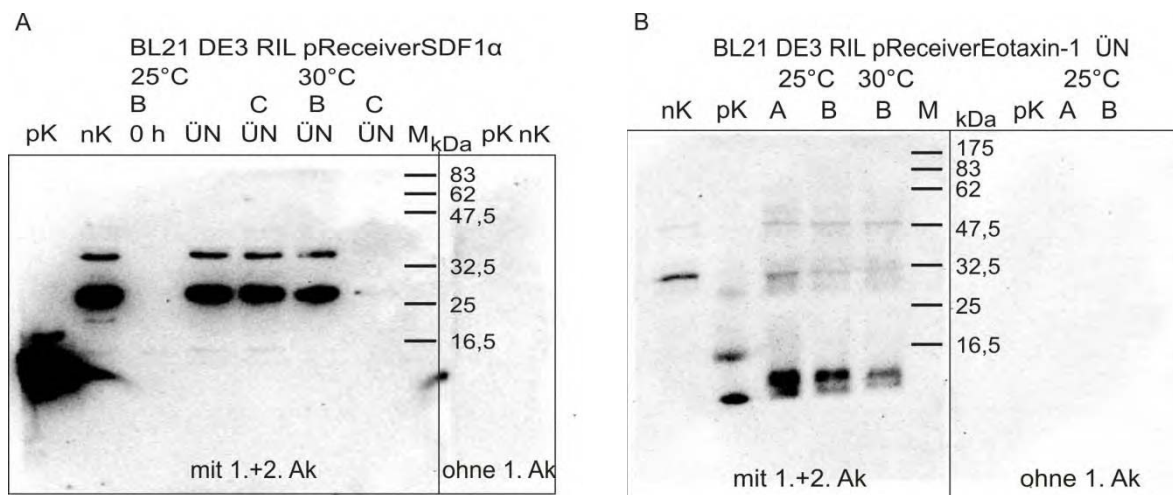


Abb. 8: Western Blots von den Proben der Expressionsanalyse von BL21 DE3 RIL mit den rekombinanten Vektoren nach Codonänderung mittels *sdmPCR*; A, pReceiverSDF1α, pK Positivkontrolle rhSDF1α; B, pReceiverEotaxin-1, pK Postivkontrolle rhEotaxin-1; M Marker, ÜN über Nacht, nK Negativkontrolle Wildtyp-Zellysate BL21 DE3 RIL ohne Vektor, A 0,1 mM, B 0,5 mM, C 1,0 mM IPTG

Auf dem Blot in Abb. 8 A, der mit dem 1. Antikörper gegen SDF1α behandelt worden war, sind in der Negativkontrolle (nK) sowie bei den Übernachtproben B und C bei 25°C und B bei 30°C zwei Banden bei 30 und 35 kDa zu sehen, was auf einer unspezifischen Bindung des Primärantikörpers beruhte. Der Sekundärantikörper zeigte keine unspezifischen Bindungen an die Positiv- und Negativkontrolle. Es wurden keine Banden auf der Höhe der Positivkontrolle bei ca. 8 kDa detektiert. Da der Primärantikörper sehr gut an das gekaufte Chemokin (pK) gebunden hatte, konnte daraus geschlossen werden, dass kein rekombinantes SDF1α exprimiert wurde. Im Western Blot in Abb. 8 B konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Sekundärantikörper nicht unspezifisch bindet. Der Primärantikörper hatte an der Negativkontrolle unspezifisch gebunden. Die detektierten Banden von den Übernachtproben lagen bei 10,8 kDa etwas höher als die der Positivkontrolle. Das exprimierte Eotaxin-1 lag als Vorläufer vor, weil die Bakterien nicht in der Lage waren, das Signalpeptid zu entfernen.

5.1.3 Klonierungen und Expressionstests

Die Verwendung von verschiedenen Vektoren sollte die Wahrscheinlichkeit für die Expression bzw. die Erhöhung der Expressionslevel ermöglichen. Um die Expression der Chemokine mit verschiedenen Expressionsvektoren testen zu können, wurden die cDNAs, die die Chemokine Eotaxin-1, SDF1α und IL-8 codieren, in verschiedene Expressionvektoren (pReceiver, pET22b und pET28a) kloniert. Mittels PCR wurde die jeweilige cDNA (Insert) amplifiziert und dabei durch die Primer, mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme versehen. Beim Design der Primer musste darauf geachtet werden, dass die verwendeten Restriktionsenzyme zusätzliche Basen an den Flanken der Erkennungssequenz benötigen, um die DNA später beim Restriktionsverdau optimal schneiden zu können. Zudem war das Einfügen eines Stopcodons im *reverse* Primer erforderlich, um die Proteinsequenz zu terminieren und nicht weitere vom Vektor codierte *tags* an den C-Terminus anzuhängen. Ob ein Startcodon in den *forward* Primer eingefügt wurde, hing vom Ziel des Klonierungsversuches ab. Wenn das

Insert hinter einer Sequenz für einen His-tag oder Signalpeptid im Vektor integriert wurde, stand das Startcodon am Anfang der tag-Sequenz im Vektor. Wurde das Insert mit His- und Proteaseschnittstellesequenz vom Amplifikationsvektor, z.B. bei pMA-SDF1 α amplifiziert, musste das Startcodon hinter der Restriktionsenzymchnittstelle im Primer eingefügt werden. Das amplifizierte Insert enthielt dem Klonierungsversuch entsprechend die Restriktionsenzymkennungsstellen an den Flanken und wurde für den Restriktionsverdau zur Vorbereitung auf die Ligation in den jeweiligen Vektor eingesetzt.

Beim Restriktionsverdau wird die DNA durch Restriktionsendonukleasen Typ II geschnitten. Diese Enzyme erkennen und schneiden spezifisch eine 6-8 bp lange palindromische DNA-Sequenz. Abhängig von der eingesetzten Endonuklease entstehen dabei glatte Enden oder Enden mit Einzelstrangüberhang an den DNA-Molekülen. Zusätzlich werden dadurch unerwünschte Enden und Phosphorylierungsmuster von der PCR entfernt. Die verwendeten Schnittstellen wurden entsprechend der *MCS (multiple cloning site)* im Vektor und der cDNA-Sequenz ausgewählt. Hierbei musste beachtet werden, dass die Erkennungssequenz nur einmal im Vektor vorlag, um einen einzelnen Schnitt im Molekül zu gewährleisten. Die cDNA durfte dementsprechend innerhalb der codierenden Sequenz keine Erkennungssequenz für die eingesetzten Restriktionsenzyme enthalten, da sonst das Gen zerschnitten würde. Für das Insert und den Expressionsvektor, die in der Klonierung zusammengefügt werden, sollten Restriktionsenzyme verwendet werden, deren Schnittstellen komplementär zueinander sind, das gleiche Phosphorylierungsmuster aufweisen und deshalb bei der Ligation wieder miteinander verknüpft werden können. In allen Klonierungsversuchen wurden am Anfang und am Ende des Inserts verschiedene Restriktionsenzymchnittstellen, z.B. MscI bzw. NcoI oder NdeI und NotI angehängt. Der Vektor wurde jeweils mit den gleichen Endonukleasen geschnitten wie das Insert.

Tab. 25: Erkennungssequenzen und Schnittstellen der Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz mit Schnittstelle
NcoI	5'...c/catgg...3' 3'...ggtac/c...5'
NdeI	5'...ca/tatg...3' 3'...gtat/ac...5'
NotI	5'...gc/ggccgc...3' 3'...cgccgg/cg...5'
MscI	5'...tgg/cca...3' 3'...acc/ggt...5'
XmnI	5'...gaann/nnttc...3' 3'...cttnn/naag...5'

Da aufgrund der verschiedenen Schnittstellen innerhalb des Vektors unterschiedliche Enden entstanden, konnte die Wahrscheinlichkeit für eine Religation ohne Insert bzw. eine Ligation des Inserts mit falscher Orientierung reduziert werden. Nach dem Restriktionsverdau wurde

mit Hilfe der T4-DNA-Ligase das Insert in den Vektor eingefügt. Um eine erfolgreiche Reaktion zu gewährleisten, wurden das Insert und der Vektor in einem molaren Verhältnis von mindestens 3:1 zusammengegeben. Versuche bei denen der Vektor nach dem Restriktionsverdau nicht über die DNA-Gelextraktion gereinigt, sondern direkt in der Ligation mit einer größeren Insertmenge eingesetzt wurde, zeigten ein besseres Ergebnis. Nach der Ligation wurden 10 µl des Ansatzes in den Amplifikationsstamm DH5α transformiert. Bei erfolgreicher Transformation konnten rekombinante Zellen durch das Antibiotikaresistenzgen des aufgenommenen Vektors auf antibiotikumhaltigem Nährmedium wachsen und wurden auf diese Weise selektiert.

Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen, wurde mit den rekombinanten Zellen eine Kontroll-PCR durchgeführt. Für die Kontroll-Ansätze wurden die Primer *forward* und Primer *reverse* aus dem jeweiligen Klonierungsansatz oder die Primer O001 pReceiver *forward* und O002 pReceiver *reverse* eingesetzt, die an Sequenzen des Vektors außerhalb der Insertsequenz binden. Für eine genaue Überprüfung der rekombinanten cDNA (Insert) wurde die Sequenzierung nach Sanger durchgeführt, um einen unerwünschten Basenaustausch, Insertionen und Deletionen auszuschließen.

In dieser Arbeit wurden mehrere Klonierungsexperimente mit verschiedenen cDNAs und Vektoren durchgeführt. Klonierungen wurden mit dem Buchstaben K abgekürzt und nummeriert, z. B. wurde Klonierungsexperiment 1 mit K1 bezeichnet.

Tab. 26: Klonierungsexperimente K1-K4

Klonierung	cDNA	Vektor	Restriktionsenzyme	Primer	Besonderheiten
K1	1 Eotaxin-1 mit Codonaustausch 2 SDF1α mit Codonaustausch	pReceiver	XmnI, NotI	O010 Eotaxin+XmnI <i>forw.</i> O014 Eotaxin+NotI <i>rev.</i> O012 SDF1α+XmnI <i>forw.</i> O015 SDF1α+NotI <i>rev.</i>	Ohne Signalpeptid
K2	1 Eotaxin-1 2 IL-8	pReceiver	XmnI, NotI	O018 K3TEV <i>forw.</i> O020 EotaxinB+NotI <i>rev.</i> O018 K3TEV <i>forw.</i> O022 IL-8+NotI <i>rev.</i>	Mit K3TEV-Proteaseschnittstelle
	1 Eotaxin-1 2 IL-8 opt.	pReceiver	XmnI, NotI	O019 EotaxinBo.K3 <i>forw.</i> O020 EotaxinB+NotI <i>rev.</i> O021 IL-8o.K3TEV <i>forw.</i> O022 IL-8+NotI <i>rev.</i>	Ohne K3TEV-Proteaseschnittstelle
K3	1 Eotaxin-1	pET22b pET28a	MscI, NotI NcoI, NotI NdeI, NotI	O023 EotaxinBTEV+NdeI <i>forw.</i> O033 EotaxinB+NcoI <i>forw.</i> O025 EotaxinBpelB+MscI <i>forw.</i> O020 EotaxinB+NotI <i>rev.</i>	pET22b: pelB-Sequenz pET28a: His-tag und TEV-Protease-

5. Ergebnisse

Klonierung	cDNA	Vektor	Restriktionsenzyme	Primer	Besonderheiten
	2 IL-8			O026 IL-8pelB+MscI forw. O024 IL-8TEV+NdeI forw. O022 IL-8+NotI rev.	schnittstelle
	3 SDF1 α	pET22b pET28a	MscI, NotI NcoI, NotI	O036 SDF1 α MscI forw. O037 SDF1 α NotI rev. O035 SDF1 α NcoI forw. O037 SDF1 α NotI rev.	
K4	Eotaxin-1 IL-8	pET28a	NcoI, NotI	O029 Eotaxin-1+NcoI forw. O020 EotaxinB+NotI rev. O030 IL-8+NcoI forw. O022 IL-8+NotI rev.	ohne His-tag

5.1.3.1 K1: cDNA mit Codonaustausch von Eotaxin-1 und SDF1 α ohne Signalpeptidsequenz in den Expressionsvektor pReceiver

Humane Chemokine werden mit einem Signalpeptid für die Sekretion exprimiert. *E. coli* ist jedoch nicht in der Lage, das Signalpeptid (Precursor) zu entfernen wie in Abb. 8 B zu sehen ist. Deshalb wurde eine Klonierung durchgeführt, bei der nur die Gensequenz für das sekretierte Protein (o.P. ohne Precursor) in den Vektor pReceiver eingefügt wurde. Dabei wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XmnI und NotI mittels PCR an das amplifizierte Insert gehängt (Abb. 9). Der Expressionsvektor pReceiver wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten (Abb. 10) und über DNA-Gelextraktion gereinigt.

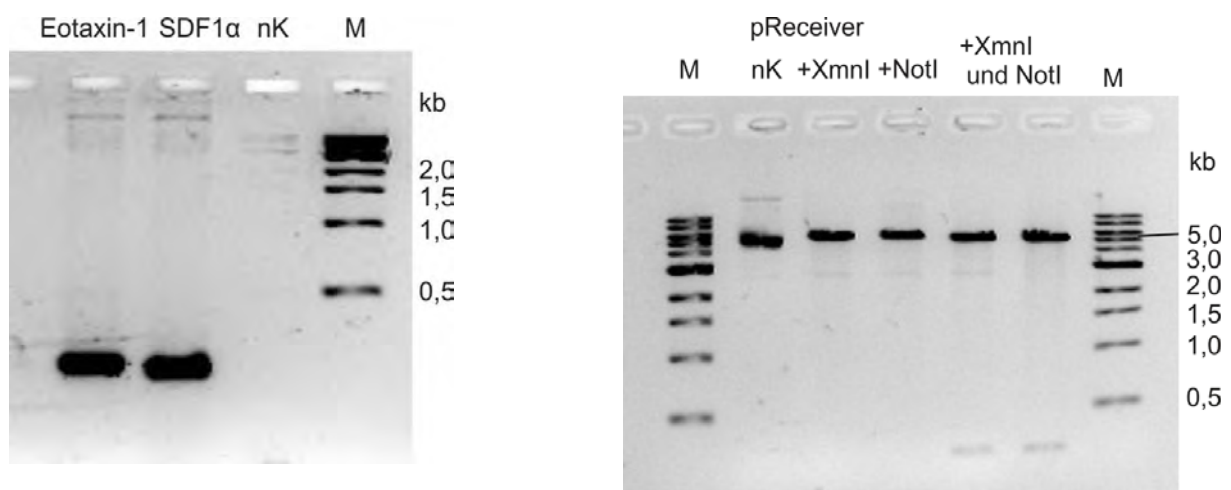


Abb. 9 (links): Amplifizierte cDNA ohne Signalpeptid für die Klonierung in pReceiver, M Marker, nK Negativkontrolle mit Wasser

Abb. 10 (rechts): Der Expressionsvektor pReceiver nach dem Restriktionsverdau mit XmnI und NotI, M Marker, nK pReceiver ohne Restriktionsenzyme

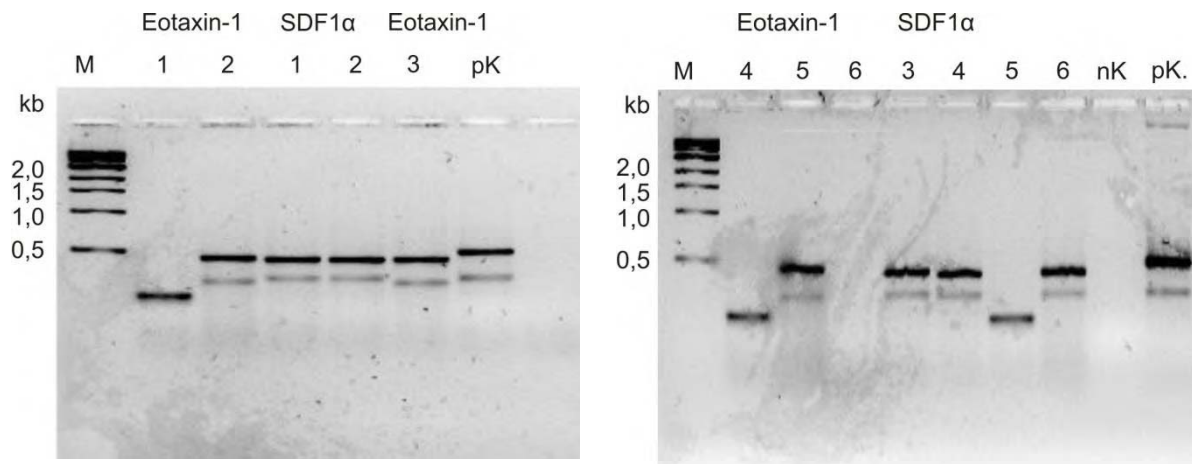


Abb. 11: Kontroll-PCR-Ansätze nach Klonierung K1 auf 2%igen Agarosegelen; M Marker, pK Positivkontrolle SDF1 α mit Signalpeptid, nK Negativkontrolle mit Wasser

Nach der Ligation wurden die Ansätze in DH5 α transformiert und amplifiziert. Anschließend wurden eine Kontroll-PCR und die Sequenzierungen durchgeführt (Abb. 11, Tab. 27). Abb. 11 zeigt das Agarosegel mit den Kontroll-PCR-Ansätzen von jeweils 6 Klonen von Eotaxin-1 und SDF1 α ohne Signalpeptid. Die Klone 2, 3 und 5 mit pReceiver Eotaxin-1 enthielten das Insert, das als Bande mit einer Größe von ca. 350 bp im Gel detektiert wurde. Alle Klone mit pReceiverSDF1 α waren positiv außer Klon 5. Negative Klone zeigten eine Bande, die der Sequenz der MCS ohne Insert entsprach und demzufolge um 225 bp bzw. 210 bp kleiner war. Die Bande der Positivkontrolle mit SDF1 α , die die Sequenz für das Signalpeptid noch enthielt, lag höher als die der Inserts.

Tab. 27: Ergebnis der Sequenzierung der cDNAs vom Klonierungsexperiment K1 (+ Sequenz korrekt, - Sequenz nicht korrekt; o.P. ohne Precursor)

Klon	Gen	Sequenz
2	Eotaxin-1 o.P.	+
3	Eotaxin-1 o.P.	+
5	Eotaxin-1 o.P.	+
1	SDF1 α o.P.	-
2	SDF1 α o.P.	+
3	SDF1 α o.P.	+
4	SDF1 α o.P.	-

Wie in Tab. 27 zusammengefasst, zeigte die Auswertung der Sequenzierungen, dass die Klonierung der Gensequenz für Eotaxin-1 ohne Signalpeptidsequenz in den Vektor pReceiver bei 3 von 6 Klonen und für SDF1 α ohne Signalpeptidsequenz bei 2 von 6 Klonen erfolgreich war. Die positiven Klone wurden amplifiziert, die pDNA isoliert und in den Expressionsstamm transformiert. Die Testexpression erfolgte bei 25°C und bei 30°C mit jeweils zwei bis drei verschiedenen IPTG-Konzentrationen (A 0,1 mM, B 0,5 mM und D 0,02 mM).

5. Ergebnisse

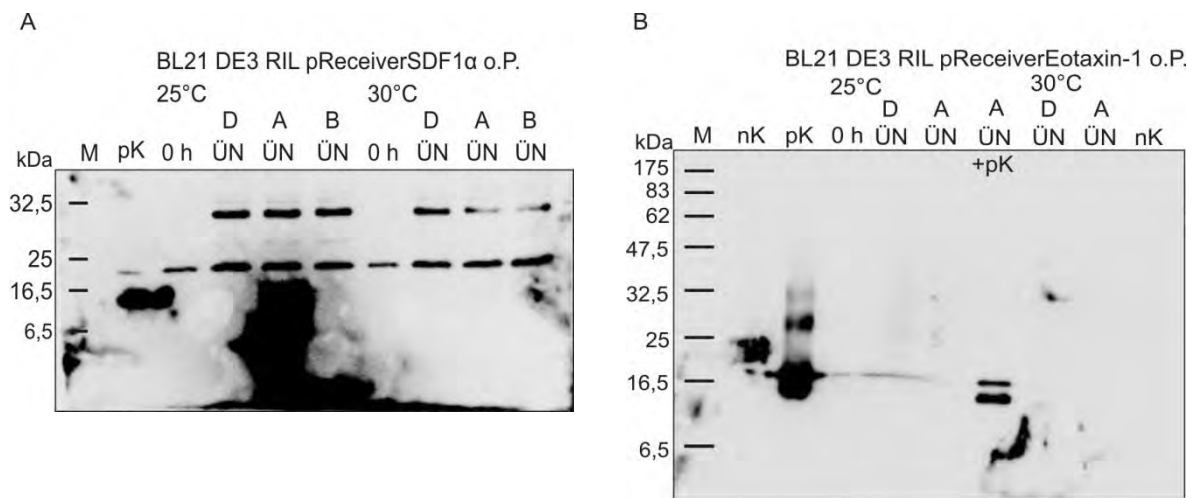


Abb. 12: Western Blots von den Proben der Expressionsanalyse von BL21 DE3 RIL mit den rekombinanten Vektoren; A, pReceiverSDF1α o.P. (o.P. ohne Signalpeptid), pK Positivkontrolle rhSDF1α; B, pReceiverEotaxin-1 o.P., pK Positivkontrolle rhEotaxin-1; M Marker, A 0,1 mM, B 0,5 mM, D 0,02 mM IPTG

Die Western Blots mit den Proben der Expressionsanalyse von BL21 DE3 RIL mit den Vektoren pReceiverSDF1α o.P. und pReceiverEotaxin-1 o.P. sind in Abb. 12 gezeigt. In Abb. 12 A sind die Proben des Expressionsversuches von SDF1α o.P. dargestellt. Es wurden keine Banden mit einer Größe von 8 kDa auf der Höhe der Positivkontrolle detektiert. Aufgrund unspezifischer Bindungen des Primärantikörpers wurden in allen Proben Banden mit ca. 25 kDa und bei den ÜN-Proben eine zweite bei 32 kDa beobachtet. D.h. es wurde kein SDF1α bei diesem Expressionstest exprimiert. Abb. 12 B zeigt den Western Blot mit den Proben der Expression von Eotaxin-1 o.P.. Die Expressionsanalyse wurde ebenfalls einmal bei 25°C und bei 30°C mit jeweils zwei verschiedenen IPTG-Konzentrationen (A 0,1 mM und D 0,02 mM) durchgeführt. Banden mit einer Größe von 8,4 kDa wurden nur in der Positivkontrolle sowie in der gemischten Probe 25°C ÜN A+pK (Probe des Expressionsansatzes mit der Positivkontrolle rhEotaxin-1 gemischt) detektiert. Daraus wurde gefolgert, dass kein Eotaxin-1 o.P. exprimiert wurde, unabhängig von Temperatur und IPTG-Konzentration. Bei einem weiteren Expressionstest mit dem Expressionsstamm BL21 DE3 pLysS wurde im Western Blot ebenfalls kein Eotaxin-1 o.P. detektiert.

5.1.3.2 K2: codonoptimierte cDNA von Eotaxin-1 und Interleukin-8 mit und ohne K3-TEV-Protease-Sequenz in den Expressionsvektor pReceiver

A, Codonoptimierte synthetische cDNA von Eotaxin-1 im Amplifikationsvektor pMA (MrGene)				
<pre> atg aaa aaa aaa tgg cgt gag aac ctg tat ttc cag ggt cca gca tca gtt cct aca acg tgt tgc ttc aat ctg gcc aac cgt aaa att cct ctg cag cgt ctg gag tct tat cgt cgt att aca agc ggc aaa tgc cct cag aaa gcc gtg atc ttc aaa acc aaa ctg gcg aaa gac atc tgt gct gat cct aaa aaa aaa tgg gtc cag gac tcg atg aaa tat ctg gat caa aaa agc ccg acc ccg aaa cca taa </pre>				
Start	K3 (3x Lysin)	TEV-Proteaseerkennungsequ.	Chemokin	Stopp

B, Codonoptimierte synthetische cDNA von Interleukin-8 im Amplifikationsvektor pMA (MrGene), 79/72 aa Variante				
<pre>atg aaa aaa aaa tgg cgt gag aac ctg tat ttc cag ggt gaa ggt gcc gta ctg cct cgt /tca gca aaa gaa ctg cgt tgt cag tgt atc aaa acc tat tcg aaa ccg ttt cat ccg aaa ttc att aaa gag ctg cgc gtc att gag tct ggt cca cat tgt gct aac acc gag atc atc gtc aaa ctg tot gat ggc cgt gag ctg tgt ctg gat cca aaa gag aac tgg gta cag cgt gtt gtc gaa aaa ttc ctg aaa cgt gcc gag aat tcc taa</pre>				
Start	K3 (3x Lysin)	TEV-Proteaseerkennungsequ.	Chemokin	Stopp
C, Codonoptimierte synthetische cDNA von SDF1 α im Amplifiaktionsvektor pMA (MrGene)				
<pre>atg cac cac cac cat cac cac gag aat ctg tat ttt cag ggc aaa ccg gtc agt ctg tct tat cgc tgt cca tgt cgc ttt ttc gag agc cac gtt gct cgt gct aat gtg aaa cat ctg aaa atc ctg aac acc ccg aat tgt gca ctg cag atc gta gcc cgt ctg aaa aac aat aac cgc cag gtg tgt atc gat ccg aaa ctg aaa tgg atc cag gaa tat ctg gag aaa gct ctg aac aaa tga</pre>				
Start	His ₆	TEV-Proteaseerkennungsequ.	Chemokin	Stopp

Abb. 13: Codonoptimierte synthetische cDNAs von Eotaxin-1, Interleukin-8 und SDF1 α im Amplifikationsvektor pMA von der Firma MrGene; A, codonoptimierte cDNA von Eotaxin-1; B, codonoptimierte cDNA für Interleukin-8; C, codonoptimierte cDNA für SDF1 α ; atg Startcodon, 3x aaa: K3 (3 \times Lysin), blau: TEV-Erkennungssequenz, rot: Stoppcodon, schwarz: Sequenz für das native Chemokin

Für weitere Klonierungsversuche wurden codonoptimierte synthetisch hergestellte cDNA-Sequenzen von Interleukin-8, Eotaxin-1 und SDF1 α verwendet. Da sowohl ein Vertreter der CC- und ein Vertreter der CXC-Chemokine exprimiert werden sollte, wurde die nächste Klonierung zunächst auf die Chemokine Eotaxin-1 und IL-8 fokussiert. Zudem ist IL-8 laut Literaturangaben eines der Chemokine, dass gut rekombinant exprimierbar ist.^[158]

Im Klonierungsexperiment K2 wurden zwei Varianten der cDNAs von Eotaxin-1 und IL-8 in den Expressionsvektor pReceiver kloniert. In einer Variante wurde die Sequenz für das sekretierte native Chemokin ohne zusätzliche Anhänge kloniert. Bei der zweiten Variante wurde eine Gensequenz für drei Lysinreste (K3) und eine Proteaseschnittstelle (TEV) vor die Sequenz für das native Chemokin eingefügt, um die Expression zu erhöhen. Die Gensequenz für K3TEV (drei Lysinreste und Tobacco-Etch-Virus-Proteaseschnittstelle) wurde während der PCR vom Vektor pMA amplifiziert und somit vor der Chemokin-cDNA gehängt. Nach der Amplifikation enthielten die Inserts die Schnittstelle für XmnI, das Startcodon, die Sequenz für den K3TEV-Anhang, die Sequenz für das Chemokin, das Stoppcodon und die Schnittstelle für NotI (Abb. 14).

5. Ergebnisse

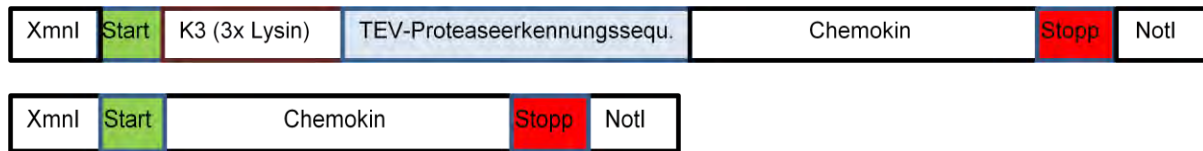


Abb. 14: Struktur der Inserts nach der PCR für die Klonierung K2

Für die zweite Variante wurden Primer entworfen, so dass am Insert nach der PCR nur die Schnittstellen für XmnI und NotI, sowie das Start- und Stopcodon angehängt waren. Der Vektor und die Inserts wurden mit den Restriktionsendonukleasen XmnI und NotI geschnitten und danach bei der Ligation miteinander verknüpft. Nach Transformation der Ligationsansätze beider Varianten in DH5 α wurden mehrere Kolonien durch Kontroll-PCR und Sequenzierung überprüft.

Abb. 15 zeigt je 4 Kontroll-PCR-Ansätze nach der Klonierung K2 im Agarosegel. Die amplifizierten Inserts hatten eine Größe von ca. 360 bp. Die Klonierung von Eotaxin-1K3TEV und Interleukin-8K3TEV war jeweils bei 3 von 4 Klonen positiv und zeigte im Agarosegel deutliche Banden. Mittels Sequenzierung wurden die cDNA-Sequenzen der positiven Klone überprüft. Auf dem Agarosegel in Abb. 15 B ist zu sehen, dass mit Eotaxin-1 ohne K3TEV 2 von 4 Klonen positiv und für Interleukin-8 ohne K3TEV 3 von 4 Klonen positiv waren. Diese Inserts waren 36 bp kürzer als die Variante mit der Lysin-TEV-schnittstelle.

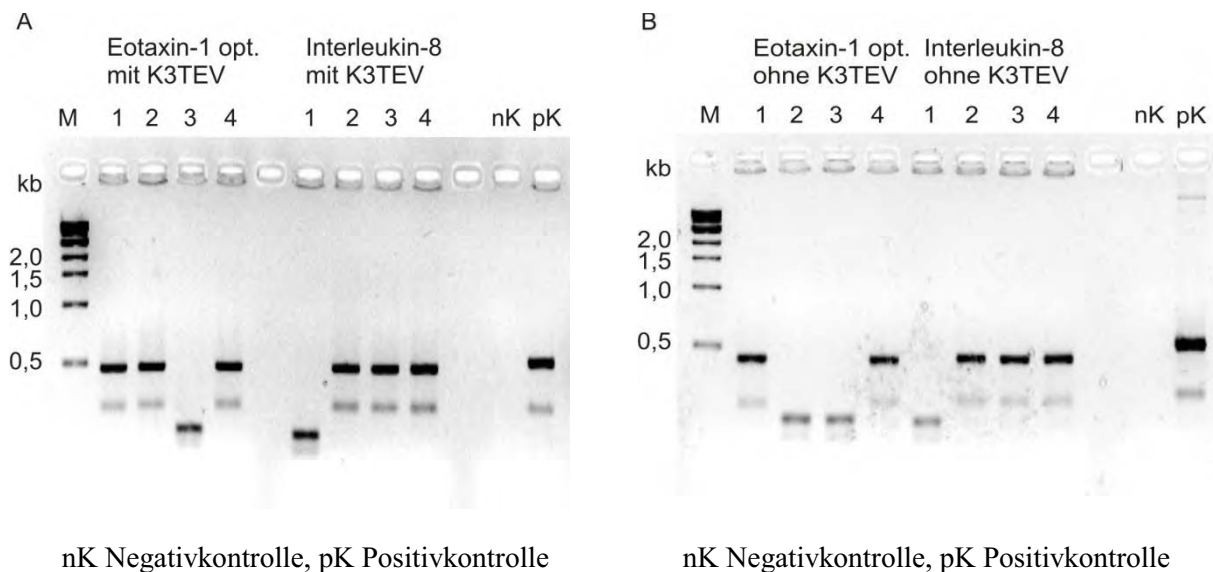


Abb. 15: Kontroll-PCR-Ansätze von Klonierung K2 auf einem 2%igem Agarosegel; A, Eotaxin-1 und IL-8 mit K3TEV-Sequenz, B, Eotaxin-1 und IL-8 ohne Anhang im Expressionsvektor pReceiver; pK Positivkontrolle pReceiverEotaxin-1 mit ursprünglicher Sequenz, nK Negativkontrolle mit Wasser, M Marker

Tab. 28: Ergebnis der Sequenzierung der cDNAs nach dem Klonierungsexperiment K2(+ Sequenz korrekt, - Sequenz nicht korrekt; K3TEV drei Lysinreste und TEV-Proteaseerkennungsequenz)

Klon	Gen	Sequenz
1,2 und 4	Eotaxin-1K3TEV	+
2-4	IL-8K3TEV	+
1	Eotaxin-1 ohne K3TEV	-
4		+
2,3 und 4	IL-8 ohne K3TEV	-

Die Auswertung der Sequenzierung dieser cDNA-Variante, die in Tab. 28 dargestellt ist, ergab eine korrekte Gensequenz für alle Klone, die die cDNA Eotaxin-1K3TEV und Interleukin-8K3TEV enthielten. Von der Variante ohne K3TEV-Anhang wurde eine korrekte Gensequenz für einen Klon mit Eotaxin-1 ermittelt. In der Gensequenz des anderen Klons fehlte eine Base an der Position 193 des sequenzierten Abschnitts. Die Klone mit den Gensequenzen für IL-8oK3TEV enthielten alle 6-7 zusätzliche Basen hinter dem Startcodon, so dass die Aminosäuresequenz am N-Terminus bei einer Expression verändert gewesen wäre.

Die positiven Klone des Klonierungsexperimentes K2 wurden amplifiziert, die pDNA isoliert und in Expressionsstämme BL21 DE3 bzw. BL21 DE3 pLysS bzw. RIL transformiert, um ebenfalls Expressionsanalysen durchzuführen.

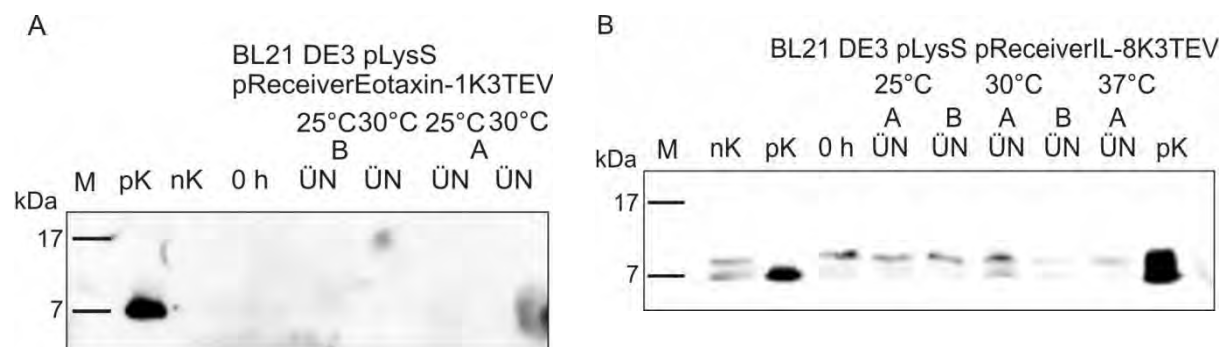


Abb. 16: Western Blots von den Proben der Expressionsanalyse von BL21 DE3 pLysS mit den rekombinanten Vektoren; A, pReceiverEotaxin-1K3TEV, pK Positivkontrolle rhEotaxin-1; B, pReceiverIL-8K3TEV, pK Positivkontrolle rhIL-8, A 0,1 mM, B 0,5 mM IPTG, ÜN über Nacht, nK Negativkontrolle Expressionsstamm ohne Vektor

Die Expression der rekombinanten Vektoren pReceiverEotaxin-1K3TEV und pReceiverIL-8K3TEV im Expressionsstamm BL21 DE3 pLysS wurde bei verschiedenen Temperaturen (25°C und 30°C) und IPTG-Konzentrationen (A 0,1 mM und B 0,5 mM) getestet. Die entnommenen Proben wurden mittels Western Blots analysiert, die in Abb. 16 dargestellt sind.

Der Western Blot in Abb. 16 A zeigt nur eine mit Anti-Eotaxin-Ak detektierte Bande in der Positivkontrolle, d.h. es wurde bei verschiedenen Temperaturen und IPTG-Konzentrationen kein rekombinantes Eotaxin-1 mit dem Anhang K3TEV exprimiert. In Abb. 16 B sind die

5. Ergebnisse

Proben des Expressionsansatzes mit IL-8K3TEV dargestellt. Außer in der Positivkontrolle wurden keine eindeutigen Banden mit einer Größe von 9,7 kDa detektiert. Die schwachen Doppelbanden, die in allen Proben bei ca. 7 und 10 kDa sichtbar waren, waren auch in der Negativkontrolle sichtbar und ließen daher auf eine unspezifische Bindung des Antikörpers schließen.

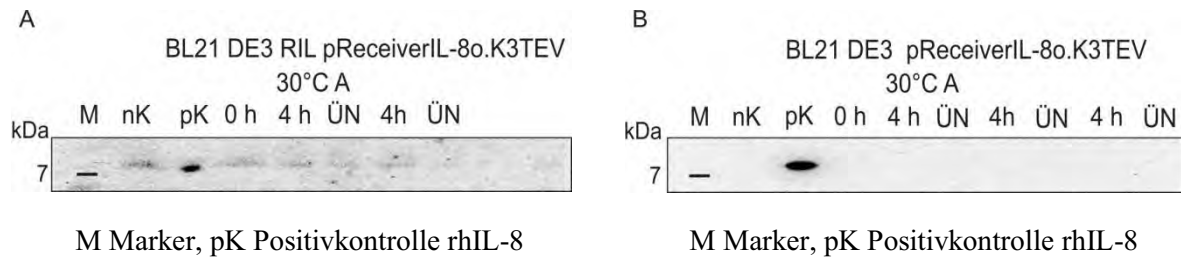


Abb. 17: Western Blots von den Proben der Expressionsanalyse mit den rekombinanten Vektor *pReceiverIL-8o.K3TEV*; A, in *BL21 DE3 RIL*; B, in *BL21 DE3*; M Marker, nK Negativkontrolle Expressionsstamm ohne Vektor, pK Positivkontrolle rhIL-8, A 0,1 mM IPTG

Das Ergebnis der Expressionsanalyse mit zwei Expressionsstämmen *BL21 DE3* und *BL21 DE3 RIL* mit dem Vektor *pReceiverIL-8o.K3TEV* bei 30°C mit 0,1 mM IPTG wurde in den beiden Western Blots in Abb. 17 dargestellt. Es wurde weder bei den beiden getesteten Klonen von *BL21 DE3 RIL* noch bei den drei Ansätzen mit *BL21 DE3* eine Bande des rekombinanten Interleukin-8 detektiert.

5.1.3.3 K3: Codonoptimierte cDNA von Eotaxin-1, Interleukin-8 und SDF1 α in die Expressionsvektoren pET22b und pET28a

Da verschiedene Varianten der Gensequenzen für humanes SDF1 α , IL-8 und Eotaxin-1 im Expressionsvektor *pReceiver* nicht exprimiert worden waren, wurden zwei weitere Expressionsvektoren getestet. Um die Expression der rekombinanten Chemokine erfolgreich zu etablieren, wurden die beiden Expressionsvektoren *pET22b* und *pET28a* eingesetzt.

Es ist bekannt, dass im Cytosol keine optimalen Bedingungen für die Ausbildung von Disulfidbrücken vorhanden sind.^[122] Der Expressionsvektor *pET22b* enthält eine zusätzliche Gensequenz für das Signalpeptid *pelB* (Abb. 18), das den Transport eines Proteins in den periplasmatischen Raum von Bakterien vermittelt. Das rekombinante Chemokin sollte dort besser gefaltet werden als im Cytosol von *E. coli* und seine native Struktur erhalten. Das N-terminale Signalpeptid wird nach dem Transport durch eine bakterielle Peptidase entfernt, so dass der korrekte N-Terminus am Protein freigesetzt wird.

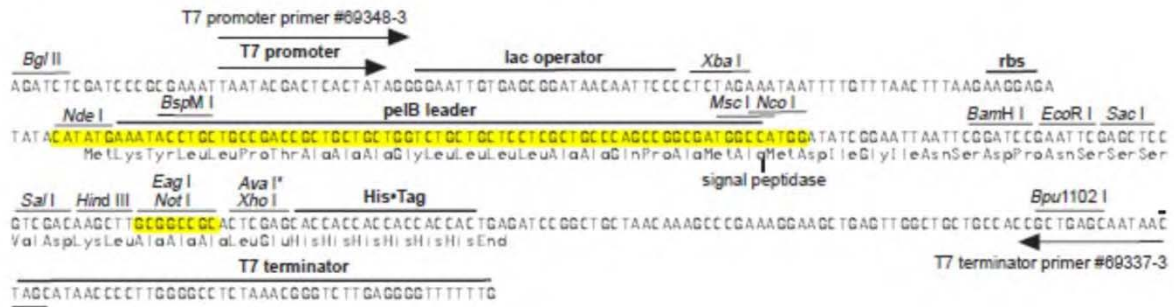


Abb. 18: Expressionsvektor pET22b, Multiple Cloning Site und exprimierbare tags; gelb: Schnittstellen für Restriktionsenzyme und Sequenz für pelB-Signalpeptid

Die codonoptimierten synthetischen cDNAs für die Chemokine Eotaxin-1, Interleukin-8 und SDF1 α wurden in pET22b integriert. Bei der Amplifikation der Inserts für den Vektor pET22b wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme MscI (glatte Enden) und NotI (klebrige Enden) sowie das Stoppcodon mit Hilfe der Primer angehängt. Aufgrund der Produktion glatter DNA-Enden durch die *Pfu*-DNA-Polymerase brauchten die Inserts für die Ligation nur mit NotI geschnitten werden. Die Inserts wurden nach dem Restriktionsverdau an der glatten Schnittstelle für MscI direkt hinter der pelB-Sequenz in den Vektor eingefügt.

Der Vektor pET28a vermittelt den Anhang eines N- sowie eines C-terminalen His₆-tags (Abb. 19). Dieser Anhang kann einerseits die Expression des rekombinanten Proteins verbessern und andererseits zur Reinigung mittels Affinitätschromatographie genutzt werden. An welcher Position der Anhang gesetzt wird, kann mit Hilfe der Primer und der Auswahl der Schnittstellen gesteuert werden. In dieser Arbeit wurde bei allen rekombinanten Chemokinen der N-terminale His-Tag verwendet. Dazwischen wurde eine TEV-Proteaseschnittstelle eingefügt, um einen korrekten N-Terminus des rekombinanten Chemokins nach dem Entfernen des tags zu erhalten. Die Erkennungssequenz der TEV-Protease lautet ENLYFQ/G oder S. Die DNA-Sequenz wurde im Vektor pET28a hinter der His-tagsequenz gesetzt. Der N-Terminus von Eotaxin-1 beginnt mit GPAS, der von der 72aa-Variante des IL-8 mit SAKEL und der von SDF1 α mit KPVSL. Da die TEV-Protease sowohl vor Glycin als auch vor Serin schneidet, wurden die Sequenzen der Protease und der Chemokine so fusioniert (ENLYFQ/GPAS bzw. ENLYFQ/SAKEL), dass später durch den Schnitt der Protease die korrekten N-Termini von Eotaxin-1 und IL-8 erzeugt werden. Bei SDF1 α (ENLYFQ/GKPVSL) bleibt ein Glycin zurück, das aufgrund der fehlenden Seitenkette wenig Einfluss auf die Struktur und Funktion haben sollte.

5. Ergebnisse

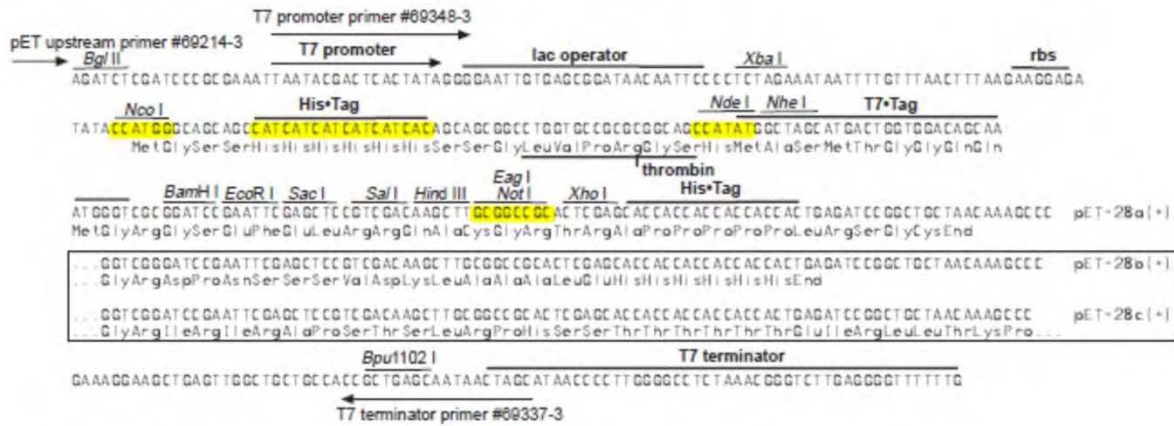


Abb. 19: Expressionsvektor pET28a, Multiple Cloning Site und exprimierbare tags, gelb: Schnittstellen für Restriktionsenzyme und His-tag-Sequenz

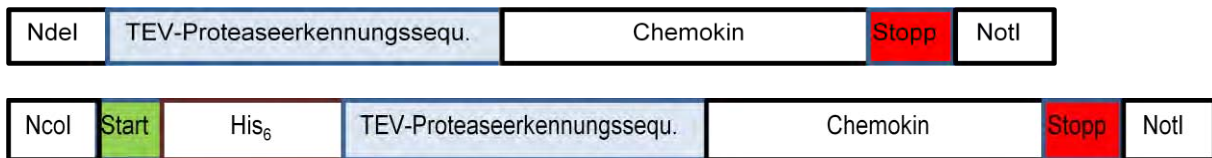


Abb. 20: Struktur der Inserts nach der PCR für Klonierung K3 in den Vektor pET28a

Während der PCR für die Klonierung in den Vektor pET28a wurden die Schnittstellen für die Endonukleasen NdeI und NotI bzw. NcoI und NotI an die Inserts gehängt. Das Startcodon lag hier für Eotaxin-1 und IL-8 auf dem Vektor pET28a vor der His₆-tag-Gensequenz. Zwischen der NdeI-Schnittstelle und der Sequenz für das humane Chemokin wurde eine TEV-Protease-Erkennungssequenz eingefügt, die später zur Entfernung des His₆-tags genutzt wurde. Die Gensequenz für die TEV-Erkennungsstelle wurde vom Amplifikationsvektor pMA bei der PCR mit amplifiziert. Für SDF1 α wurden die His₆-tag-, TEV-Erkennungssequenz und das Startcodon hinter der Schnittstelle NcoI mittels PCR an das Insert angehängt (Abb. 20). Insert und Expressionsvektor wurden mit beiden Restriktionsenzymen geschnitten und im Ligationsansatz verbunden. Von allen Ansätzen wurden nach der Transformation in DH5 α für die Kontroll-PCR und die darauffolgenden Sequenzierungen Kolonien entnommen.

Das Agarosegel der Kontroll-PCR der IL-8-Klone in Abb. 21 A zeigt, dass Klon 1 mit Vektor pET28a die cDNA enthielt. Bei zwei von drei Klonen mit Vektor pET22b wurde das Insert mit einer Größe von 219 bp detektiert. In Abb. 21 B sind die Kontroll-PCR-Ansätze von jeweils 3 Klonen mit der cDNA für Eotaxin-1 in den Vektoren pET22b und pET28a, sowie 3 Klone mit der Gensequenz für IL-8 in pET28a zu sehen. Alle Klone mit den Vektor pET28a waren positiv und zeigten die Inserts als Bande bei einer Größe von 244 bp (Eotaxin-1) und 240 bp (IL-8). Die Gensequenz für Eotaxin-1 in pET22b konnte bei keinem der drei Klone mit der Kontroll-PCR nachgewiesen werden.

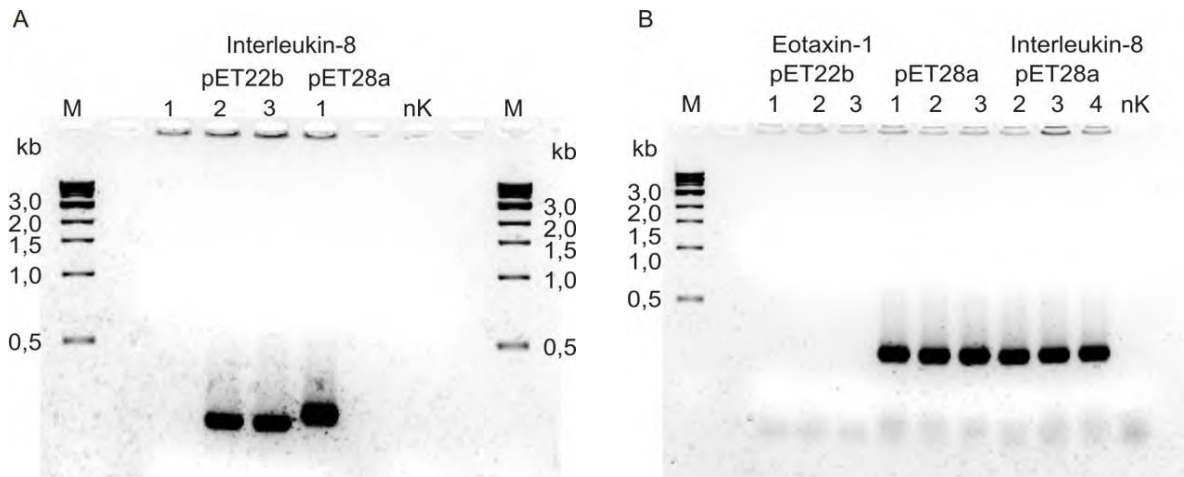


Abb. 21: Kontroll-PCR-Ansätze des Klonierungsversuches K3 auf 2%igem Agarosegel; A, IL-8 in den Expressionsvektoren pET22b und pET28a; B, Eotaxin-1 in den Expressionsvektoren pET22b und pET28a und IL-8 in pET28a; nK Negativkontrolle mit Wasser

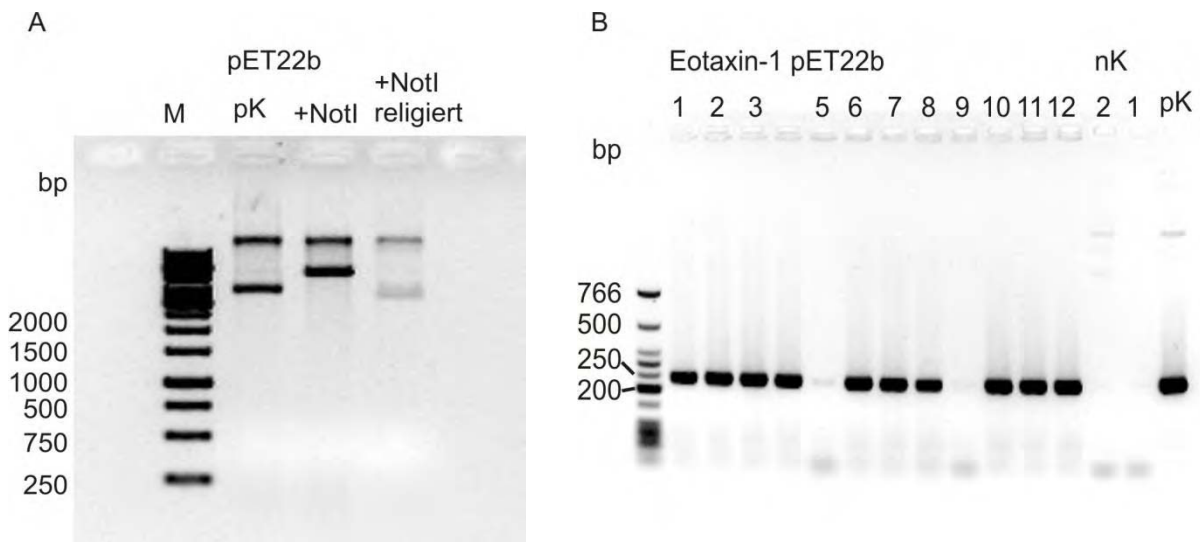


Abb. 22: A, Expressionsvektor pET22b nach dem Restriktionsverdau mit NotI und darauffolgende Religation mit T4-DNA-Ligase auf einem 1%igem Agarosegel; B, Kontroll-PCR-Ansätze der cDNA von Eotaxin-1 im Expressionsvektor pET22b auf einem 2%igem Agarosegel; M Marker, nK Negativkontrolle 1 mit Wasser und 2 mit cDNA für andres Chemokin, pK Positivkontrolle mit pMAEotaxin-1

Deshalb wurde die Klonierung der cDNA von Eotaxin-1 in den Vektor pET22b verändert. Hierfür wurde statt MscI die Schnittstelle NcoI an das Insert gehängt. Nach dem Restriktionsverdau des Inserts und des Vektors pET22b mit NcoI und NotI hatten beide DNA-Moleküle Enden mit Einzelstrangüberhang. Dadurch wurde einerseits die Wahrscheinlichkeit für die Ligation aufgrund komplementärer Basen und andererseits die richtige Orientierung des Inserts in den Vektor erhöht. Die Kontroll-PCR wurde nach der Ligation und der Transformation in DH5 α durchgeführt.

5. Ergebnisse

Um Fehler bei der Ligation auszuschließen und damit die Ausbeute an positiven Klonen zu erhöhen, wurde ein Kontrollansatz mit dem Vektor pET22b durchgeführt. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym NotI geschnitten und danach in einem Ligationsansatz eingesetzt, um die T4-DNA-Ligase zu testen. Das Ergebnis, das in Abb. 22 A dargestellt ist, zeigt zwei Banden des religierten Vektors auf gleicher Höhe wie die des ungeschnittenen Vektors (pK). Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die Ligation mit der T4-DNA-Ligase korrekt verlief. Bei der Wiederholung der Klonierung von Eotaxin-1 in den Expressionsvektor pET22b wurden nach der Transformation 12 Klone für die Kontroll-PCR entnommen. In Abb. 22 B sind die PCR-Ansätze der Klone auf einem Agarosegel dargestellt. Als Positivkontrolle wurde der Amplifikationsvektor pMAEotaxin-1, als Negativkontrolle wurde zum einem Wasser und zum anderen der Amplifikationsvektor mit einem anderen Chemokin eingesetzt. Die Negativkontrollen zeigten, dass keine Kontamination und keine unspezifische Bindung der Primer vorlag. Von den 12 Klonen, die das Gen für Eotaxin-1 enthalten sollten, waren 10 positiv und zeigten eine Bande mit einer Größe von 225 bp.

Das Ergebnis der Kontroll-PCR mit je 4 Klone vom Klonierungsexperiment K3 mit der cDNA von SDF1 α ist in Abb. 23 dargestellt. Das Insert im Vektor pET28a wurde bei 3 von 4 Klone mit einer Größe von 254 bp detektiert. Alle Klone mit dem Vektor pET22b enthielten das Insert mit einer Größe von 207 bp. Die positiven Klone wurden durch Sequenzierung weiter überprüft.

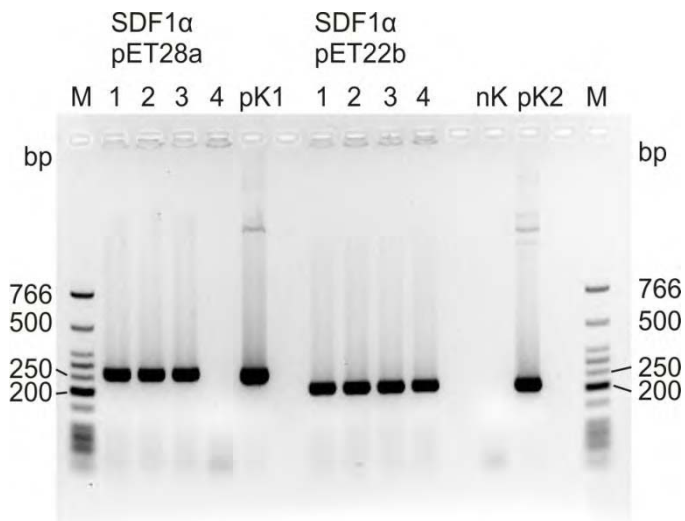


Abb. 23: Kontroll-PCR-Ansätze von der cDNA für SDF1 α im Klonierungsexperiment K3 auf einem 2%igem Agarosegel; M Marker, pK1 und 2 Positivkontrolle mit pMASDF1 α , nK Negativkontrolle mit Wasser

Tab. 29: Ergebnis der Sequenzierung der cDNAs nach dem Klonierungsexperiment K3 (+Sequenz korrekt, - Sequenz nicht korrekt)

Klon	Gen	Sequenz
1-8, 10, 12	Eotaxin-1 pET22b	+
11	Eotaxin-1 pET22b	-
1-3	Eotaxin-1 pET28a	+

Klon	Gen	Sequenz
1 und 2	Interleukin-8 pET22b	+/-
1	Interleukin-8 pET28a	+
1	pET28a SDF1 α	-
2 und 3	pET28a SDF1 α	+
1-4	pET22b SDF1 α	+

Von den zehn positiven Klonen mit pET22b Eotaxin-1 des Kontroll-PCR-Ansatzes wurde bei neun Klonen die korrekte Gensequenz ermittelt (Tab. 29). Bei der Sequenzierung des Inserts im Vektor pET28a wurde eine richtige Gensequenz für Eotaxin-1 ermittelt. Bei beiden Klonen, die das Gen für Interleukin-8 im Vektor pET22b enthielten, wurde die korrekte Gensequenz festgestellt. Für Klon 1 mit IL-8 im Vektor pET28a wurde ebenfalls eine korrekte Sequenz ermittelt. Es wurde bei allen Klonen mit SDF1 α die korrekte cDNA-Sequenz festgestellt, außer bei dem ersten in pET28a. Klone mit der richtigen Gensequenz wurden amplifiziert und die daraus isolierte pDNA in den Expressionsstamm BL21 DE3 RIL transformiert und auf Expression getestet.

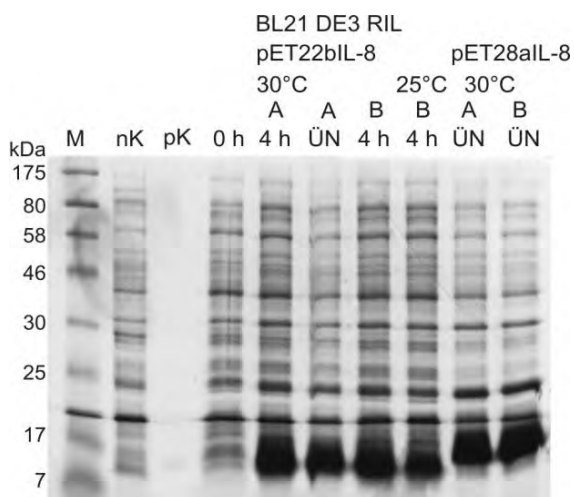


Abb. 24: SDS-Gel mit den Proben der Expressionsanalyse von pET22bIL-8 und pET28aIL-8 in BL21 DE3 RIL; A 0,1 mM und B 0,5 mM IPTG; nK Negativkontrolle BL21 DE3 RIL ohne Vektor, pK Positivkontrolle rhIL-8

Das SDS-Gel in Abb. 24 zeigt die Proben des Ansatzes, bei dem die Expression von IL-8 im Vektor pET22b im Expressionsstamm BL21 DE3 RIL bei 30°C mit zwei verschiedenen IPTG-Konzentrationen (A 0,1 und B 0,5 mM) und bei 25°C mit 0,5 mM IPTG getestet wurde. Nach 4 h und über Nacht wurden bei beiden Temperaturen unabhängig von der IPTG-Konzentration signifikante Banden bei einer Größe von 8,4 kDa detektiert. Ebenso wurden deutliche Expressionsbanden mit einer Größe von 11,3 kDa von His₆-tag-IL-8 unabhängig von der eingesetzten Menge des IPTGs beobachtet.

5. Ergebnisse

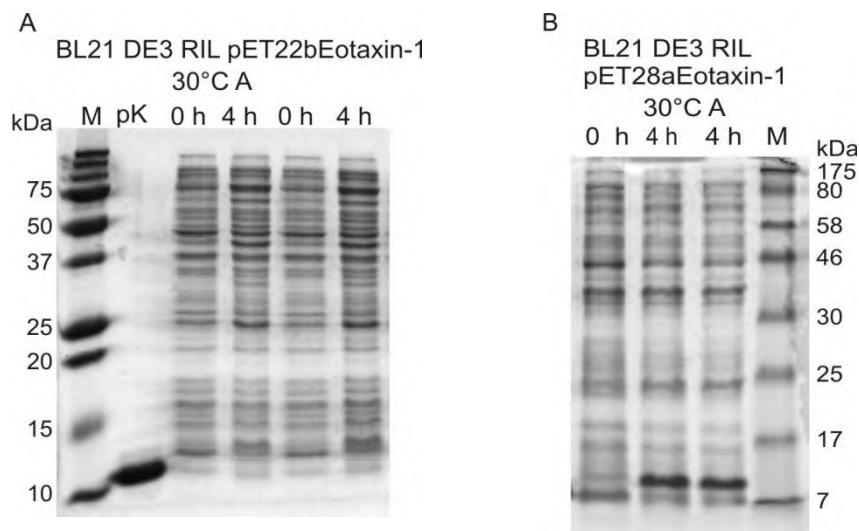


Abb. 25: SDS-Gele mit den Proben der Expressionsansätze von Eotaxin-1 in BL21 DE3 RIL; A, ohne His-tag und B, mit His-tag; M Marker, A 0,1 mM IPTG, pK kommerzielles rhEotaxin-1

In dem in Abb. 25 A dargestellten SDS-Gel mit den Proben der Expressionsanalyse von pET22bEotaxin-1 ist keine Expressionsbande bei einer Größe von 8,4 kDa zu erkennen. Bei dem Expressionstest des His-getagten Eotaxin-1, in Abb. 25 B, konnte nach 4 h bei 30°C eine deutliche Bande mit einer Größe von 11,3 kDa detektiert werden. Diese Expressionsbande war in den Übernachtproben bei weiteren Versuchen nicht mehr zu erkennen. Das exprimierte rekombinante His₆-tag-Eotaxin-1 wurde vermutlich in der Zelle durch Proteasen abgebaut. Sofortiges Einfrieren der Zellpellets nach 4 h Expression und die Zugabe von Proteaseinhibitoren verhinderten nicht den Abbau des Proteins.

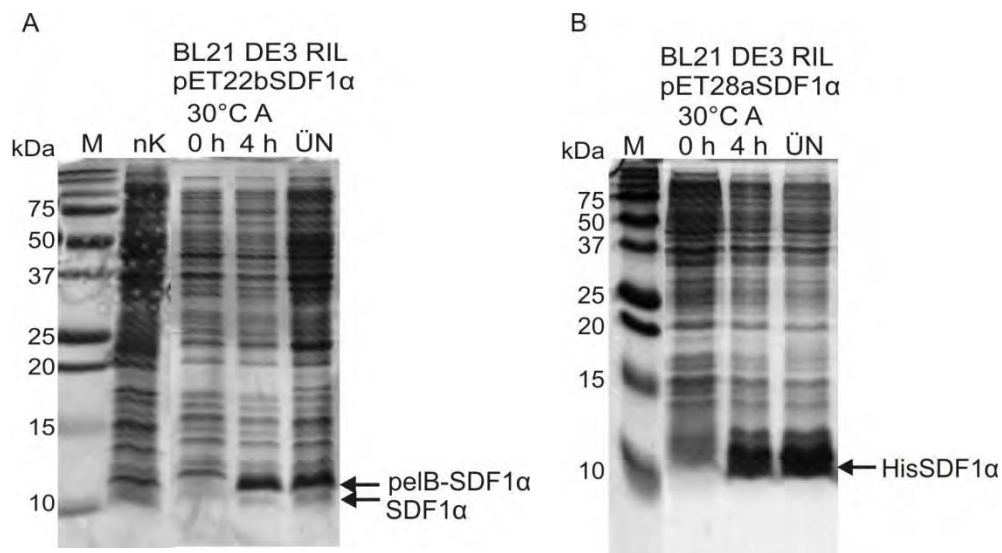


Abb. 26: SDS-Gele mit den Proben der Expressionanalyse von SDF1α in BL21 DE3 RIL; A, pET22bSDF1α und B, pET28aSDF1α; M Marker, nK Expressionsstamm ohne Vektor

Die Proben der Expression von SDF1α mit dem Signalpeptid pelB (pET22b) für den Transport in den periplasmatischen Raum werden im SDS-Gel in Abb. 26 A gezeigt. Die

ungeschnittene Variante lag als dickere Bande etwas höher als die des nativen SDF1 α , das eine Größe von 8,0 kDa hatte. Das native Chemokin war nach 4 h und bei den Übernachtproben als schwache Bande zu sehen. Damit wurde gezeigt, dass der Transport in den periplasmatischen Raum bzw. die Abtrennung des pelB-Peptids in *E. coli* nicht vollständig war und die Expression schneller als die Verarbeitung ablief. Das SDS-Gel in Abb. 26 B mit den Proben der Expressionsanalyse mit dem rekombinanten Vektor pET28aSDF1 α zeigt deutliche Expressionsbanden des Chemokins mit His-tag mit einer Größe von 9,7 kDa nach 4 h und über Nacht.

5.1.3.4 K4: codonoptimierte cDNA von Eotaxin-1 und Interleukin-8 in den Expressionsvektor pET28a ohne His-tag

Aufgrund der guten Ergebnisse der Expressionsanalyse mit den rekombinanten Vektor pET28a wurden für eine tagfreie Expression die cDNAs von Eotaxin-1 und IL-8 kloniert. Um die Entfernung des His-Tags zu sparen, wurden die Gene ohne die His-Tag- und TEV-Erkennungssequenz in den Vektor pET28a eingefügt. Beim Restriktionsverdau mit Hilfe der Restriktionsenzyme NcoI und NotI wurde die His-tagcodierende Sequenz aus dem Vektor pET28a entfernt. Von den cDNAs für Eotaxin-1 und IL-8 wurden nur die Gensequenzen für die nativen Proteine mit den Restriktionsenzym-schnittstellen NcoI und NotI mittels PCR amplifiziert. Nach dem Restriktionsverdau der Inserts wurden diese mit dem Vektor ligiert und die Ansätze danach in DH5 α transformiert. Die Kontroll-PCR wurde mit 2 bis 3 Klonen durchgeführt (Abb. 27).

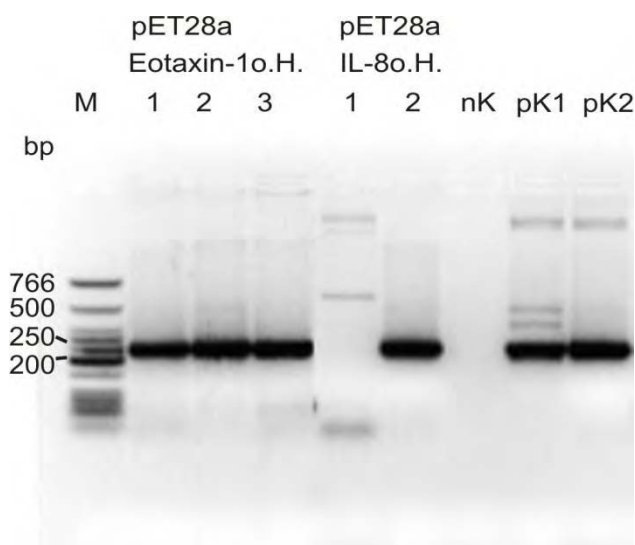


Abb. 27: Kontroll-PCR-Ansätze der cDNA vom Klonierungsexperiment K4 auf einem 2%igem Agarosegel; M Marker, nK Negativkontrolle; pK1 Positivkontrolle mit pMAEotaxin-1; pK2 Positivkontrolle mit pMAIL-8; o.H. ohne His-Tag

Bei nur einem der beiden rekombinanten Klone mit pET28aIL-8o.H. war das Insert als Bande mit einer Größe von 225 bp erkennbar. Die Inserts von Eotaxin-1o.H. hatten eine Größe von 228 bp und wurden bei allen Klonen detektiert.

5. Ergebnisse

Tab. 30: Ergebnis von der Sequenzierung der cDNAs nach dem Klonierungsexperiment K4 (+Sequenz korrekt, - Sequenz nicht korrekt)

Klon	Gen	Sequenz
1-3	pET28a Eotaxin-1 o.H.	+
2	pET28a IL-8 o.H.	+

Die Ergebnisse der Sequenzierung der cDNAs von der Klonierung 4 sind in Tab. 30 dargestellt. Alle getesteten Klone von den Kontroll-PCR-Ansätzen enthielten die korrekte Gensequenz. Nach der Amplifikation, pDNA-Isolierung und Transformation in den Expressionsstamm Rosetta DE3 bzw. BL21 DE3 RIL wurden die Konstrukte auf Expression überprüft. Die Expression wurde mit einer Endkonzentration von 0,1 mM IPTG induziert und erfolgte bei 30°C.

Das Ergebnis der Expressionsanalyse mit dem rekombinanten Vektor pET28aIL-8o.H. in Rosetta DE3 und BL21 DE3 RIL wird in Abb. 28 präsentiert. Bei beiden Expressionsstämmen wurden nach 4 h und über Nacht deutliche Expressionsbanden mit einer Größe von 8,4 kDa beobachtet. Rosetta DE3 hat einen ähnlichen genetischen Hintergrund wie in BL21 DE3 RIL mit Ausnahme der *lon*-Proteasemutation und den Genen für zusätzliche tRNAs. Also scheinen die zusätzlich produzierten tRNAs nicht expressionsbestimmend zu sein.

Die Interleukin-8-Variante ohne His-tag enthält am N-Terminus ein Glycin vor der natürlichen Aminosäuresequenz und ist daher 57 Da größer als die Positivkontrolle. In der Natur werden zwei verschiedene Varianten von IL-8 produziert. Die Variante mit 72 Aminosäuren ist genauso aktiv wie die mit 77 Aminosäuren. Daher wird vermutet, dass ein Anhang von zusätzlichen Aminosäuren an den N-Terminus der 72aa-IL-8-Variante die Aktivität nicht reduziert.^[159]

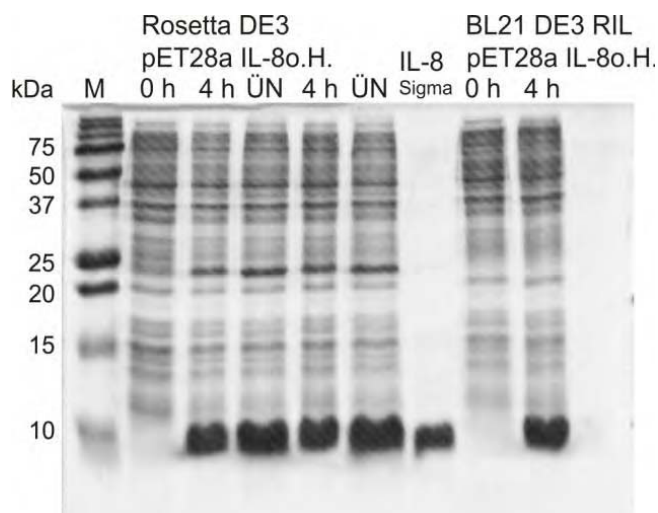


Abb. 28: SDS-Gel mit den Proben der Expressionsanalyse von Rosetta DE3 und BL21 DE3 RIL mit dem rekombinanten Vektor pET28aIL-8o.H.; M Marker, IL-8 Sigma Positivkontrolle

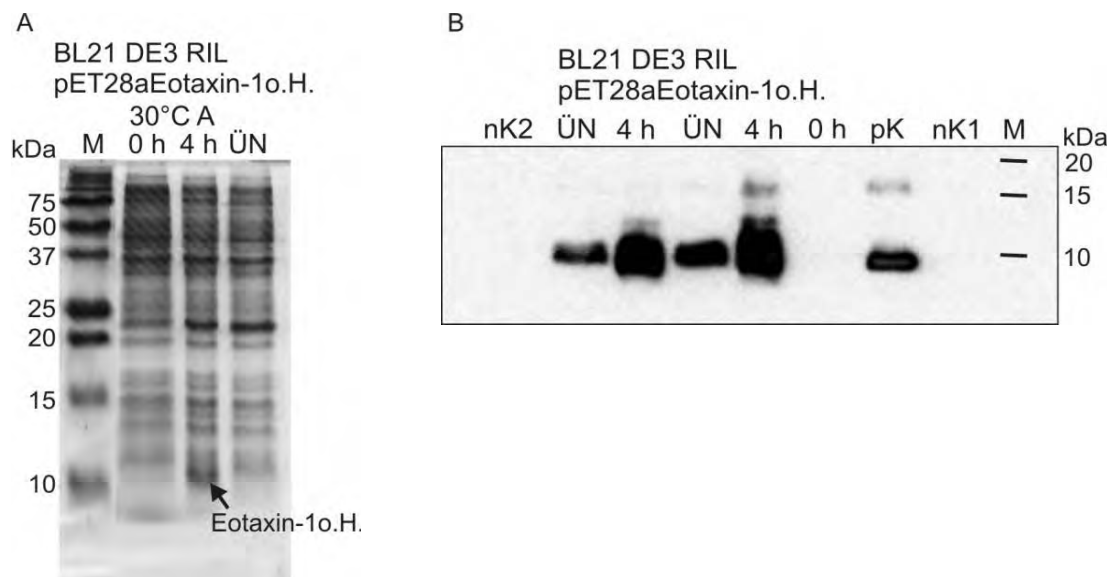


Abb. 29: SDS-Gel (A) und Western Blot (B) mit den Proben der Expressionsanalyse von BL21 DE3 RIL pET28aEotaxin-1o.H.; M Marker, pK Positivkontrolle rhEotaxin-1, nK1 Negativkontrolle BL21 DE3 RIL ohne Vektor, nK2 Negativkontrolle rhIL-8

Das Ergebnis der Expression von Eotaxin-1o.H. wird in Abb. 29 gezeigt. Hier wurde nach 4 h eine schwache Expressionsbande sichtbar, die in der Nullprobe und Übernachtsprobe nicht erkennbar war. Im Western Blot in Abb. 29 B wurden bei beiden Expressionsansätzen signifikante Banden von Eotaxin-1o.H. auf Höhe der Positivkontrolle detektiert. Die Abschwächung der Bande vermutlich durch den Abbau des Proteins in den Zellen war bei den Übernachtsproben (ÜN) ebenfalls zu sehen. Der Abbau des Proteins wurde nicht durch sofortiges Einfrieren der Zellpellets und Zugabe von Proteaseinhibitoren verhindert.

5.2 Reinigung von rekombinanten humanen Chemokinen aus *E. coli*

Die rekombinanten Bakterienstämme, die bei den Expressionstests deutliche Expressionsbanden gezeigt hatten, wurden in Ansätzen im Maßstab von 200-800 ml verwendet. Nach der Induktion mit IPTG erfolgte die Expression der rekombinanten Chemokine für zwei bis vier Stunden oder über Nacht bei 25-30°C. Die Großansätze wurden zentrifugiert und die Zellpellets für die Zellyse und Reinigung der rekombinanten Chemokine verwendet.

5.2.1 Vergleich und Optimierung verschiedener Zellysemethoden

Zur Optimierung der Zellyse und für die ersten Chromatographieläufe wurde der Vektor pIL8tac von der Firma Bayer Schering Pharma zur Verfügung gestellt. Der Vektor ermöglichte eine tagfreie Expression von rekombinatem IL-8.

Die ersten Zellysemethoden wurden nach Koltermann et al. durchgeführt.^[125] Dazu wurde das Zellpellet in Trispuffer resuspendiert, mit Lysozym und EDTA versetzt und auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Das Volumen wurde mit Trispuffer mit 0,5% Tween-20 verdoppelt. Der Überstand des Zellysats wurde nach der Zentrifugation entnommen und chromatographisch mit einer Heparinsäule getrennt. Chemokine haben am C-Terminus eine Glykosaminoglykanbindungs-

5. Ergebnisse

stelle und binden deshalb spezifisch an Heparin. Bei 280 nm wurden sehr geringe Proteinmengen detektiert. Deshalb wurde in weiteren Versuchen eine Kombination verschiedener Methoden getestet, um eine optimale Ausbeute der Proteine insbesondere von IL-8 in der löslichen Fraktion zu erhalten. Die Proteinmenge in den Überständen der Zelllysate wurden mit Auftragung gleicher Probenvolumen bei der Affinitätschromatographie durch den Vergleich der Peakflächen der Durchflussfraktion sowie der Fraktionen im NaCl-Gradienten ermittelt.

Die Expressionsansätze wurden mit dem rekombinanten Expressionsstamm BL21 DE3 RIL pIL8tac durchgeführt. Nach der Expression über Nacht wurden die Zellpellets der 100 ml Ansätze für die Behandlung mit verschiedenen Lysemethoden eingesetzt (Tab. 31). Alle Zelllysateüberstände hatten ein Gesamtvolumen von 4 ml, von denen je 1 ml für die Affinitätschromatographie eingesetzt wurde. Tab. 31 zeigt die einzelnen Arbeitsschritte und ihre Dauer. In der letzten Zeile der Tabelle wurden die Peakflächen der Durchflussfraktion sowie der Fraktionen im NaCl-Gradienten dargestellt. Die Peakfläche der Fraktionen (zweiter Wert), die während des Salzgradienten gesammelt wurden, war besonders relevant, da sie das IL-8 enthielten. Die Werte der Ansätze 1-3 zeigten einen Zusammenhang zwischen der Dauer von Ultraschallbehandlung sowie Lysozymeinwirkung und der Proteinausbeute. Die Peakflächen von Ansatz 1, die nur 10 min im Ultraschallbad standen, waren mit 1061 und 31 mAU*min deutlich niedriger als bei den Ansätzen 2 und 3, die jeweils 30 min sonifiziert worden waren, mit Werten bei 1257 und 42 mAU*min bzw. 4950 und 172 mAU*min. Im Ansatz 3 wurden nach 60 min Einwirkungsdauer von Lysozym größere Peakflächen ermittelt als im Ansatz 2 nach 25 min. Einen großen Einfluss hatte der Gefrier-Tau-Zyklus (G-T-Zyklus). Hier wurde bei den Ansätzen 4, 7 und 8 größere Peakflächen detektiert als bei den Ansätzen 5 und 6, die nicht eingefroren worden waren (Abb. 30, Abb. 31).

Tab. 31: Vergleich der Peakflächen der Chromatogramme von Zelllysaten nach Bearbeitung mit verschiedenen Zellysemethoden. Alle Ansätze wurden mit einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml Lysozym behandelt sowie mind. 60 min mit detergenzhaltigen Puffer.

Ansatz	1	2	3	4	5	6	7	8
Ultraschallbad [min]	10	30	30	30	30	60	60	60
Lysozymeinwirkung [min]	25	25	60	60	60/Rt	120	120	120
Lysepuffer mit Detergenz [min]	60	60	60	60	60	90	60	60
Gefrier-Tau-Zyklus	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	ja
Peakfläche DF [Area mAU*min]	1061	1257	4950	6393	3665	4712	5859	6193
Peakfläche im NaCl-Gradient [Area mAU*min]	31	42	172	363	124	134	213	247

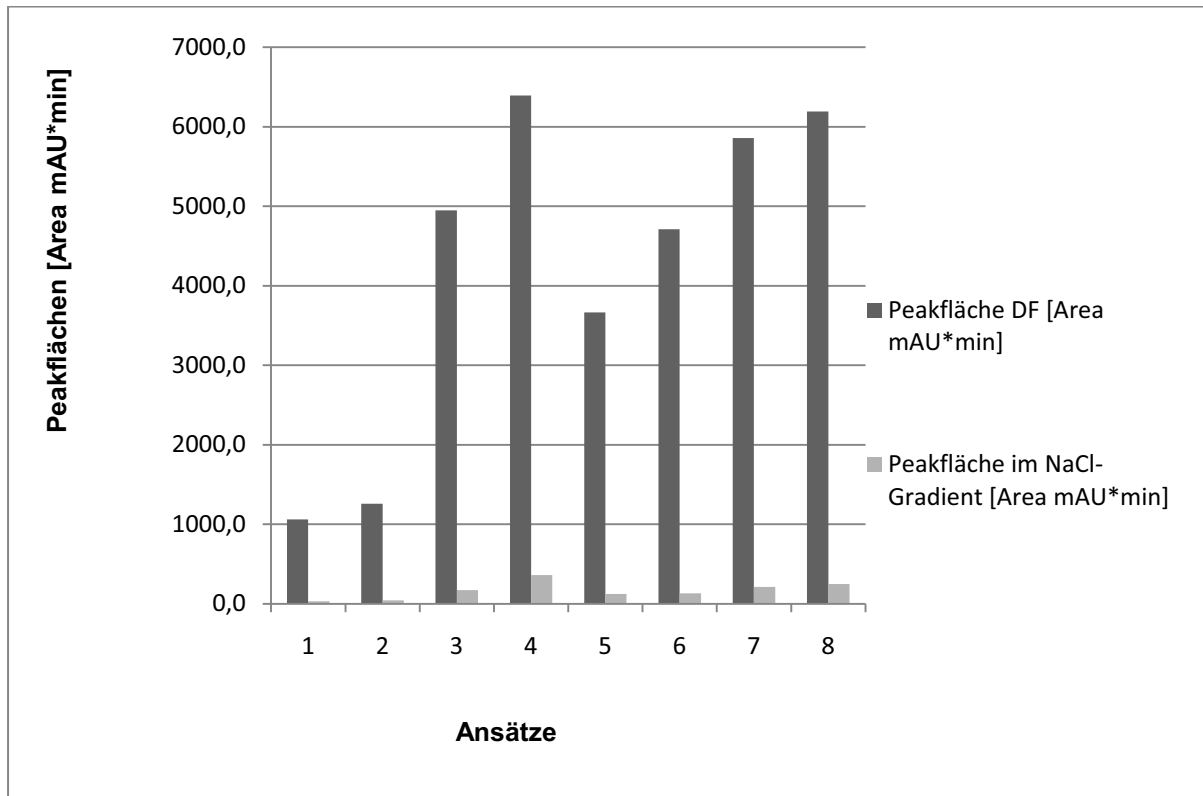


Abb. 30: Peakflächen der Durchflussfraktionen (DF) und Fraktionen im NaCl-Gradienten von Chromatogrammen verschiedener Zellyseansätze

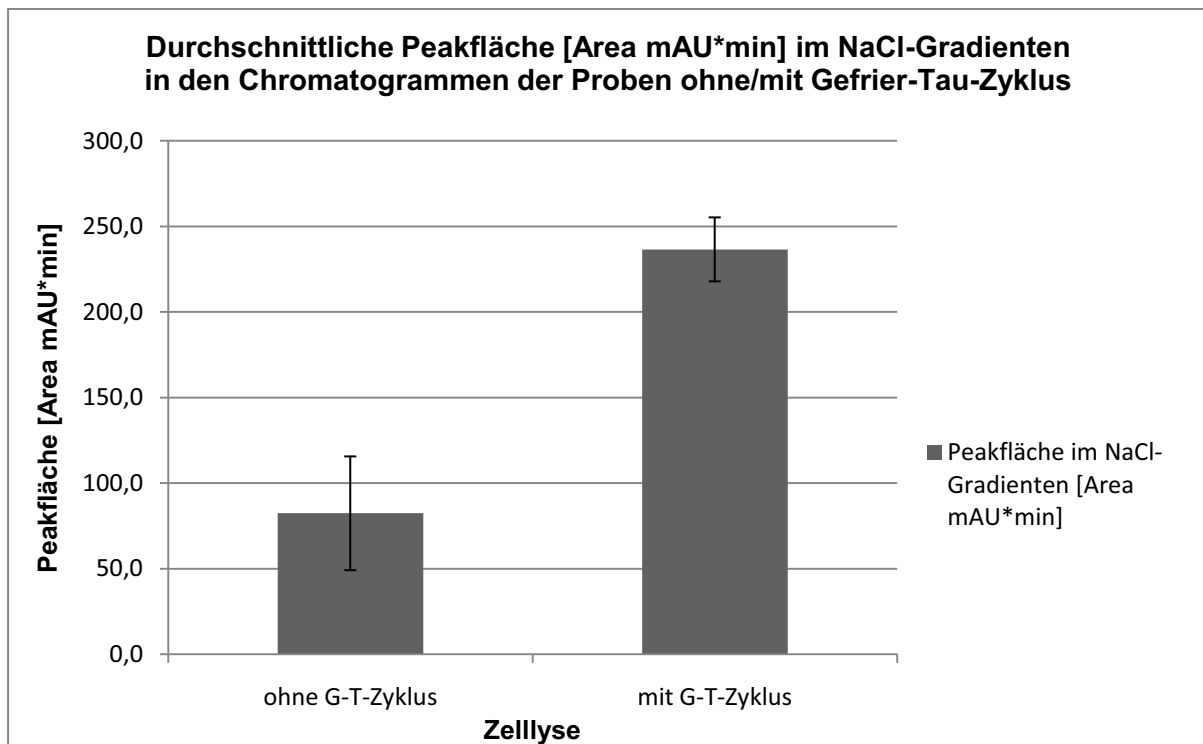


Abb. 31: Peakflächen der Durchflussfraktionen von Chromatogrammen verschiedener Zellyseansätze ohne und mit Gefrier-Tau-Zyklus (G-T-Zyklus)

5. Ergebnisse

Sehr große Mengen genomischer DNA verliehen den Lysaten eine hohe Viskosität. Aufgrund der negativen Ladungen der DNA binden daran die positiv geladenen Proteine wie IL-8 und werden bei der Zentrifugation im Pellet zurückgehalten. Die von den Zellysetests angefallenen Pellets wurden daher gepoolt (Ansätze 1-4 und 5-8), nochmals in Trispuffer resuspendiert und dann zusätzlich mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml DNaseI behandelt.

Tab. 32: Peakflächen der Durchflussfraktion und Fraktionen im NaCl-Gradient von Chromatogrammen von den Überständen der vereinigten Pellets der Zellysate nach Einwirkung von DNaseI; HiTrap Heparin 1 ml-Säule, 7 ml Probe

Arbeitsschritt\Ansätze	1 bis 4	5 bis 8
mit DNaseI	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
Probenmenge [ml]	7	7
Peakfläche DF [Area mAU*min]	42076	40593
Peakfläche im NaCl-Gradient [Area mAU*min]	5614	3956

Dadurch verflüssigten sich die Pellets und weitere Proteine wurden in die lösliche Fraktion überführt, die als Peakflächen der Chromatogramme in Tab. 32 dargestellt sind. Peakflächen im NaCl-Gradienten von 5614 und 3956 mAU*min zeigten, dass weitere heparinbindende Proteine also vermutlich auch IL-8 durch die Zugabe der DNaseI in den Zellysätüberstand freigesetzt worden waren.

Durch den Vergleich der durchgeführten Zellysemethoden und den in der Literatur beschriebenen Lysemethoden wurde eine optimierte Methode (Wiese et al., im Druck) für lösliche rekombinante Chemokine mit folgenden Arbeitsschritten etabliert:

Das Zellpellet wurde in Resuspensionspuffer 2 (40 mM Na₂HPO₄, 90 mM NaCl pH 7,0) resuspendiert, eine Tablette Complete MINI Protease Inhibitor Cocktail (Roche) pro 10 ml Zellysate, sowie DNaseI mit einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml und Lysozym mit einer Endkonzentration von 0,4 mg/ml dazu gegeben und 2 h auf Eis inkubiert. Die Zugabe von EDTA führt durch die Bindung von Ca²⁺ zu einer Destabilisierung der Zellwand und verbessert dadurch die Wirkung des Lysozyms. Es wurde Lysispuffer 2 bzw. 3 (mit Triton X-100 bzw. Triton X-114) mit einer Endkonzentration von 0,25% Detergenz und 0,2 mg/ml DNaseI zum Gesamtzellysate zugegeben. Das Detergenz zerstört die Zellmembran der Bakterien. Die Sonifizierung erfolgte für 3× 30 sec bei 50% Leistung mit einer Ultraschallsonde (Bandelin Sonopuls) statt dem Ultraschallbad. Danach wurde das Zellysate für 30 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Durch die gebildeten Eiskristalle wird die Zellmembran ebenfalls zerstört. Mit der Kombination der verschiedenen Lysemethoden wurde der Aufschluss der Zellen verbessert und die Menge des freigesetzten rekombinanten nativen Chemokins erhöht. Durch Inkubation über Nacht wurde der vollständige Abbau der DNA durch die DNaseI gewährleistet. IL-8, das noch die hydrophobe pelB-Sequenz enthielt, verblieb nach dem Zentrifugieren im Pellet. Der Zellysätüberstand wurde für die chromatographische Reinigung des nativen löslichen Chemokins eingesetzt.

Für die Lyse von rekombinanten Zellen, die Interleukin-8 mit His-tag exprimiert hatten, wurden der Resuspensionspuffer 3 und Lysispuffer 4 (300 mM statt 90 mM NaCl und 20 mM Imidazol) verwendet. Die erhöhte Salzkonzentration und das Imidazol verringern unspezifische Bindungen der *E. coli*-Proteine an der Nickelsäule und wurden in dem Datenblatt der HisTrap-Säule vom Hersteller empfohlen. Da das His-getagte SDF1 α als unlösliche Form vorlag, wurde Resuspensionspuffer 3 eingesetzt und nach der Lysozymeinwirkung mit Endkonzentrationen von 3 mM reduziertem Glutathion, 2 M Harnstoff und 0,25% Triton X-114 versetzt. Durch die Zugabe von Harnstoff und reduziertem Glutathion wurden die Einschlusskörper gelöst und das Protein dabei denaturiert. Alle weiteren Arbeitsschritte der Zellyse wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Nach der Zellyse von BL21 DE3 RIL pET28aEotaxin-1 wurde trotz Zugabe von Proteaseinhibitoren weder im Überstand noch im Pellet eine Proteinbande des rekombinanten Proteins im SDS-Gel gesehen. Auch das Einfrieren der Zellpellets direkt nach der Expression sowie eine Zugabe von größeren Mengen der Proteaseinhibitoren verhinderten nicht den Abbau des Proteins. Obwohl die Proteaseinhibitorcocktailtabletten mehrere Proteaserhemmer enthielten, konnte die bakterielle Protease, die vermutlich das Chemokin abbaut, nicht gehemmt werden.

5.2.2 Freisetzung von IL-8 aus dem periplasmatischen Raum

Um die Faltung des rekombinanten Proteins zu verbessern wurde es mit Hilfe eines Signalpeptids in den periplasmatischen Raum transportiert. Mehrere verschiedene Signalpeptide, z.B. pelB, ompA, phoA und StII, ermöglichen diesen Transport. Die in dieser Arbeit exprimierten Chemokine wurden durch das vom Vektor pET22b codierte pelB-Peptid in den periplasmatischen Raum transportiert. Dort wurde das Signalpeptid durch eine bakterielle endogene Aminopeptidase entfernt und das native Chemokin freigesetzt.

Eine weitere Zellysemethode, die gezielt nur Proteine aus dem periplasmatischen Raum in den Überstand überführen sollte, wurde nach Chen et al.^[160] getestet. Hierzu wurden die rekombinanten Zellen mit dem Vektor pET22bIL-8 einem osmotischen Schock, der die Freisetzung des Interleukin-8 aus dem periplasmatischen Raum fördert, unterworfen. Dafür wurde zuerst eine 20%ige Saccharoselösung mit 0,5 mM EDTA zu den Zellen gegeben. Die hohe Zuckerkonzentration verursacht ein Schrumpfen der Zelle und EDTA destabilisiert die LPS-Struktur der Zellwand und führt zu einer höheren Permeabilität der äußeren Membran. Durch die Zugabe von destilliertem Wasser vergrößert sich die Zelle schlagartig und die Proteine werden aus dem periplasmatischen Raum nach außen ins umgebende Medium abgegeben. Die Proteine sollten nach dem Abzentrifugieren der Zellen gereinigt werden.

Im SDS-Gel waren keine Proteinbanden, die dem rekombinanten IL-8 entsprachen, zu sehen. Außerdem wurde eine Zerstörung der inneren Membran bei der Durchführung festgestellt, so dass die Lösung aufgrund der freigesetzten DNA viskos war.

5.2.3 Reinigung von rekombinanten Chemokinen mittels Chromatographie

5.2.3.1 Auswahl der Chromatographiemethoden

Die ersten FPLC-Läufe wurden mit Affinitätschromatographie an einer HiTrap Heparin FF 1 ml-Säule durchgeführt. Chemokine besitzen am C-Terminus eine Glykosaminoglykanbindungsstelle und binden deshalb mit einer hohen Affinität an Heparin. Ob die Heparinsäule, das rekombinante Chemokin bindet, wurde mit gekauftem rhIL-8 überprüft. In Abb. 32 ist das Chromatogramm der Affinitätschromatographie dargestellt. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 50 bis 2000 mM NaCl. Eine geringe Verunreinigung des gekauften IL-8 zeigte sich in einem minimalen Peak in der Durchflussfraktion (DF) X1. Die Elution des Chemokins erfolgte zwischen 1200-1500 mM NaCl. Die hohe zur Elution benötigte NaCl-Konzentration bewies eine starke Bindung des Proteins an das Heparin. Beim exprimierten rekombinanten IL-8 wurden daher ebenfalls hohe Salzkonzentrationen zur Elution verwendet.

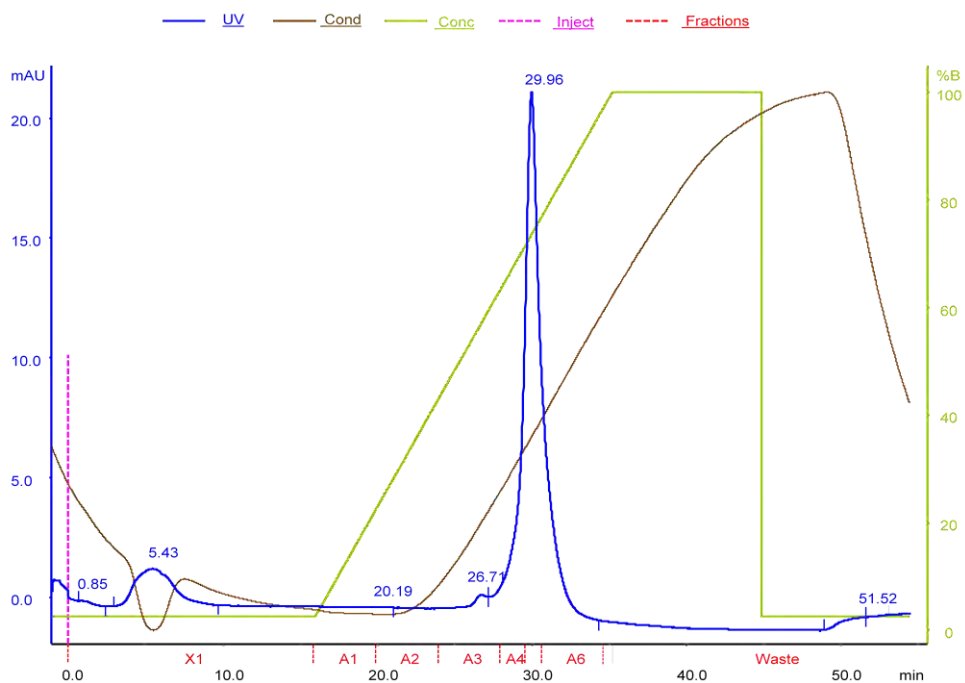


Abb. 32: Chromatogramm der Affinitätschromatographie mit einer Heparinsäule mit 1 ml Probe, die 100 µg des gekauften rhIL-8 enthält. Puffer A1: 20 mM Tris pH 8,0, Puffer B1: 20 mM Tris, 2 M NaCl pH 8,0; blau: Detektion bei 280 nm

Bei der Chromatographie wurden die Proteine bei 280 nm photometrisch detektiert. Welche Proteine aufgesammelt worden waren, wurde daraus jedoch nicht ersichtlich. Daher war ein wichtiger Schritt bei der Reinigung der rekombinanten Chemokine die Analytik mittels Massenspektrometrie. Hierbei wurden die Massen der Proteine in den gesammelten FPLC-Fractionen mit den gekauften rekombinanten Chemokinen verglichen. Die Massen der His-getagten Chemokine wurden aus den Aminosäuresequenzen mit Hilfe eines Proteinmassenkalkulationprogrammes (ProteinCalculator v3.3) ermittelt.

Während der Tests zur Reinigung des rekombinanten Interleukin-8 wurden die gesammelten Fractionen nach jedem Chromatographieschritt am Massenspektrometer überprüft. Nach der

Optimierung der Reinigungsmethode wurden am Ende nur die Gelfiltrationsfraktionen mit dem gereinigten Chemokin analysiert.

In Abb. 33 A ist das Massenspektrum des kommerziellen rhIL-8 (Kontrolle) dargestellt. Das zweite Massenspektrum (B) zeigt die Analyse einer FPLC-Fraktion eines einzelnen Chromatographieschrittes mit einer Heparinsäule, bei dem 100 µg kommerzielles rhIL-8 aufgetragen und über einen Salzgradienten eluiert wurden (Abb. 32). Mit dem ProteinCalculator v3.3 wurde eine Masse von 8380 Da berechnet. In beiden Spektren ist das einfach geladene Protein als Peak mit einer Masse von 8391 und 8392 Da mit einer Intensität von 100% zu sehen. Im Spektrum A wurde ein Peak mit einer Masse von 16772 Da detektiert, der dem einfach geladenen Dimer von IL-8 entspricht. Die Breite der Peaks entstand durch die Detektion verschiedener Massenisotope des Chemokins. Ein kleinerer Peak mit einer Masse von 12580 Da in Abb. 33 A war auf eine geringe Verunreinigung des gekauften Chemokins zurückzuführen.

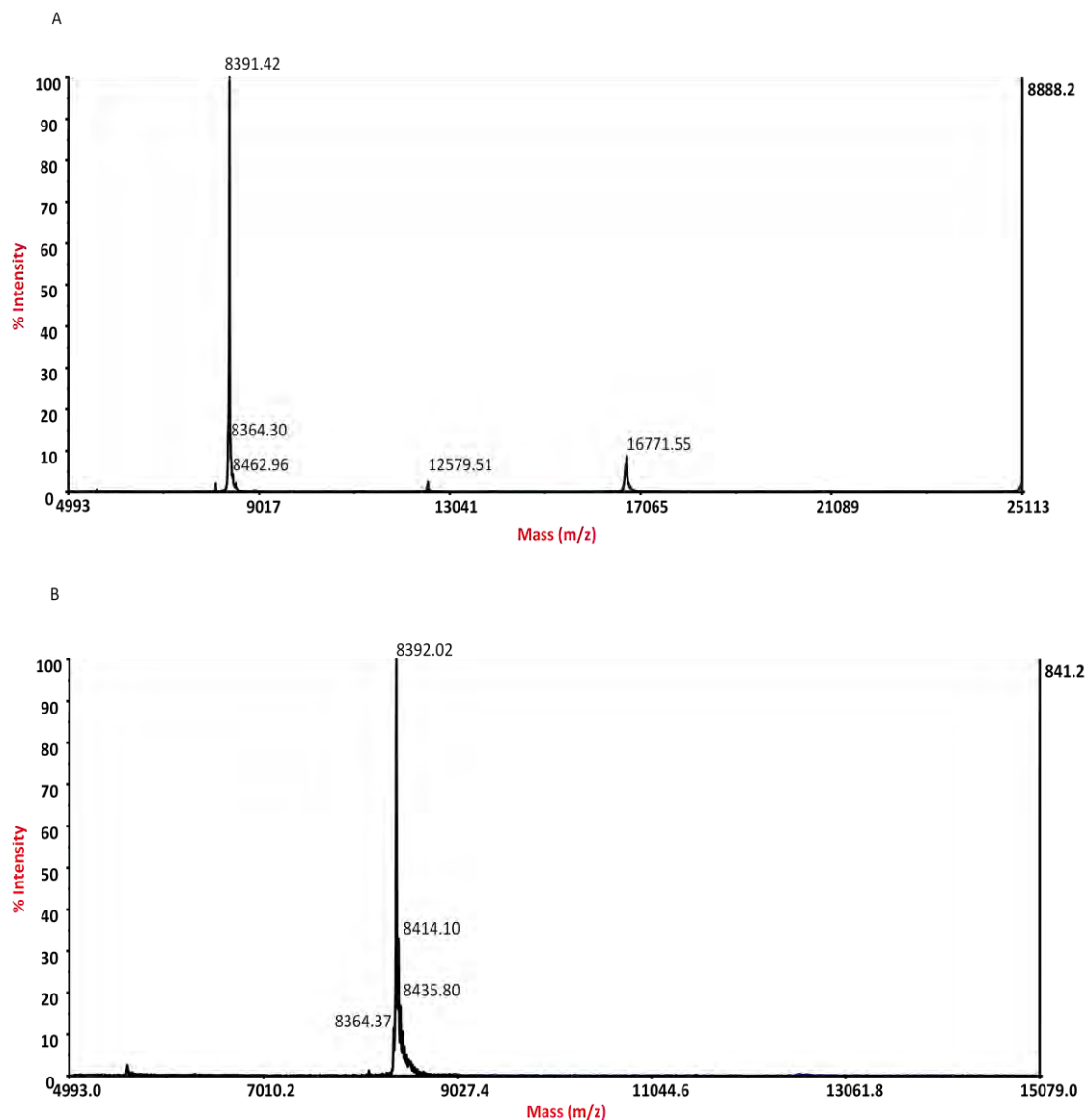


Abb. 33: Massenspektren von Interleukin-8, A Positivkontrolle rhIL-8, B FPLC-Fraktion F5 eines Tests mit 100 µg rhIL-8 bei der Affinitätschromatographie mit einer Heparinsäule

5. Ergebnisse

Als nächster Testansatz wurde ein Zellysatsüberstand aus dem rekombinanten Expressionsstamm BL21 DE3 RIL pIL8tac verwendet. Das Chromatogramm der Affinitätschromatographie mit 7 ml des Zellysatsüberstands von BL21 DE3 RIL pIL8tac wird in Abb. 34 gezeigt. Der Peak der Durchflussfraktion wurde mit 2700 mAU detektiert. Während der Elution im NaCl-Gradienten wurden zwei sich überlappende Peaks aufgezeichnet. Die Elution der Proteine erfolgte zwischen 30-80%B (600-1600 mM NaCl). Die Methode wurde mit zwei weiteren Zellysatsüberständen wiederholt. Dafür wurden jeweils 11 ml Probe injiziert. Die gesammelten Fraktionen des Durchflusses und des NaCl-Gradienten wurden mit SDS-PAGE analysiert (Abb. 35). Pro Probe wurden 10 µg Gesamtproteinmenge aufgetragen. Alle Durchflussfraktionen wurden mit X1 bezeichnet und Fraktionen, die während des NaCl-Gradienten gesammelt worden waren, wurden mit A1 bis A5 nummeriert.

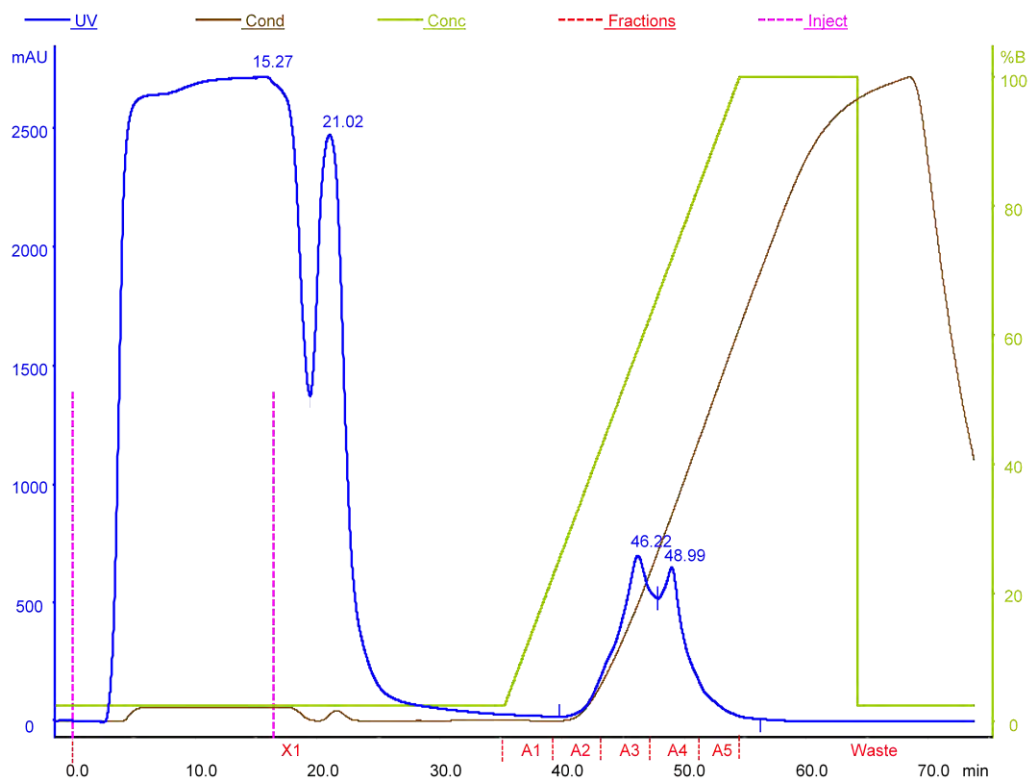


Abb. 34: Chromatogramm der Affinitätschromatographie an einer Heparinsäule mit 7 ml Zellysatsüberstand von BL21 DE3 RIL pIL8tac; Puffer A1 und B1

Im ersten Gel der Abb. 35 wurde als Positivkontrolle, 10 µg kommerzielles rhIL-8 aufgetragen. Bei beiden Gelen zeigten die Durchflussfraktionen X1 ähnliche Banden, die im größeren Molekulargewichtsbereich lagen. Das Fehlen der Bande von IL-8 in der Durchflussfraktion bewies eine vollständige Bindung an der Säule. Eine deutliche Bande, die dem Molekulargewicht der Positivkontrolle entsprach, war bei allen Läufen in den Fraktionen A4 und A5 zu erkennen. Die Fraktionen A3 enthielten ebenfalls eine schwache Bande mit einer Größe von 8,4 kDa. Von zwei Chromatographieläufen wurden die Fraktionen A5 gemischt und 10 µg Gesamtproteinmenge eingesetzt. Alle Fraktionen, die das rhIL-8 enthielten, zeigten weitere Banden von *E. coli*-Proteinen.

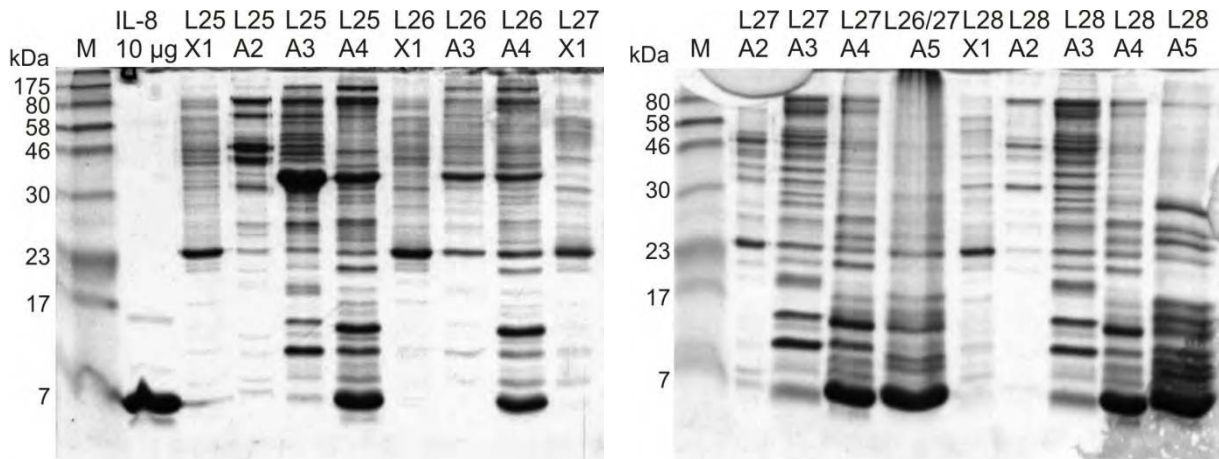
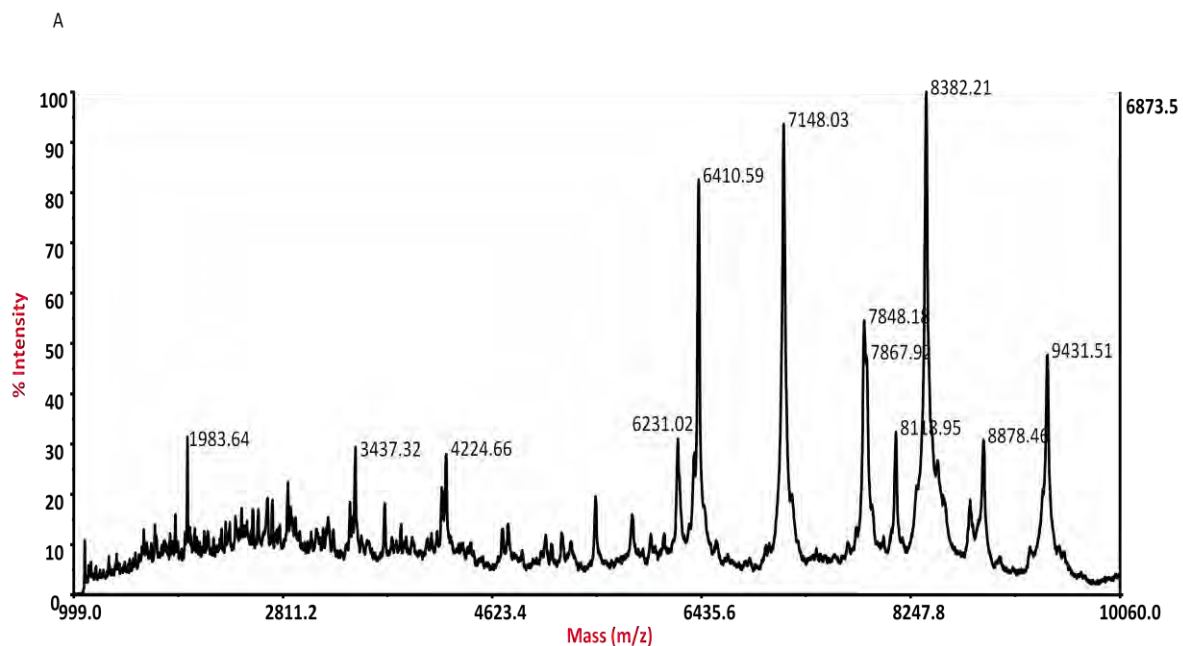


Abb. 35: SDS-Gele mit den FPLC-Fractionen der Läufe 25-28 mit 10 µg Gesamtproteinmenge pro Probe, HiTrap Heparin FF 1 ml-Säule; X1, A1-5 Fractionen

Die FPLC-Fractionen von den Tests an der Heparinsäule wurden nicht nur mit SDS-PAGE (Abb. 35) sondern auch mit Massenspektrometrie analysiert. Dadurch konnten Proteine, die aufgrund ihrer ähnlichen Massen im SDS-Gel nicht aufgelöst worden waren, detektiert werden. Abb. 36 zeigt die drei Spektren der Fractionen A3-A5 eines Chromatographielaufs. Peaks mit einer Masse von 8382, 8381 und 8388 Da mit einer Intensität von 100% entsprachen dem einfach positiv geladenen Interleukin-8 und stimmten mit dem Nachweis im SDS-Gel überein. In Abb. 36 A-C sind mehrere Peaks von anderen Proteinen aus dem Zellysatsüberstand sichtbar, die zusammen mit IL-8 eluieren. Damit wurde zusätzlich zur Gelelektrophorese nachgewiesen, dass die Heparinsäule nicht nur IL-8 sondern auch *E.coli*-Proteine bindet. Daraus wurde abgeleitet, dass ein einzelner Chromatographieschritt für die Reinigung nicht ausreichend war.



5. Ergebnisse

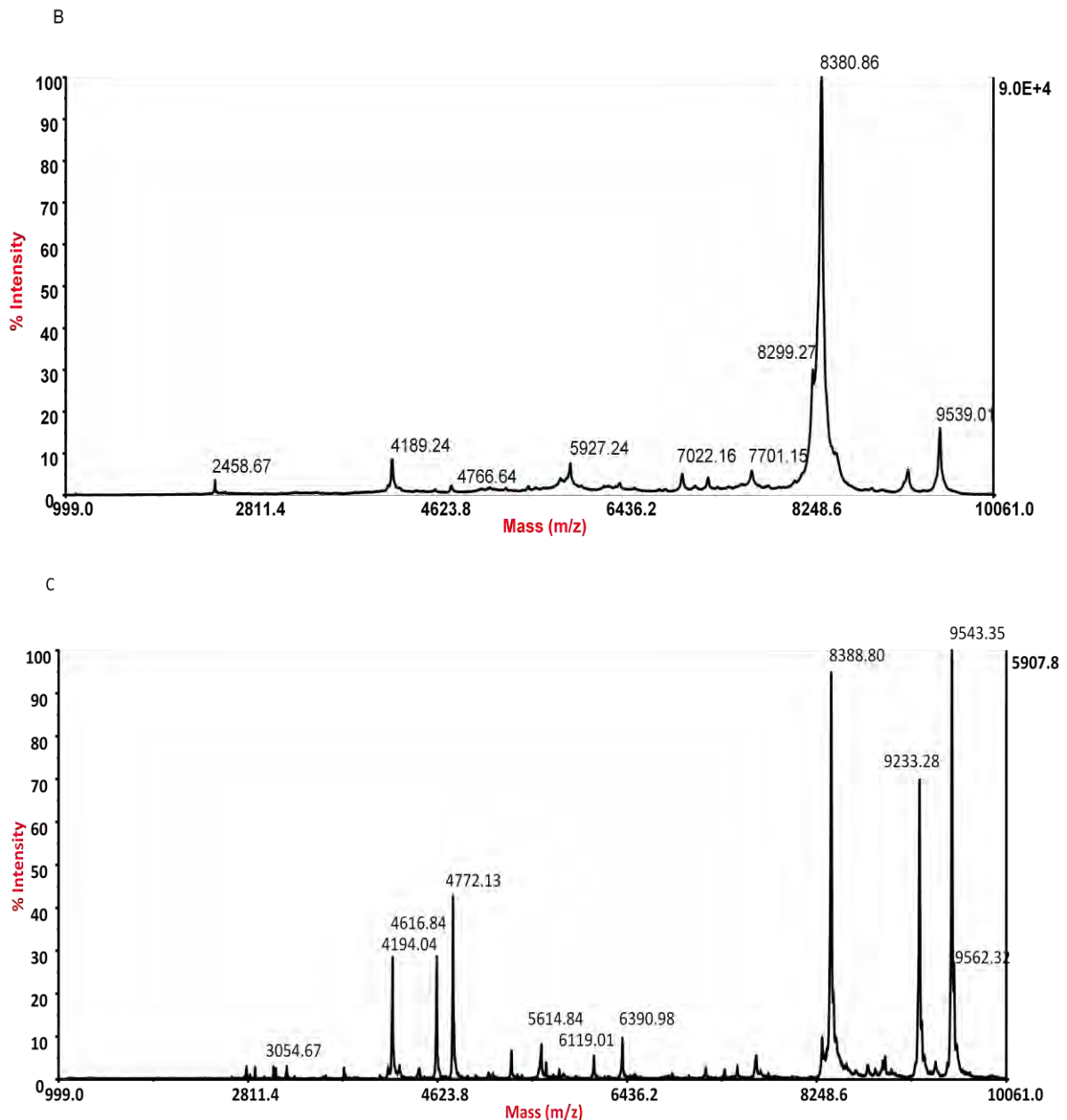


Abb. 36: Massenspektren von FPLC-Fraktionen der Affinitätschromatographie an einer Heparin-säule, bei der 7 ml Zellysätüberstand eines Expressionsansatzes mit BL21 DE3 RIL pIL8tac eingesetzt wurden, A Fraktion A3, B Fraktion A4, C Fraktion A5

Weitere Tests für die Reinigung rekombinanter Chemokine wurden mit einer Kationenaustauschersäule durchgeführt. Der pI bei 9,2 von Interleukin-8 wurde über die Aminosäuresequenz ermittelt. Daher liegt das Chemokin bei pH 7,0 positiv geladen vor und kann an einem Kationenaustauscher binden.

Ein erster Test, der in Abb. 37 zu sehen ist, wurde mit dem Überstand eines Zellysats von BL21 DE3 RIL pIL8tac an einer SP FF 1 ml-Säule durchgeführt. Es wurden 7,5 ml Probe injiziert, und die Elution der positiv geladenen Proteine erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0-50%B2 über 12 Säulenvolumen. Das Chromatogramm zeigt eine Überlappung des Peaks der Durchflussfraktion mit dem ersten Peak im NaCl-Gradienten, was auf eine zu kurze

Waschphase zwischen Injektion der Probe und Beginn des Salzgradienten zurückzuführen ist. Bei der Elution der Proteine waren zwei sich überlappende Peaks nach 19,2 und 22,3 min zu erkennen.

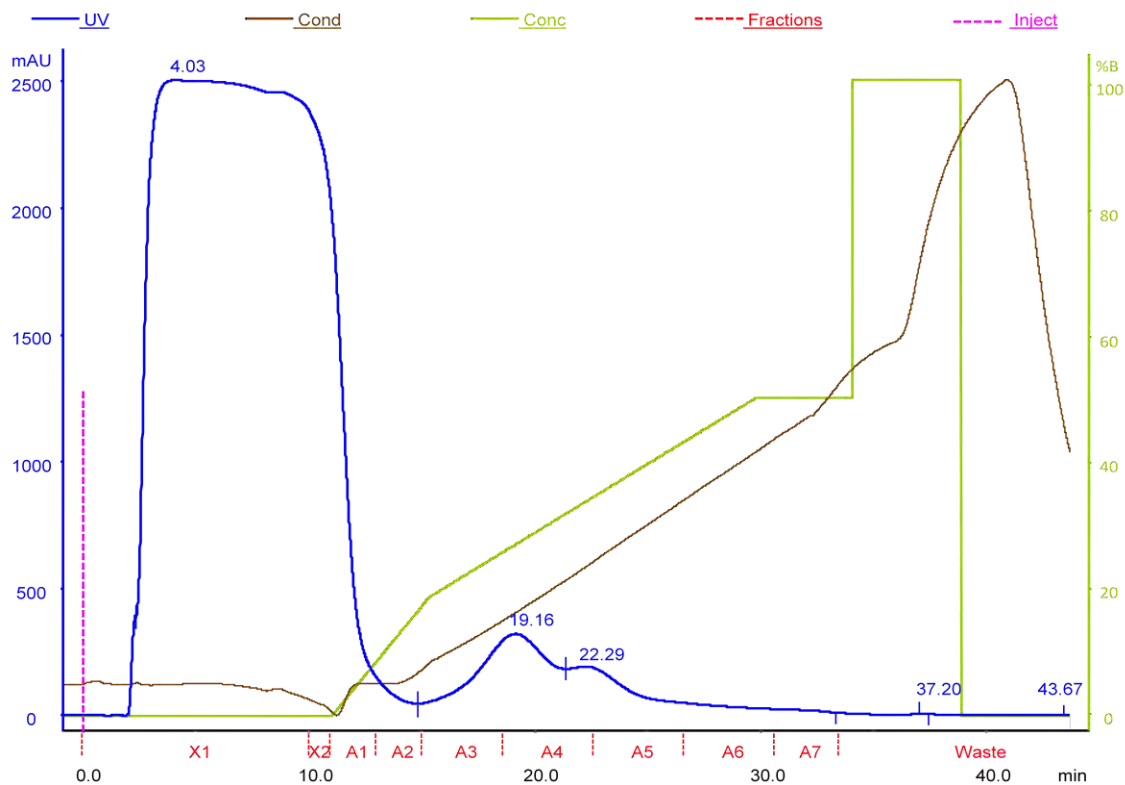


Abb. 37: Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie mit 7 ml Zellysätüberstand von BL21 DE3 RIL pIL8tac, Puffer A2: 40 mM Na₂HPO₄, 80 mM NaCl pH 7,0, Puffer B2: 40 mM Na₂HPO₄, 2 M NaCl pH 7,0; blau: Detektion bei 280 nm

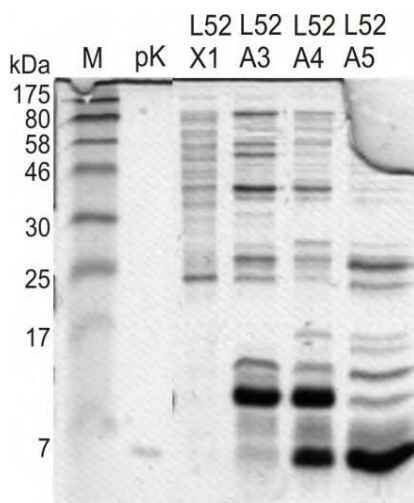


Abb. 38: SDS-Gel mit den FPLC-Fractionen einer Kationenaustauschchromatographie, SP FF 1 ml-Säule, 10 µg Gesamtproteinmenge pro Probe; pK Positivkontrolle rhIL-8, L52 FPLC-Lauf, X1, A3-A5 Fraktionen

Die Fraktionen eines FPLC-Laufs mit einer Kationenaustauschersäule sind im SDS-Gel in Abb. 38 zu sehen. In der Durchflussfraktion X1 sind Banden mit hohen Molekulargewichten erkennbar. Auf Höhe der Positivkontrolle wurde im Durchfluss keine Bande detektiert, d.h. IL-8 war vollständig an den Kationenaustauscher gebunden. In den Fraktionen A3 und A4 ist eine signifikante Bande bei ca. 14 kDa zu sehen. Diese Bande entspricht dem Lysozym, das mit einem pI von 9 bei pH 7,0 ebenfalls positiv geladen war. In den Fraktionen A4 und A5 lag jeweils eine Bande mit einem Molekulargewicht von 8,4 kDa auf gleicher Höhe mit der Positivkontrolle. Die starke Bande des Lysozyms und die Bande von rhIL-8 waren in Fraktion A4 gut erkennbar. Diese Fraktion beinhaltete die Überschneidung der beiden Peaks, von denen der erste das Lysozym und letzterer das rekombinante Interleukin-8 enthielt. Interleukin-8 bindet bei pH 7,0 stärker an den Kationenaustauscher als Lysozym und wurde deshalb bei einer höheren Salzkonzentration von der Säule eluiert. Weitere Proteinbanden wurden in den IL-8 haltigen Fraktionen detektiert.

Die entsprechenden Massenspektren der gesammelten FPLC-Fraktionen vom Test an der SP FF 1 ml-Säule, mit einem aufgetragenen Zellysätüberstand, sind in Abb. 39 dargestellt. In Abbildung A sind mehrere Proteinmassen zu erkennen, die den positiv geladenen *E. coli*-Proteinen entsprachen und an der SP FF-Säule gebunden hatten. Die Masse 8380 Da von rhIL-8 wurde ebenfalls detektiert. Auffällig waren die zwei Peaks mit den Massen 14286 und 14293 Da in Abb. 39 A und B, die dem in der Zellyse eingesetzten einfach geladenen Lysozym entsprechen. Die Peaks mit den Massen 7146 und 7151 Da $[M+2H]^{2+}$ entsprechen dem zweifach geladenen Lysozym. In Abb. 39 C wurde keine Masse detektiert, die dem Lysozym entspricht. Außerdem fiel auf, dass die Peaks mit der Masse des einfach geladenen Interleukin-8 bei 8382 Da in den Bildern B und C ein Signal mit 100% Intensität zeigten. Die Massen 4188 und 4190 Da entsprechen dem zweifach geladenen Chemokin. In der letzten Fraktion waren keine anderen Proteine als IL-8 detektiert worden, obwohl im SDS-Gel weitere Banden zu sehen sind. Hier zeigte sich die Relevanz der Verwendung von zwei Nachweismethoden. Proteine mit ähnlichen Massen können im SDS-Gel nicht unterschieden werden und einige Proteine werden im Massenspektrum nicht sichtbar aufgrund ihrer Flugunfähigkeit oder einer Masse, die außerhalb des Messbereichs liegt.

Wie bei der SDS-PAGE (Abb. 38) wurde im Massenspektrum in Abb. 39 B die Überlappung der Peaks von Lysozym und rhIL-8 in der Fraktion A4 im Chromatogramm bestätigt, wobei die Masse von rIL-8 bei 8382 Da mit einer Intensität von 100% und die Masse von Lysozym bei ca.12% detektiert wurden (Abb. 39 B). Wenn die IL-8-haltigen Fraktionen der CIEX gepoolt wurden, enthielten sie dementsprechend neben Interleukin-8 auch Verunreinigungen von Lysozym und *E. coli*-Proteinen. Dieser Nachweis zeigte, dass ein einzelner Kationenaustauschchromatographieschritt nicht ausreichend für die Reinigung des Chemokins war.

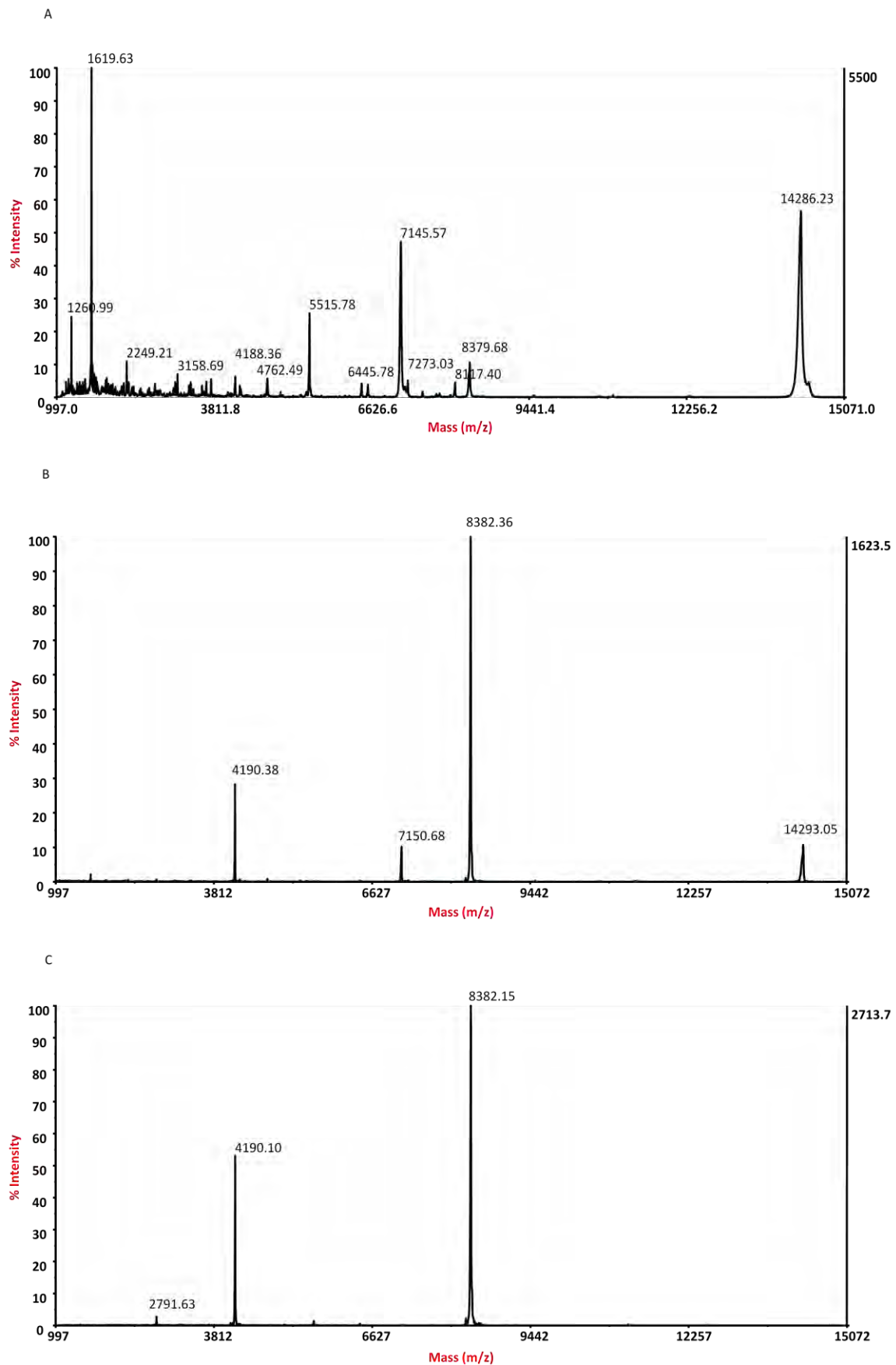


Abb. 39: Massenspektren der FPLC-Fractionen von dem Test an der Kationenaustauschersäule, bei dem 7 ml eines Zelllysatsüberstands injiziert wurden. A Fraktion A3, B Fraktion A4, C Fraktion A5 vom Lauf 52

5.2.3.2 Kombinierte Chromatographiemethoden

Von den Ergebnissen der vorangegangenen Tests wurde gefolgert, dass für die Reinigung der rekombinanten Chemokine kombinierte Chromatographieschritte erforderlich waren. Die Chromatogramme in Abb. 34 und Abb. 37 hatten gezeigt, dass das Chemokin stärker an die Heparinsäule als an die SP FF-Säule bindet und daher für die Elution eine höhere Salzkonzentration benötigt wurde. Um eine Entsalzung nach dem ersten Chromatographieschritt zu vermeiden, mussten die vereinigten IL-8-haltigen Fraktionen einen geringeren Salzgehalt vorweisen als für die Elution im zweiten Schritt verwendet wird. Darum wurden zuerst eine Kationenaustauschchromatographie und anschließend die Affinitätschromatographie durchgeführt. Hierfür wurde ein Puffer gewählt, der für beide Chromatographiemethoden geeignet ist, um eine Dialyse und Umpufferung zu vermeiden.

Die Tests zur Reinigung des Interleukin-8 ohne His-tag durch Kombination verschiedener Chromatographiemethoden wurden mit 20 ml Zellysätüberstand von BL21 DE3 RIL pET22bIL-8 eines 800 ml Expressionsansatzes durchgeführt. Das Chromatogramm der ersten Methode mit der Kationenaustauschsäule zeigt Abb. 40. Die SP FF-Säule wurde mit Puffer A2, der dem Puffer des Zellysätüberstands entsprach, äquilibriert. Nach der Injektion von 20 ml Zellysätüberstand wurde die Säule mit Puffer A2 gewaschen und die Elution der Proteine erfolgte bei einem Salzgradienten von 0-30% mit Puffer B2 (80-656 mM NaCl). Während des Gradienten wurden zwei Peaks nach 80,7 min und 96,6 min detektiert. Das rekombinante IL-8 wurde zwischen 330-425 mM NaCl eluiert.

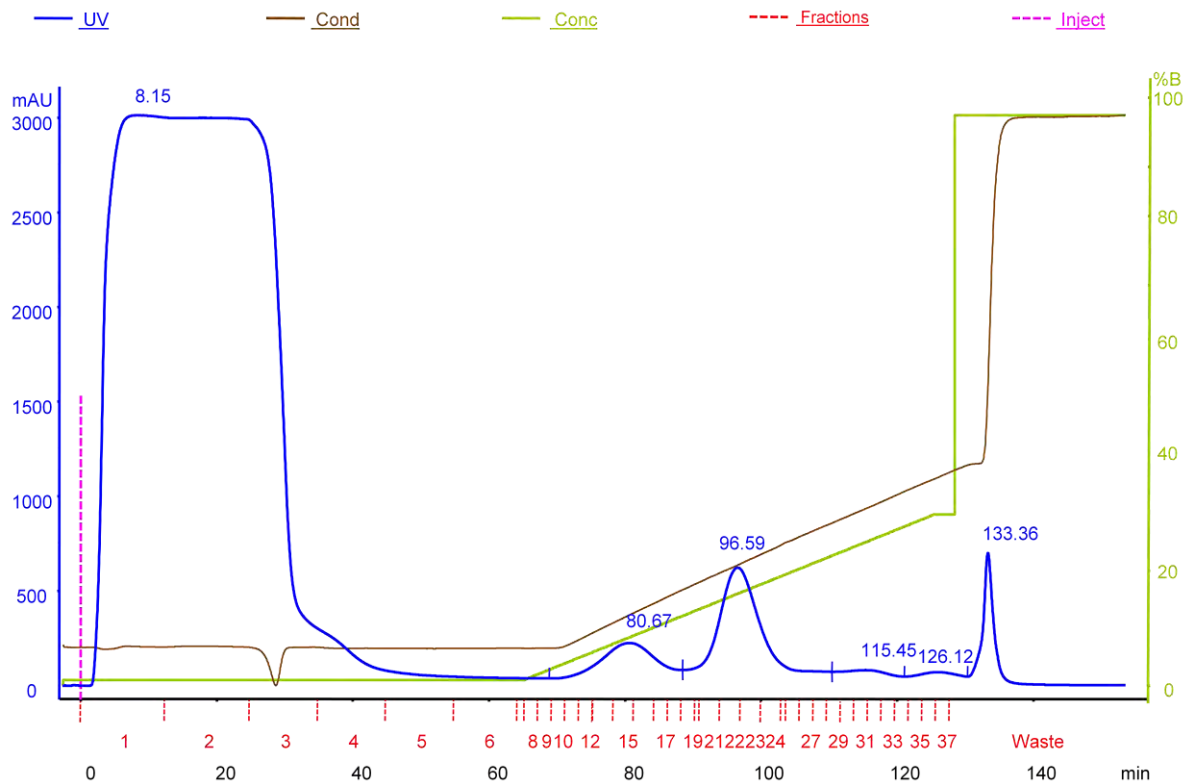
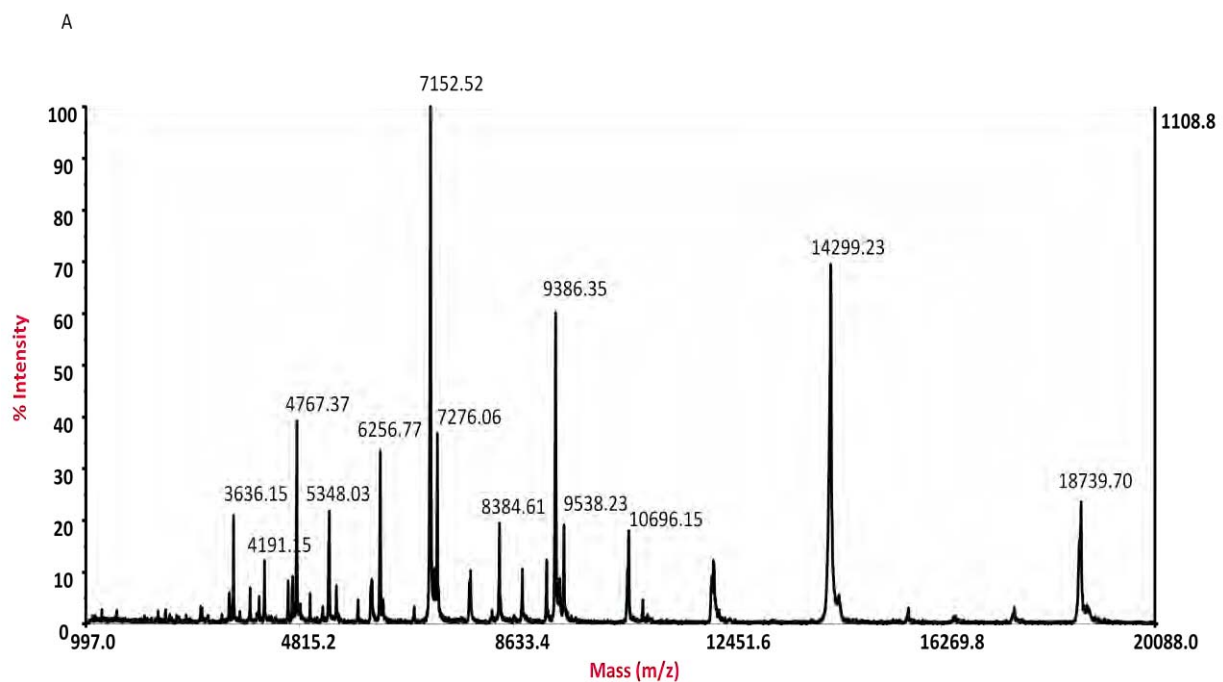


Abb. 40: Chromatogramm einer Kationenaustauschchromatographie, SP FF 1 ml-Säule, 20 ml Zellysätüberstand von BL21 DE3 RIL pET22bIL-8, Puffer A2 und B2, blau: Detektion bei 280 nm

Vom ersten Chromatographieschritt wurden die Fraktionen gesammelt und mit MALDI-MS überprüft, bevor sie vereinigt und für den nächsten Schritt eingesetzt wurden. In Abb. 41 A und B sind die Massenspektren von zwei Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie dargestellt. In der Fraktion, mit den Proteinen des ersten Peaks im NaCl-Gradienten wurden verschiedene Massen von *E. coli*-Proteinen, sowie die Massenisotope des einfach und zweifach geladenen IL-8 mit 8385 und 4191 Da mit Intensitäten von 20% und 15% und die Massen des einfach und zweifach geladenen Lysozyms mit 14299 und 7152 Da mit Intensitäten von 70% und 40% detektiert (Abb. 41 A). Das heißt, diese Fraktion enthielt sowohl das eluierte Lysozym als auch teilweise eluiertes rhIL-8.

Das Massenspektrum (Abb. 41 B) des zweiten Elutionspeaks der CIEX zeigte drei Peaks mit Massen bei 8384, 4189 und 2792 Da, die den einfach, zweifach und dreifach geladenen Interleukin-8 entsprachen. Die Detektion weiterer Proteinmassen von 4763, 6410 und 9538 Da im Vergleich zum Spektrum des kommerziellen rhIL-8 in Abb. 41 C zeigte, dass das rekombinante Protein nicht optimal gereinigt vorlag, da einige *E.coli*-Proteine ebenfalls eine starke Bindung mit der SP FF-Säule eingegangen waren.



5. Ergebnisse

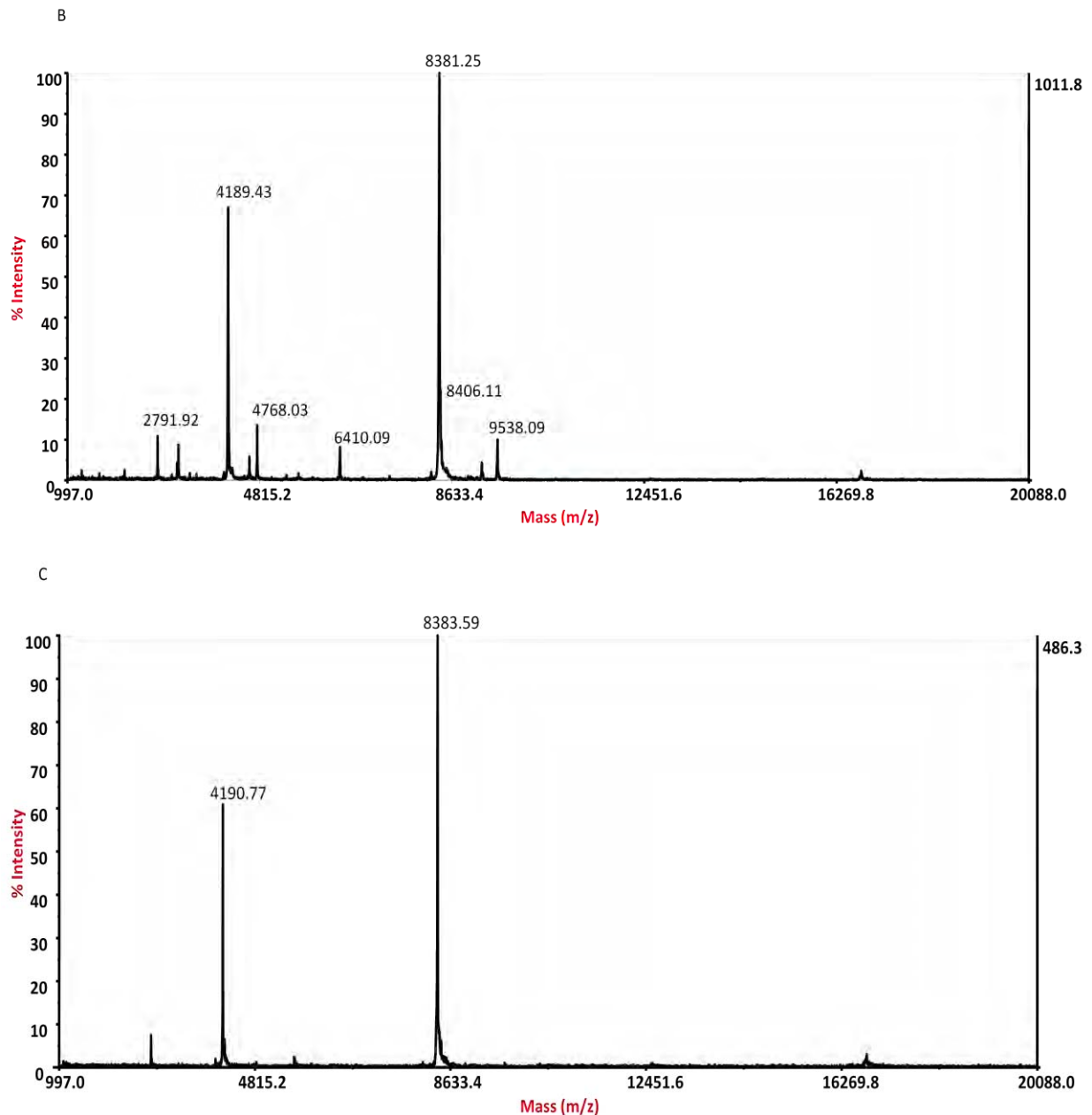


Abb. 41: Massenspektren von FPLC-Fractionen der Kationenaustauschchromatographie nach Auftragung von 20 ml Zelllysatsübertand, A: Fraktion F16 mit Proteinen des ersten detektierten Elutionspeak im NaCl-Gradienten, B: Fraktion 21 mit Proteinen des zweiten Peaks während des NaCl-Gradienten, C: Positivkontrolle kommerzielles rhIL-8

Die IL-8-haltigen Fraktionen wurden vereinigt und 1:2 mit Puffer A2 verdünnt und damit die Salzkonzentration auf 230 mM gesenkt. Die Absenkung der Salzkonzentration ist wichtig, weil die Elution im zweiten Chromatographieschritt ebenfalls mit NaCl erfolgt und eine zu hohe Anfangskonzentration die Bindung des Chemokins an der Säule verhindern würde.

Die HiTrap 1 ml Heparinsäule wurde dementsprechend mit einem Puffergemisch von A2 und B2 äquilibriert, das eine etwas niedrigere Salzkonzentration enthielt als die vereinten mit Puffer A2 verdünnten Fraktionen der CIEX (≤ 230 mM, hier 214 mM NaCl). Dadurch wurde die Bindung von IL-8 ans Säulenmaterial gewährleistet.

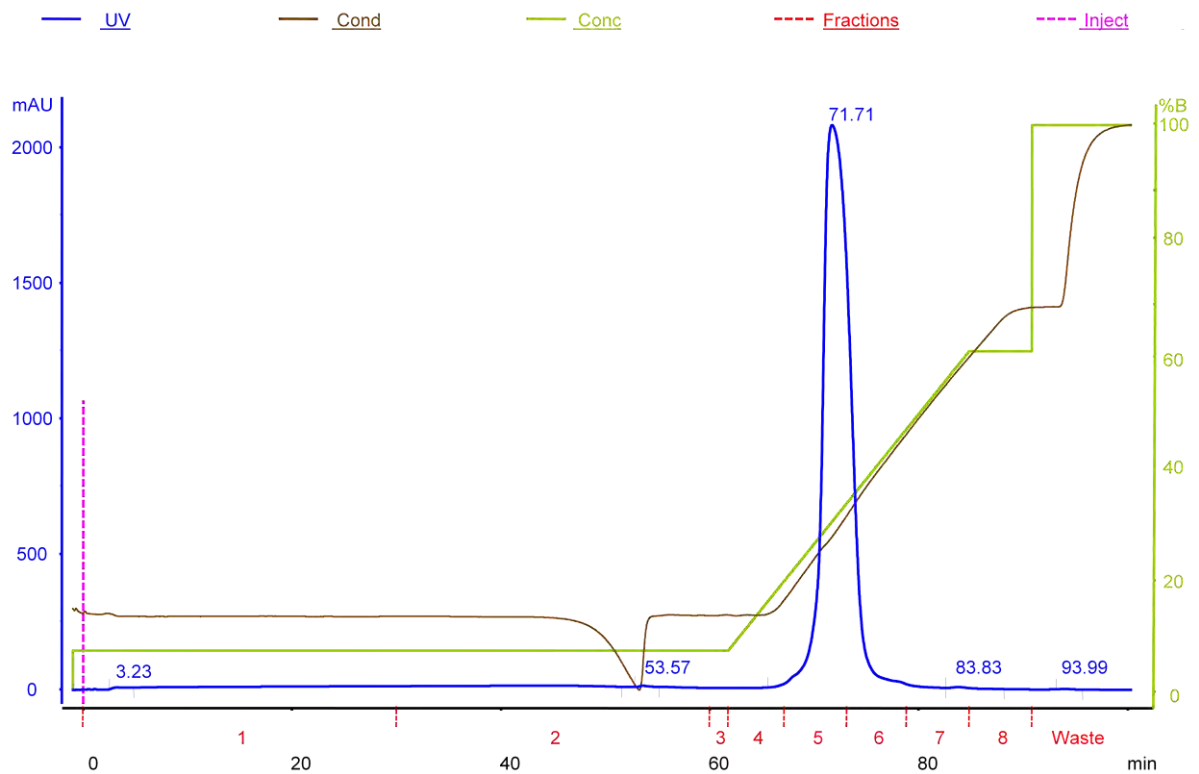


Abb. 42: Chromatogramm der Affinitätschromatographie an der Heparinsäule mit 26 ml der vereinten mit Puffer A2 verdünnten IL-8-haltigen Fraktionen vom Kationenaustauscher, Puffer A2 und B2; blau: Detektion bei 280 nm

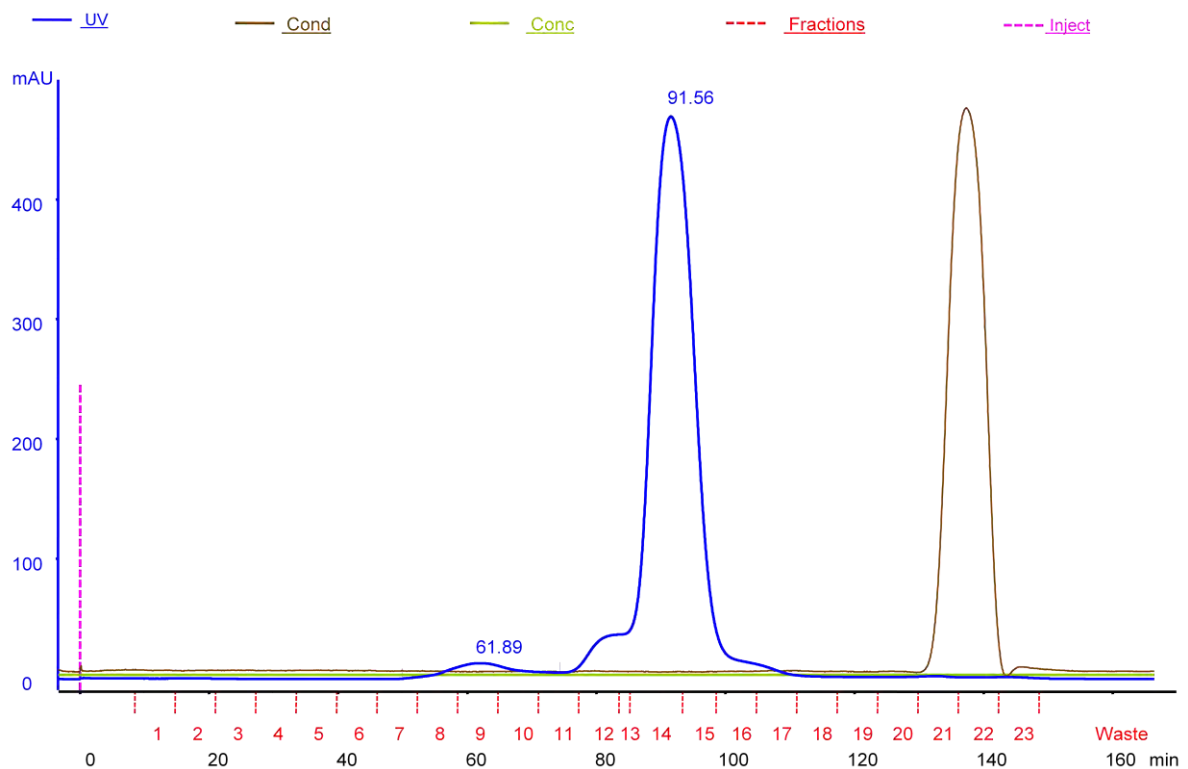


Abb. 43: Chromatogramm der Gelfiltration mit 6 ml der gepoolten IL-8-haltigen Fraktionen von der Heparinsäule, Puffer A2 und B2

In Abb. 42 ist das Chromatogramm des zweiten Reinigungsschrittes dargestellt. In der Durchflussfraktion F1+2 wurde ein flacher Peak beobachtet, der Proteine enthielt, die nicht an das Heparin gebunden hatten. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem Salzgradienten von 214-1232 mM (7-60%B). Das rekombinante IL-8 wurde bei einer Flussrate von 0,5 ml/min nach 71,7 min zwischen 464 mM und 848 mM NaCl eluiert und in den Fraktionen F5 und F6 gesammelt.

Um die letzten Verunreinigungen (Abb. 44 A) zu entfernen und das Chemokin in einen Puffer zu überführen, der für die direkte Anwendung in Bioassays eingesetzt werden kann, wurde als letzter Chromatographieschritt eine Gelfiltration durchgeführt, bei der die Einstellung der Salzkonzentration auf annähernd physiologische Werte erfolgte. Hierfür wurde eine Superdex 75 prep grade-Säule mit einer Salzkonzentration von 138 mM (3%B) mit Puffer A2 und B2 äquilibriert. Nach dem Auftragen der vereinigten Fraktionen der Affinitätschromatographie wurde das rekombinante IL-8 bei einer Flussrate von 0,8 ml/min mit 1,2 CV mit 3% Puffer B2 nach 91,6 min eluiert und bei 280 nm mit ca. 460 mAU detektiert. (Abb. 43) Der Überschuss an Salz, über die Leitfähigkeit (braune Linie) gemessen, eluierte nach ungefähr 130 min. Der detektierte Peak nach 61,9 min zeigte die Elution weiterer Proteine, die im zweiten Chromatographieschritt nicht entfernt worden waren.

Abb. 44 A zeigt das Massenspektrum einer Fraktion von der Affinitätschromatographie mittels Heparinsäule. Die Peaks mit den Werten 8383, 4191 und 2792 Da entsprechen den Massenisotopen des einfach, zweifach und dreifach geladenen Interleukin-8. Der Peak mit dem Wert 16759 Da stammt von dem einfach geladenen Dimer des Chemokins. Alle anderen detektierten Massen wiesen auf *E. coli*-Proteine hin, die ebenfalls an Heparin binden konnten. Im Gegensatz dazu wurden im Massenspektrum von einer Fraktion der Endreinigung mittels Gelfiltration in Abb. 44 B keine zusätzlichen Massen als die der einfach, zweifach und dreifach geladenen Varianten des rekombinanten Interleukin-8 detektiert. Die Analyse mit SDS-PAGE (Abb. 45) und Massenspektrometrie (Abb. 44 B) belegen die hohe Reinheit des gereinigten rhIL-8.

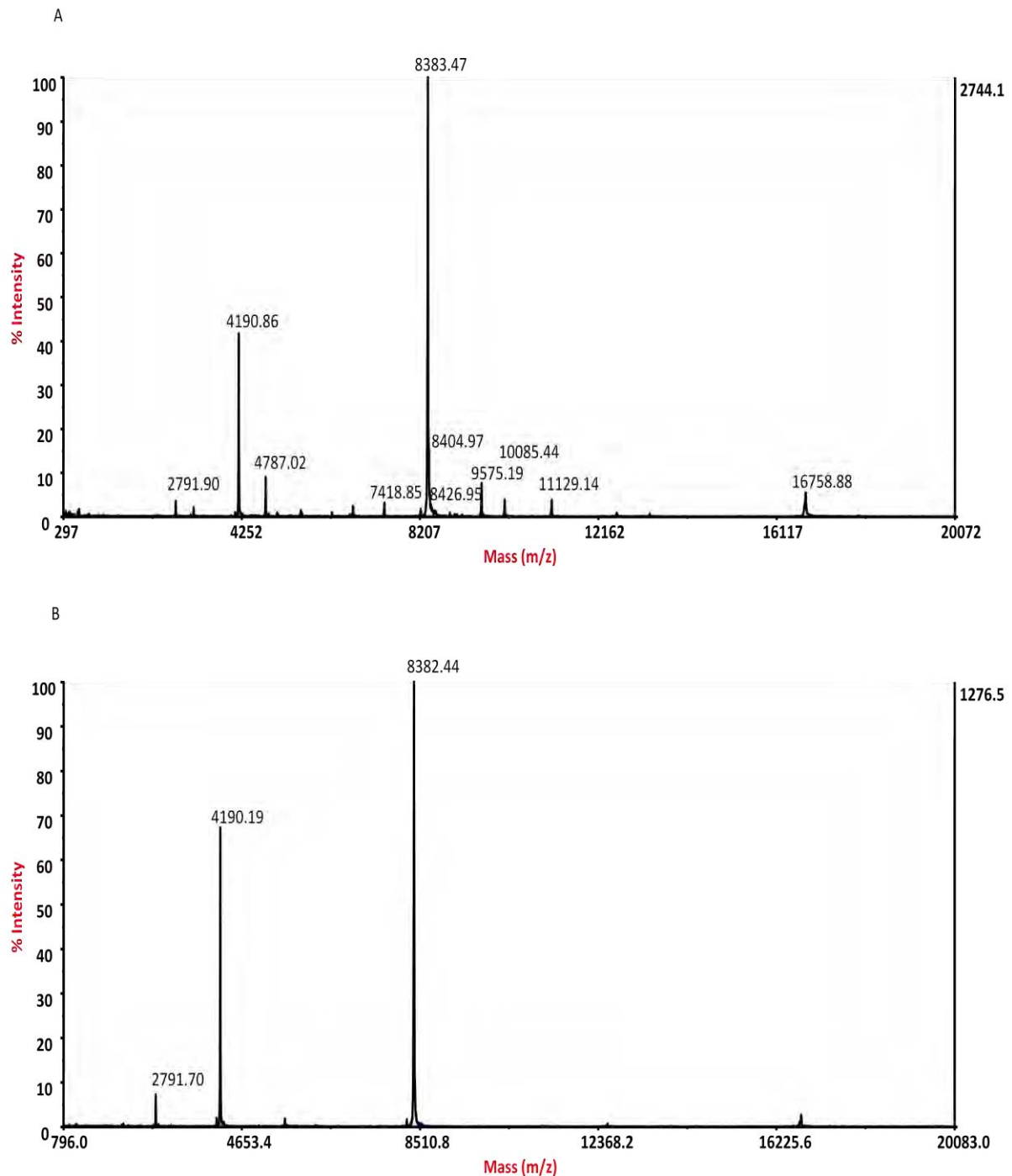


Abb. 44: Massenspektren zur Reinheitskontrolle der IL-8 haltigen FPLC-Fractionen; A: Fraktion vom zweiten Reinigungsschritt mit einer Heparinsäule, B: Fraktion vom Endreinigungsschritt durch Gelfiltration

Die Fraktionen F14 und F15 der Gelfiltration, die das gereinigte Chemokin enthielten, wurden vereinigt, mit der MALDI-MS überprüft und die Proteinkonzentration bestimmt. Als Gesamtproteinmenge wurden 10,6 mg gereinigtes rhIL-8 mittels BCA-Test ermittelt. Umgerechnet entsprach das einer Ausbeute von 13,2 mg/l Expressionsansatz.

Damit das gereinigte rhIL-8 in Bindungsstudien eingesetzt werden konnte, wurden die Fraktionen konzentriert. Nach dem Lyophilisieren und dem Lösen in 2 ml Wasser wurde die Probe

5. Ergebnisse

mit einer HiTrap Desalting-Säule entsalzt. Am Ende lag eine Proteinkonzentration von 2,0 mg/ml vor und insgesamt standen 8,12 mg rhIL-8 zur Verfügung. Um einen Verlust des gereinigten Proteins zu vermeiden, wurde die Aufkonzentrierung nur durchgeführt, wenn eine höhere Konzentration des Chemokins benötigt wurde.

Den gesamten Ablauf von der Expression bis zur Endreinigung von rhIL-8 zeigt das SDS-Gel in Abb. 45. Als Positivkontrolle (pK) wurde das kommerzielle rhIL-8 aufgetragen. Es wurden die Nullprobe, die Probe nach 2 h Expression bei 30°C, das Pellet und der Überstand des Zellysats sowie alle IL-8-haltigen Fraktionen der Chromatographieschritte aufgetragen. Beim Vergleich der Null- und 2 h-Probe ist eine deutliche Expressionsbande zu sehen. Nach der Zellyse enthielt das Pellet das unlösliche pelB-IL-8 mit einer Größe von 10,5 kDa sowie einen Teil des nativen IL-8 als Bande darunter zu sehen. Der Zellysatüberstand enthielt das lösliche native Interleukin-8 mit einer Größe von 8,4 kDa. Diese Bande ist bei allen vereinigten Fraktionen der drei Chromatographieschritte und nach der Entsalzung deutlich sichtbar. Die Abnahme anderer Proteinbanden von Reinigungsschritt 1-3 und der Entsalzung ist ebenfalls zu erkennen. Sogar die geringfügige Verunreinigung nach der Gelfiltration war nach der Entsalzung zusätzlich entfernt worden.

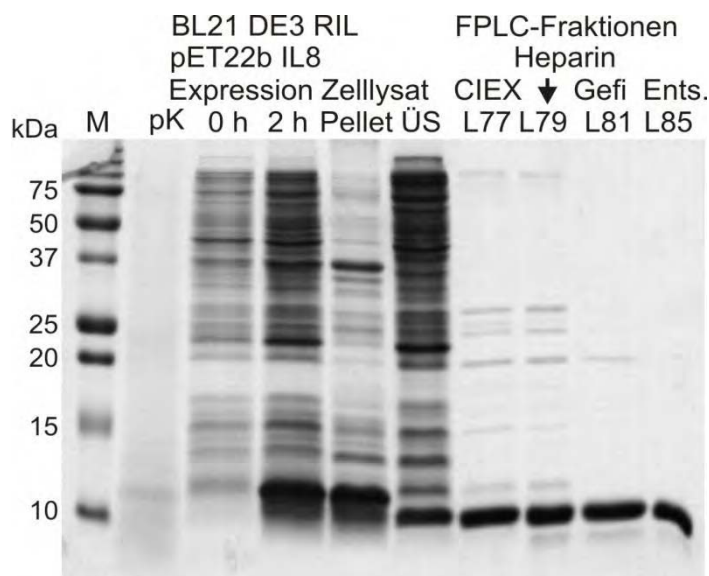


Abb. 45: SDS-Gel mit Proben der Expression, Zellyse und Reinigung von rekombinantem IL-8 ohne His-tag aus BL21 DE3 RIL pET22bIL-8, pK Positivkontrolle rhIL-8 (Genscript)

Die Reinigung des löslichen Interleukin-8 ohne His-tag wurde mit dieser Methode erfolgreich und reproduzierbar durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist die Verwendung eines einzigen Puffersystems für alle drei Chromatographieverfahren, so dass keine zeitaufwändigen Dialyse- und Pufferaustauschschritte nötig waren. Außerdem wurden keine organischen Lösungsmittel verwendet und das gereinigte rekombinante Chemokin lag direkt anwendbar für Bioassays in einem PBS-ähnlichen Puffer vor. Als Mittelwert wurden $5,91 \text{ mg} \pm 3,74$ rhIL-8 pro Liter Expressionsansatz ($n=5$) mit BL21 DE3 RIL pET22bIL-8 berechnet. Mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Reinigungsmethode wurde außerdem eine Ausbeute von 7,93 mg pro Liter Expressionsansatz mit dem Bakterienstamm BL21 DE3 RIL pET28aIL-8o.H. erzielt. Die Schwankungen in der Ausbeute beruhten teilweise auf dem Alter der eingesetzten

Zellen, von dem die exprimierte Chemokinmenge abhängig war. Das Expressionslevel des gleichen rekombinanten Expressionsstammes war in verschiedenen Ansätzen unterschiedlich stark abhängig davon, ob die Expressionsansätze mit Übernachtskulturen frisch transformierter Zellen, Übernachtskulturen eines Glycerolstocks oder Übernachtskulturen einer älteren im Kühlschrank gelagerten ÜNK angesetzt worden waren. Andererseits beruhten die Schwankungen in der Ausbeute auf dem Verlust während der Fraktionierung und dem Umfüllen der Fraktionen (poolen) sowie der Injektion bei der Chromatographie.

5.2.3.3 Reinigung von rekombinanten Chemokinen mit His-tag

Bei der Expression der Chemokine mit Hilfe des Vektors pET28a wurde an den N-Terminus ein His-tag gefolgt von einer TEV-Proteaseschnittstelle angehängt. Dieser Anhang wurde dann gezielt für die Reinigung über eine Nickel-Sepharose-Säule genutzt. Nach dem Entfernen des His-tags mit Hilfe der TEV-Protease wurde als Endreinigung eine Gelfiltration durchgeführt. Von den zwei Chromatographieschritten wurden die Fraktionen gesammelt und am Massenspektrometer analysiert.

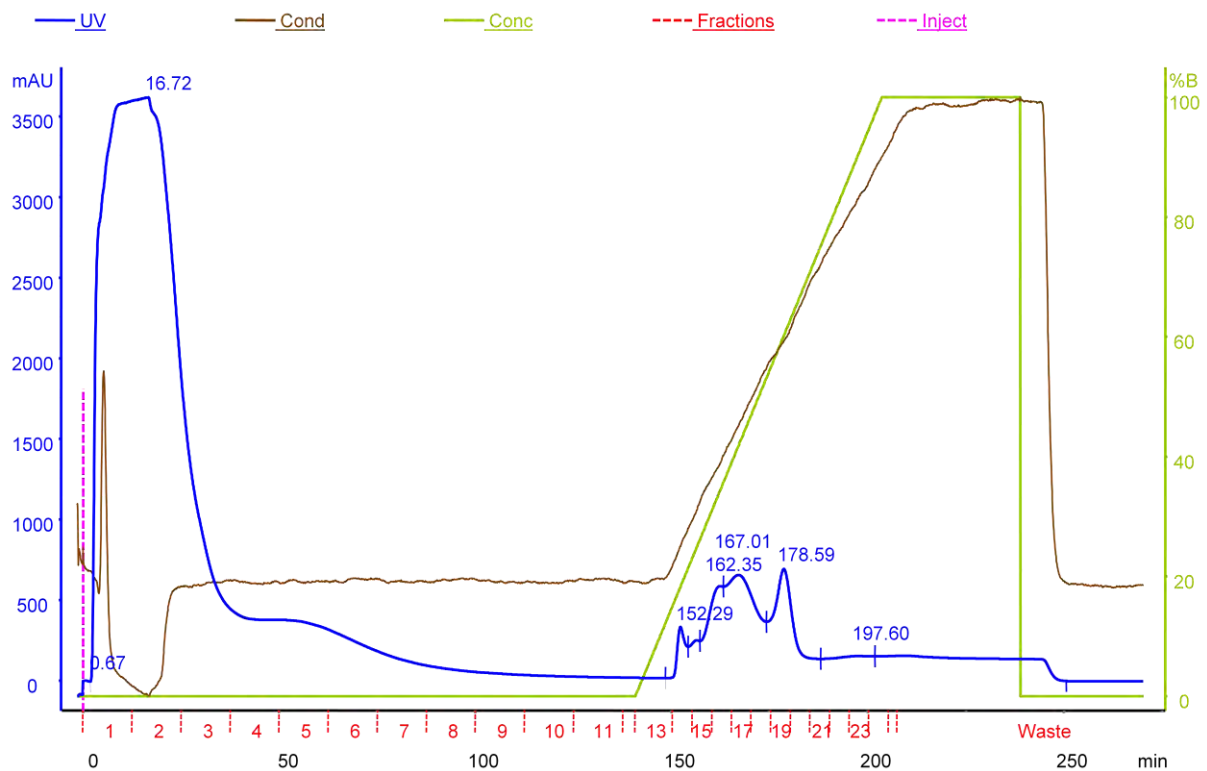


Abb. 46: Chromatogramm der Affinitätschromatographie mit einer HisTrap 5 ml-Säule von 12,5 ml Probenvolumen eines Ansatzes mit BL21 DE3 RIL pET28aIL-8; Puffer A3: 40 mM Tris, 300 mM NaCl, 15 mM Imidazol pH 8,0, Puffer B3: 40 mM Tris, 300 mM NaCl, 800 mM Imidazol pH 8,0

Für die Reinigung von Interleukin-8 mit His-Tag wurde zuerst eine HisTrap FF 1 ml-Säule verwendet. Die Affinitätssäule wurde mit 40 mM Tris, 300 mM NaCl und 15 mM Imidazol pH 8,0 (Puffer A3) äquilibriert. Der gleiche Puffer wurde auch bei der Zellyse verwendet. Die eingesetzten Salz- und Imidazolkonzentrationen entsprachen den Angaben des Säulenherstellers und sollten die unspezifischen Bindungen der *E. coli*-Proteine an der Säulenmatrix

5. Ergebnisse

reduzieren. Nach der Injektion und dem Waschen der Säule wurden während des Imidazolgradienten mehrere Peaks bei 280 nm detektiert. HisIL-8 wurde zwischen 40-65% von Puffer B3 detektiert und in den Fraktionen F19 und 20 gesammelt (Abb. 46). Die Detektion weiterer Peaks während des Imidazolgradienten zeigte, dass mehrere *E. coli*-Proteine an die Säule gebunden hatten.

Das Massenspektrum der HisIL-8-haltigen Fraktion von der Nickelsäule zeigt einen verbreiterten Proteinpeak des Proteins (Abb. 47). Mit dem Programm ProteinCalculator v3.3 wurde mit Hilfe der Aminosäuresequenz ein Molekulargewicht von 11336 kDa ermittelt. Je größer ein Protein ist, desto mehr mögliche Massenisotope sowie verschiedene Addukte mit Natrium und Nickelionen existieren. Im Massenspektrum wurde eine Masse von 11344 Da detektiert, die annähernd dem einfach geladenen HisIL-8 entsprach. Zudem wurde ersichtlich, dass das rekombinante Chemokin nach der Elution von der Affinitätssäule noch einige Verunreinigungen enthielt.

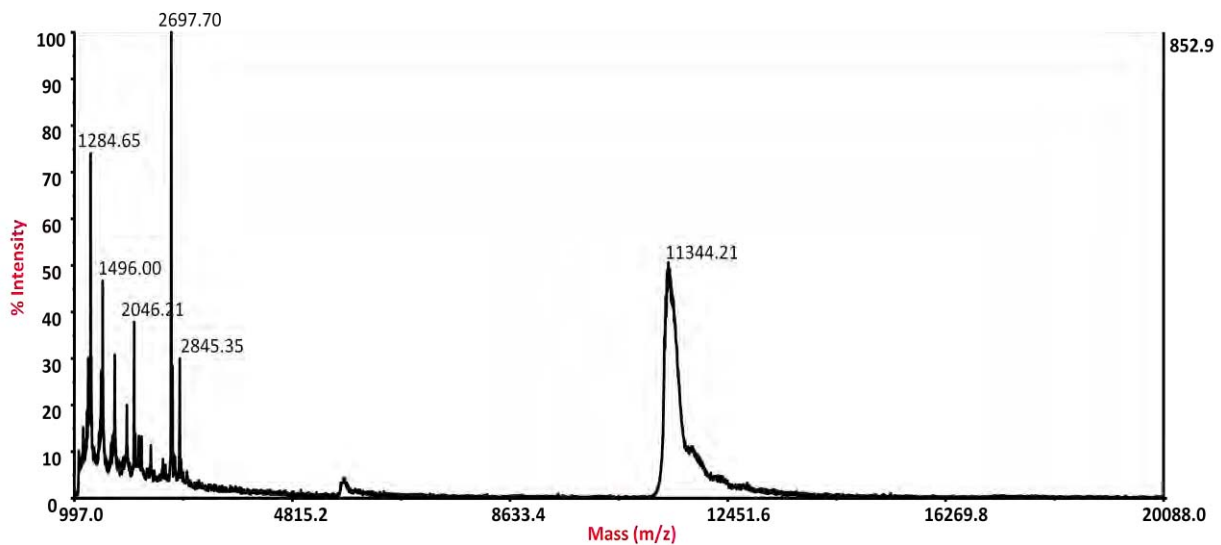


Abb. 47: Massenspektrum einer FPLC-Fraktion von der Reinigung des rhIL-8 mit His-tag mittels einer Nickelsäule

Die Fraktionen, die das HisIL-8 enthielten, wurden vereint, lyophilisiert und vor der Abspaltung des His-tags entsalzt, da die TEV-Proteaseaktivität von hohen Imidazol- und Salzkonzentrationen gehemmt wird.

Die TEV-Protease ist ein Enzym, das eine spezifische Aminosäuresequenz erkennt und zwischen den Aminosäureresten Q/G oder S schneidet. Damit wurde der His-tag so entfernt, dass das Interleukin-8 mit dem korrekten N-Terminus (NH₂-SAKEL...) vorlag (Abb. 48).

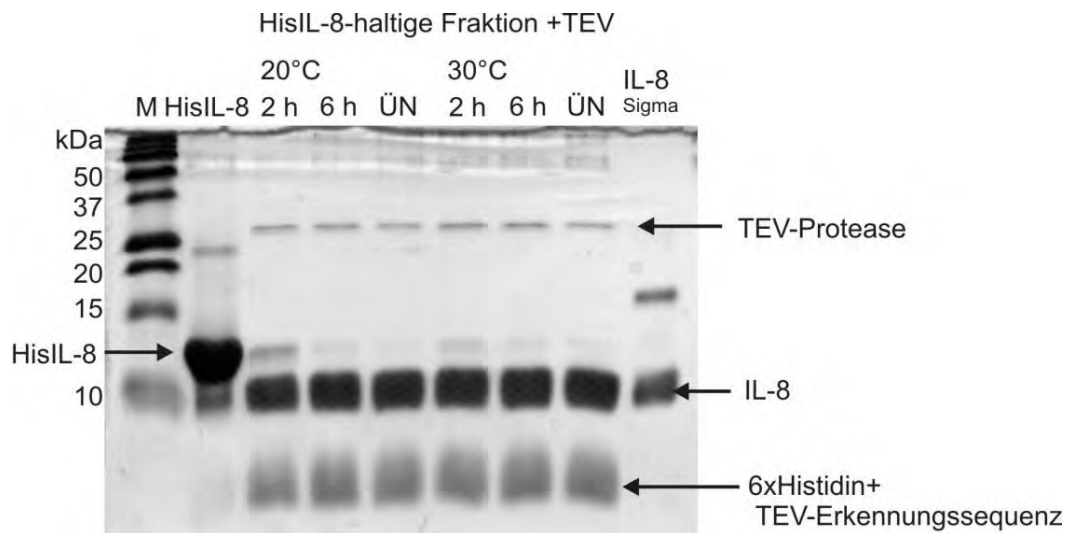


Abb. 48: SDS-Gel mit den Proben des TEV-Proteaseansatzes; HisIL-8-haltige entsalzte Fraktion, Positivkontrolle: kommerzielles IL-8 (Sigma)

Auf dem SDS-Gel in Abb. 48 wurden die Proben des TEV-Proteaseansatzes aufgetragen. Ein Teil der entsalzten Fraktion mit HisIL-8 ist neben dem Proteinmarker dargestellt. Die gleiche Fraktion wurde nach der Zugabe der TEV-Protease (Invitrogen) in zwei Ansätzen bei 20°C und 30°C über Nacht inkubiert. Davon wurden jeweils nach 2 h, 6 h und am nächsten Morgen Proben entnommen, die im Gel aufgetrennt zu sehen sind. Die Probe ohne TEV-Protease zeigt eine starke Bande bei 11,3 kDa, die der berechneten Masse des HisIL-8 entspricht. Bei den Proben der beiden TEV-Proteaseansätze sind die Banden der TEV-Protease mit einer Größe von 27 kDa sowie die signifikanten Banden des IL-8 mit einer Größe von 8,4 kDa zu erkennen. Außerdem sind die Reste des ungeschnittenen Proteins als schwache Bande mit einer Größe von 11,3 kDa und der abgetrennte Anhang mit einer Größe von ca. 3 kDa zu sehen. Deutlich wurde ebenfalls, dass der größte Teil des HisIL-8 innerhalb der ersten 2 h bei beiden Temperaturen geschnitten worden war. Damit wurde die Effektivität der Protease gezeigt, so dass die Inkubationszeit bei weiteren Ansätzen auf 2-3 h gekürzt werden konnte.

Um die Protease und den abgetrennten His-tag zu entfernen, wurde der TEV-Proteaseansatz über eine Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Dafür wurde eine Superdex 75 prep grade-Säule mit 40 mM Tris, 140 mM NaCl pH 8,0 äquilibriert. Nach der Injektion der Probe wurden die Proteine mit einer Flussrate von 0,8 ml/min mit 1,2 CV isokratisch mit 9,3%B (140 mM NaCl) eluiert (Abb. 49). Das rekombinante IL-8 wurde nach 91,3 min und der abgetrennte His-tag mit TEV-Erkennungsstelle nach 128,1 min bei 280 nm detektiert. Der kleine Elutionspeak nach 53,1 min enthielt die TEV-Protease, die mit einem Molekulargewicht von 27 kDa größer als das Chemokine ist und daher vor IL-8 eluiert wurde. Mit diesem Chromatographieschritt war eine gute Trennung des Zielproteins von den restlichen Verunreinigungen möglich.

5. Ergebnisse

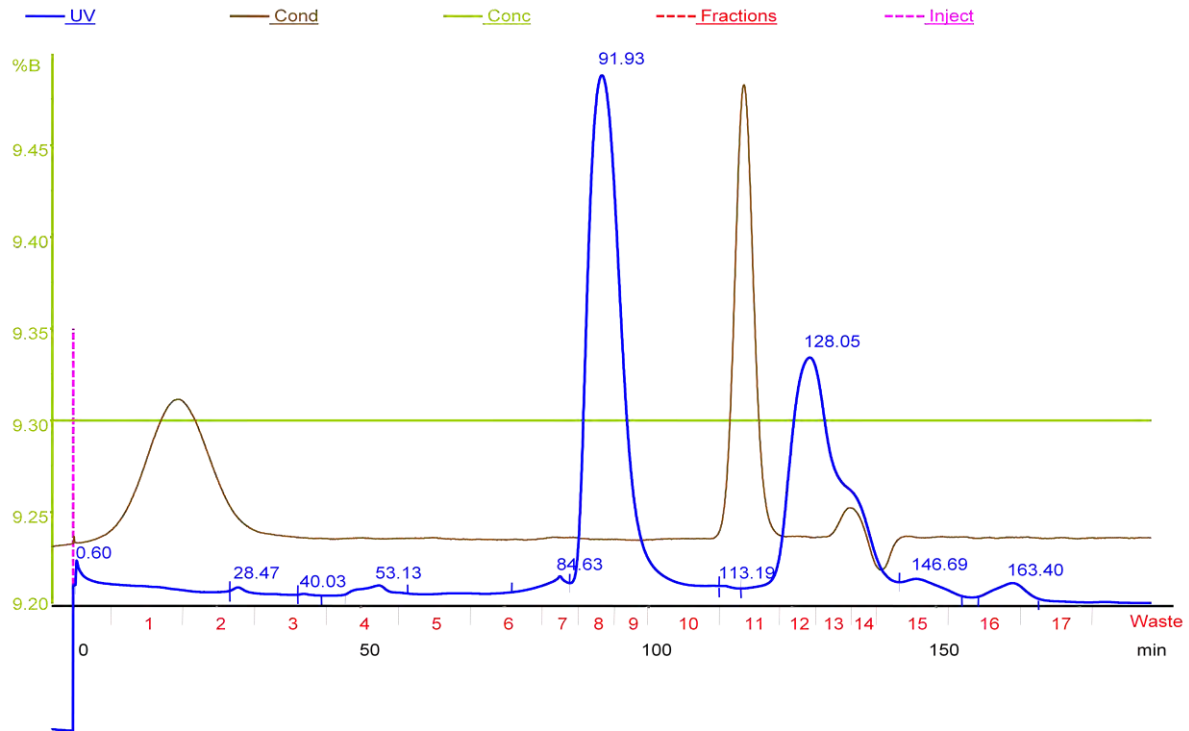


Abb. 49: Chromatogramm der Gelfiltration nach der Entfernung des His-tag im TEV-Proteaseansatz; Puffer A1 und B1 mit 1,5 M NaCl pH 8,0; blau: Detektion bei 280 nm

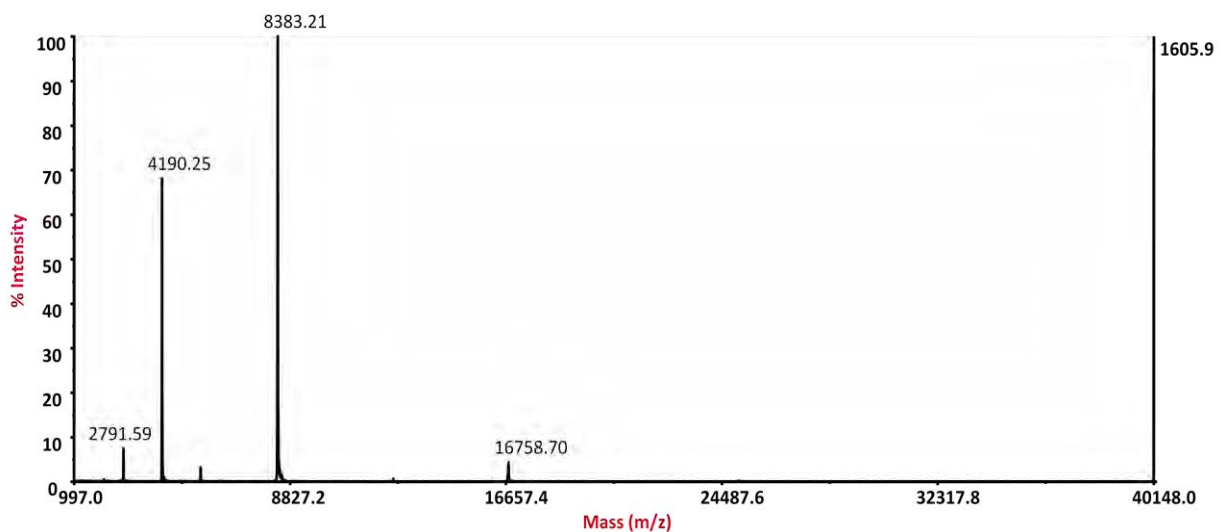


Abb. 50: Massenspektrum von der Reinigung von rhIL-8 mit His-tag, Massenspektrum einer Fraktion von der Gelfiltration nach dem TEV-Proteaserverdau

Das Massenspektrum der IL-8-Fraktion F8+9 von der Gelfiltration in Abb. 50 zeigt Peaks mit den Massen 8383, 4190 und 2792 Da, die den einfach, zweifach und dreifach geladenen rhIL-8 entsprechen. Das einfach geladene Dimer von IL-8 wurde ebenfalls mit einer Masse von 16759 Da detektiert. Das Massenspektrum der Fraktion von der Gelfiltration zeigt eine sehr hohe Reinheit des gereinigten Chemokins. Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch bei 280 nm am Nanodrop gemessen. Für die Fraktion F8 wurden 0,38 mg/ml und für

F9 0,26 mg/ml ermittelt. Das entsprach einer Gesamtausbeute von 3,9 mg/l Expressionsansatz.

Die SDS-Gele mit den Proben der Expressionsansätze von BL21 DE3 RIL pET28aSDF1 α enthielten eine signifikante Expressionsbande 4 h nach der Induktion. Für die Reinigung von HisSDF1 α wurden 800 ml Zellkultur angesetzt. Die Anwendung der optimierten Zellysemethode erwies keine hohe Ausbeute an HisSDF1 α , da das Protein als *inclusion bodies* vorlag. Das exprimierte His-getagte SDF1 α wurde deshalb durch Zugabe von 2 M Harnstoff und 3 mM GSH in den Zellysatüberstand überführt.

Zur Reinigung von rhSDF1 α mit His-tag wurde eine Nickelaffinitätssäule wie für HisIL-8 verwendet. Die Äquilibration der HisTrap 1 ml-Säule erfolgte mit Puffer A3 mit 2 M Harnstoff und 3 mM GSH. Während der Injektion der Probe kristallisierte jedoch der Harnstoff in der Probenschleife aus und konnte nur mittels Erwärmung der Probe und Puffer wieder gelöst werden. Möglicherweise war die Kombination von Harnstoff und Triton X-114 im Lysepuffer nicht optimal, da sich Harnstoff besser bei Wärme und das Detergenz besser in der Kälte löst. Die Rückfaltung des Proteins erfolgte mit Hilfe eines abfallenden Harnstoffgradienten über 240 CV an der Affinitätssäule, so dass das gebundene Protein im Puffer A3 ohne Harnstoff vorlag. Die Elution des rückgefalteten HisSDF1 α wurde mit einem Imidazolgradient von 0-100% mit Puffer B3 durchgeführt.

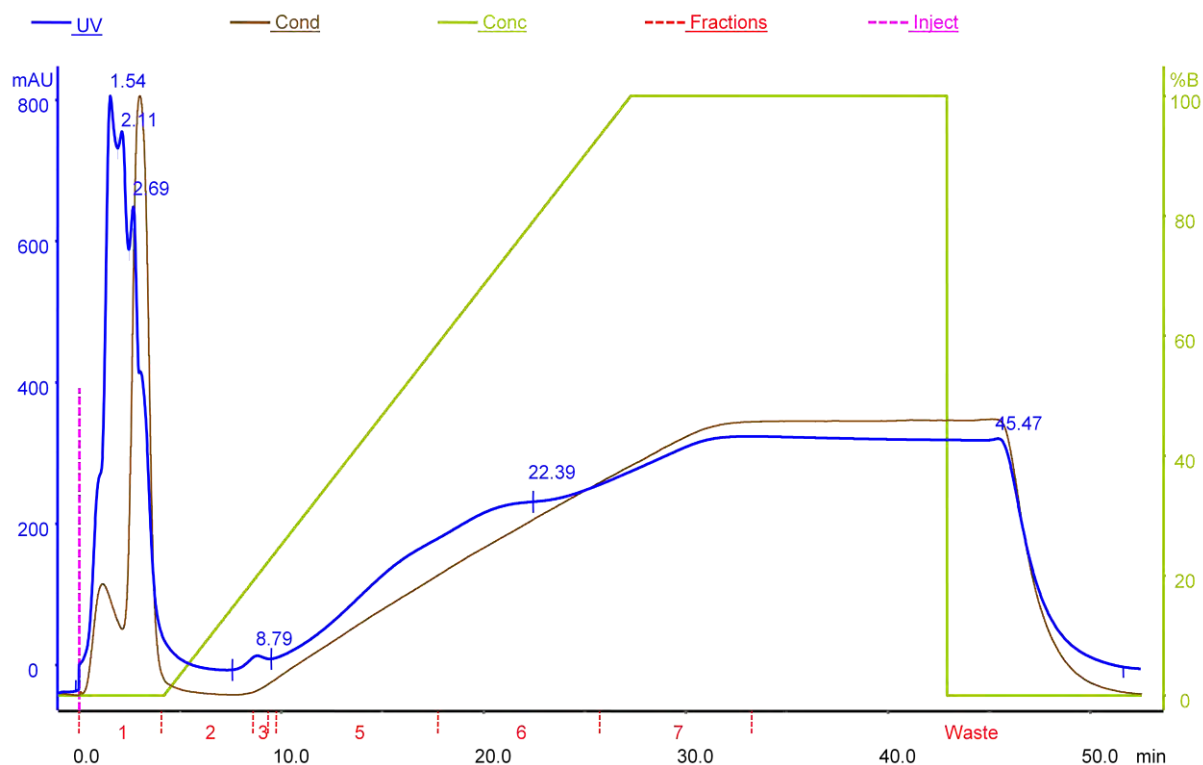


Abb. 51: Chromatogramm der Affinitätschromatographie mit einer HisTrap 1 ml-Säule mit 36 ml Probenvolumen eines Zellysatüberstandes von BL21 DE3 RIL pET28aSDF1 α ; Puffer A3 und B3

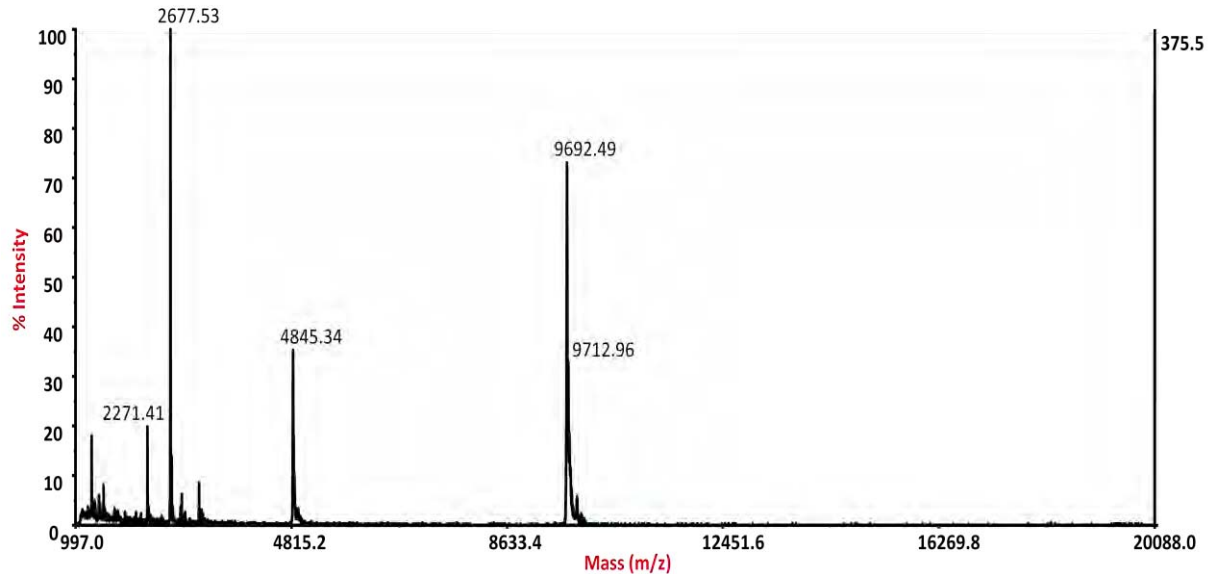


Abb. 52: Massenspektrum der FPLC-Fraktion von der HisTrap-Säule nach der Rückfaltung des HisSDF1 α vor Beginn des Imidazolgradienten

Abb. 51 zeigt das Chromatogramm der Affinitätschromatographie mit HisSDF1 α . Das Injektionsventil wurde nur kurz auf ‚inject‘ gestellt, um die Fraktionierung vor Beginn des Imidazolgradienten zu starten. Obwohl die Imidazolkonzentration bei 15 mM lag, wurden kurz vor dem Gradienten nach 1,5 bis 2,7 min Proteine von der Säule eluiert und in Fraktion F1 gesammelt. Während des Imidazolgradienten wurden keine eindeutigen Peaks detektiert, da das UV-Signal vermutlich aufgrund von Verunreinigungen des Imidazols stetig anstieg und bei 800 mM Imidazol einen Wert von über 300 mAU erreichte. Das Chemokin hatte entweder gar nicht oder schwach an der HisTrap-Säule gebunden, war vorher eluiert worden oder lag in zu geringen Mengen vor. Die Fraktion F1 wurde am MALDI-MS analysiert. Das berechnete Molekulargewicht des rekombinanten Chemokins lag bei 9695 Da.

Das in Abb. 52 dargestellte Massenspektrum von der FPLC-Fraktion, die vor Beginn des Imidazolgradienten aufgefangen wurde, zeigt das einfach und zweifach geladenen HisSDF1 α mit Massen bei 9692 und 4845 Da mit Intensitäten von 75% und 35%. Dies zeigt, dass das Chemokin sehr schwach am Säulenmaterial gebunden hatte und daher schon bei geringen Imidazolkonzentrationen eluiert wurde. Möglicherweise hatte die Rückfaltung des Proteins zu einer sterischen Hinderung bei der Bindung des His-tags an die Nickelionen geführt, so dass es leicht vom Imidazol verdrängt werden konnte.

5.2.4 CD-Spektroskopie zur Strukturanalyse von rhIL-8

Das gereinigte Interleukin-8 sollte in Bindungsstudien verwendet werden. Dafür musste die korrekte Struktur des Chemokins gewährleistet sein. Um die Sekundärstruktur des Proteins zu analysieren, wurde eine CD-Spektroskopie durchgeführt. Hierzu wurde das gereinigte rhIL-8 mittels Dialyse in 100 mM NaF überführt, da NaCl bei der Messung stört. Die Probe wurde nach einer 1:5 Verdünnung drei Mal von 190-250 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Algorithmus CDSSTR.

Das gemessene CD-Spektrum von IL-8 zeigte eine sehr gute Übereinstimmung mit dem mittels CDSSTR simulierten CD-Spektrum (Abb. 53). Die Anteile an Sekundärstrukturelementen, die aus der Proteindatenbank entnommen wurden, lagen für alpha-Helix bei 15,3%, beta-Faltblatt bei 20,8%, beta-Turn bei 9,7% und für ungeordnete Strukturen bei 54,2%. Aus der CDSSTR-Auswertung gingen folgende Werte für die Anteile der Strukturelemente hervor: alpha-Helix: 19 %, beta-Faltblatt: 23 %, beta-Turn: 17% und ungeordnete Strukturen: 40%. Die Werte und die sehr gute Übereinstimmung des Spektrums mit dem rekonstruierten Spektrum vom CDSSTR-Algorithmus belegen die korrekte Faltung des Chemokins.

Helix1	Helix2	Strand1	Strand2	Turns	Unordered	Total
0,12	0,07	0,14	0,09	0,17	0,4	0,99

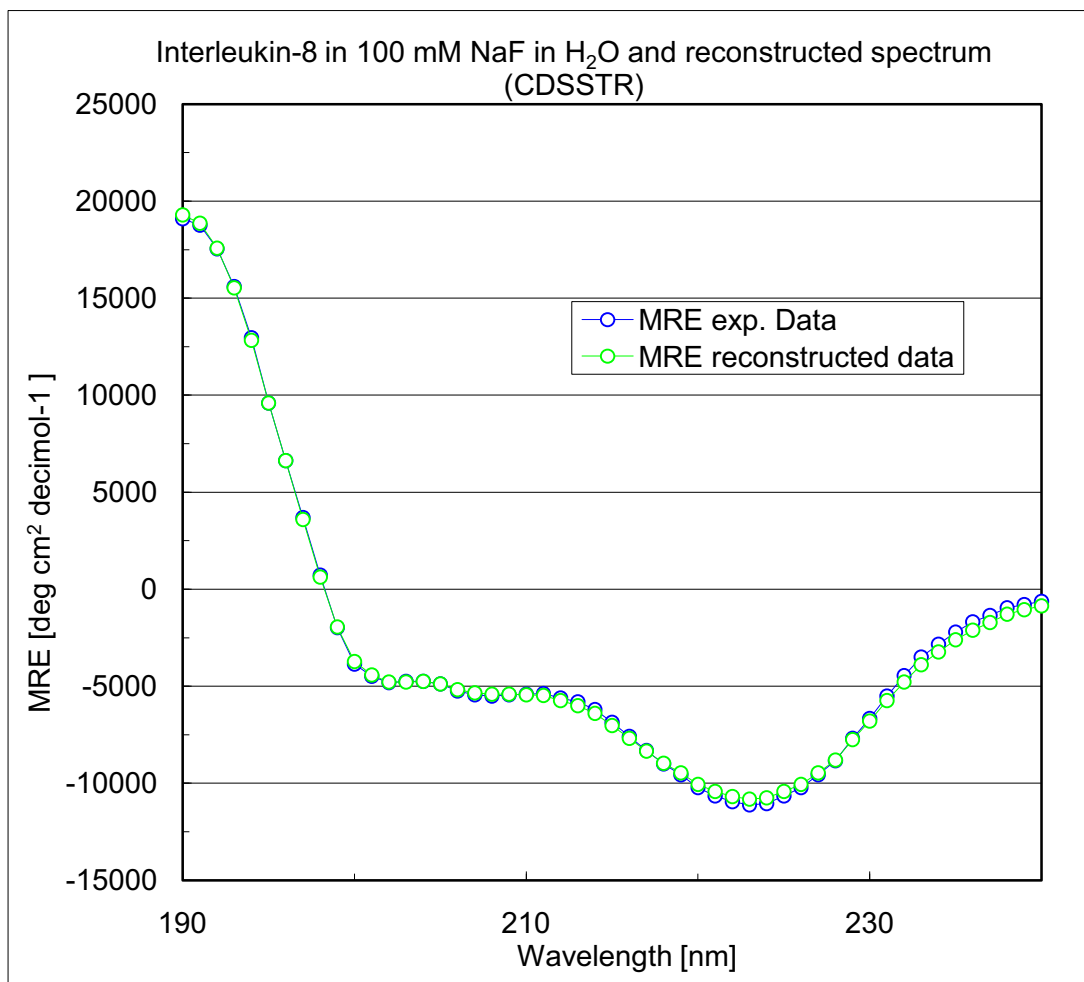


Abb. 53: CD-Spektrum von Interleukin-8 in 100 mM NaF, Auswertung mit dem Algorithmus CDSSTR

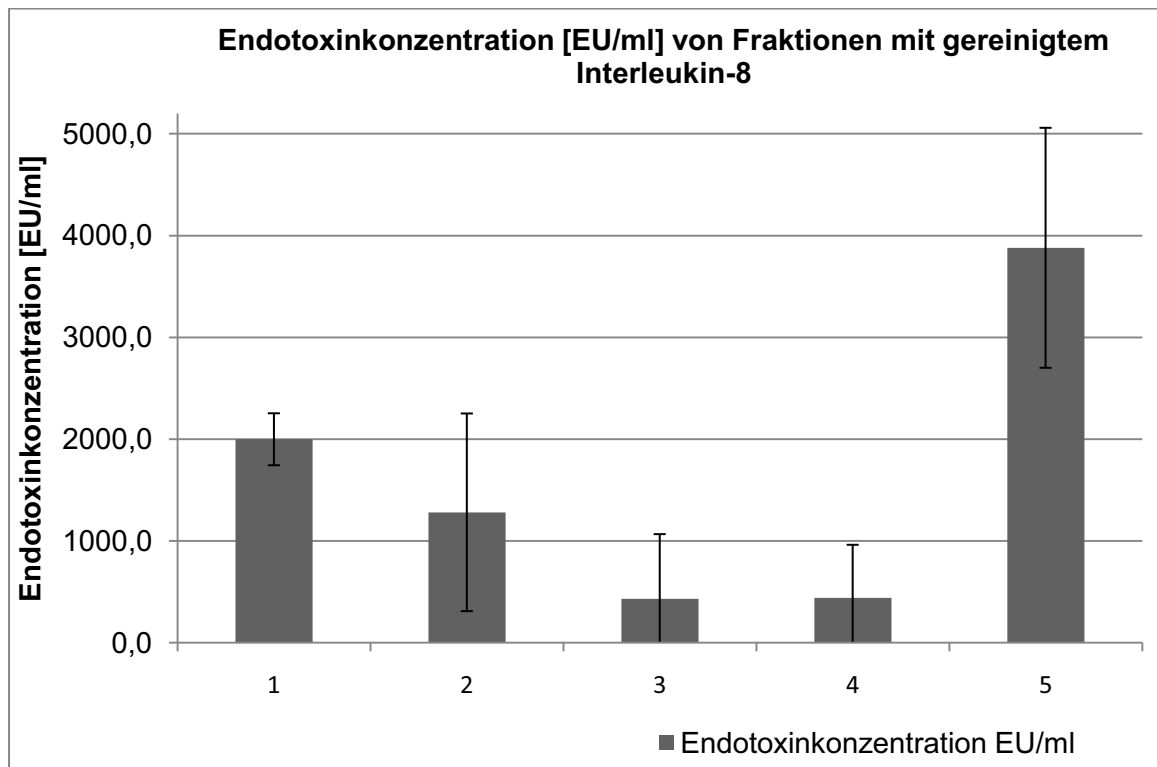
5.3 Nachweis und Entfernung von Endotoxinen

Ein wichtiger Bestandteil der Reinigung von rekombinanten Chemokinen war die Entfernung von Endotoxinen. Um das Interleukin-8 in Studien und Aktivitätstests mit Leukozyten ein-

setzen zu können, mussten diese pyrogenen Substanzen entfernt werden. Makrophagen und Monozyten reagieren auf sehr geringe Mengen LPS (10-1000 EU, 1 EU=120 pg Endotoxin von *E. coli*) und eine Interpretation der Ergebnisse bei Tests mit endotoxinhaltigen IL-8-Fraktionen wäre schwierig, da die Reaktionen sowohl auf Chemokin als auch die auf Endotoxine ähnlich sein können.

Zur Beseitigung von Endotoxinen wurden verschiedene Methoden getestet. Die Entfernung von Lipopolysacchariden mittels Endotoxin Removal Kit, die auf den Einsatz einer Polymyxin B-Säule beruhte, war einerseits umständlich und erbrachte nicht den gewünschte LPS-Reduzierung. Außerdem wurde ein Proteinverlust dabei festgestellt. Eine andere verwendete Methode war die Phasenabtrennung nach Liu et al.^[161] Hierbei wurden die Endotoxine mit Hilfe des Detergenz Triton X-114, das bei erhöhter Temperatur eine separate Phase ausbildet, entfernt. Die Eigenschaft des Detergenz, an Endotoxine zu binden und sein niedriger *cloud point* bei 22°C, wurde bei dieser Methode genutzt. Die proteinhaltige Lösung wurde mit 1% Triton X-114 versetzt und auf Eis inkubiert. Durch Erhöhung der Temperatur auf 35°C erfolgte eine Phasentrennung, bei der das Endotoxin in der schwereren Detergenzphase verbleibt und mittels Zentrifugation von der Proteinlösung abgetrennt werden kann. Eine einfachere Methode zur Entfernung von Lipopolysacchariden bestand in der Zugabe von 0,5% Triton X-114 statt Triton X-100 ins Zelllysat. Während der Zelllyse wurden die freigesetzten Lipopolysaccharide an das Detergenz gebunden und nach der Injektion der Probe auf die CIEX- oder Nickelsäule durch einen längeren Waschschrift von der Chromatographiesäule gespült. Alle Konzentrationsbestimmungen der Endotoxine wurden mit dem ToxinSensorTM Chromogenic Limulus-Amöbozyten-Lysat Endotoxin Assay Kit von Genscript durchgeführt.

Das in Abb. 54 dargestellte Diagramm zeigt die gemessenen Endotoxinkonzentrationen verschiedener IL-8-haltiger Fraktionen nach der Endreinigung durch Gelfiltration. Die Standardabweichung wurde von den mehrfach gemessenen Endotoxinkonzentrationen ermittelt. Die mit dem Endotoxin Removal Kit behandelte Probe wies einen deutlich höheren Endotoxingehalt mit 2000 EU/ml auf als Fraktionen, die entweder mit einer höheren Detergenzkonzentration (2) von Triton X-100 bzw. Triton X-114 (4) bei der Zelllyse oder mit dem Phasenabtrennungsverfahren (3) behandelt worden waren. IL-8-haltige Fraktionen, bei denen nur 0,25% Triton X-114 (5) während der Zelllyse eingesetzt worden waren, zeigten deutlich höhere Endotoxinkonzentrationen von durchschnittlich 3880 EU/ml. Mit Werten von 433 und 441 EU/ml hatten die Proben, die mit der Phasenabtrennung behandelt oder mit 0,5% TritonX-114 versetzt worden waren, die niedrigsten gemessenen Endotoxinkonzentrationen. Diese Chemokinproben konnten für die Anwendung in Bioassays eingesetzt werden.



1 Endotoxin Removal Kit (Genscript)

2 Lysepuffer mit 0,5% Triton X-100

3 Phasenabtrennung mit Triton X-114

4 Lysepuffer mit 0,5% Triton X-114

5 Lysepuffer mit 0,25% Triton X-114

Abb. 54: Endotoxinkonzentrationen von Proben mit rhIL-8 nach Entfernung der Lipopolysaccharide mit verschiedenen Methoden.

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die rekombinante Expression und Reinigung von drei humanen Chemokinen. Die Auswahl beruhte einerseits auf der Zugehörigkeit zu den zwei Hauptfamilien der Chemokine und andererseits darauf, ob sie im Organismus induziert oder konstitutiv exprimiert werden. Interleukin-8 gehört zur CXC-Familie und ist ein induzierbares Chemokin, das die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten bewirkt. SDF1 α ist ein in vielen Gewebearten konstitutiv exprimiertes Chemokin und zählt zur gleichen Chemokinfamilie wie IL-8. Das induzierbare Eotaxin-1 ist ein Vertreter der CC-Familie und bindet an dem Rezeptor CCR3. Es wurden die cDNAs der Chemokine IL-8, Eotaxin-1 und SDF1 α in verschiedene Expressionsvektoren kloniert, in *E. coli* transformiert und die Expression getestet. Bei einer starken Expression wurden die rekombinanten Zellen im 200-800 ml Maßstab angesetzt. Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte mittels optimierter Zellysemethoden und über Chromatographieverfahren. Zusätzlich wurden verschiedene Methoden zur Entfernung der Endotoxine, die durch die Zellyse freigesetzt worden waren, durchgeführt.

6.1 Expressionsvektoren für die Herstellung humaner Chemokine in *E. coli*

Das von Studier et al. 1990 entwickelte auf der T7-RNA-Polymerase basierende pET-System ist das meistgenutzte Expressionssystem zur Herstellung rekombinanter Proteine in *E. coli*.^{[111],[114]} In dieser Arbeit wurden die drei Vektoren pReceiver, pET22b und pET28a für die Expression rekombinanter Chemokine verwendet. Zur Expression wurden daher Bakterienstämme, die das Phagenfragment DE3 (Gen für die T7-RNA-Polymerase) im Genom integriert haben, benötigt. Obwohl der von anderen Forschungsgruppen meistverwendete Expressionsstamm für die Chemokinproduktion BL21 DE3 ist,^{[138],[162],[113]} konnte mit den in dieser Arbeit eingesetzten Expressionsstämmen BL21 DE3 RIL und Rosetta DE3 eine deutlich bessere Expression erzielt werden. In einer Studie von Wu et al. wurde gezeigt, dass rekombinante Proteine von Wildtypgensequenzen sowie von optimierter synthetisch hergestellter cDNA in verschiedenen Derivaten von BL21 DE3 unterschiedlich starke Expressionsausbeuten zeigten. Hierbei wurde beobachtet, dass codonoptimierte cDNAs nicht generell zur Verbesserung der Expression führen. Eher scheint die Anzahl sowie die Verteilung einiger Codons und die daraus resultierende Sekundärstruktur der mRNA das Expressionslevel zu beeinflussen.^[163] In dem Chemokin Eotaxin-1 sind drei aufeinanderfolgende Codons für Lysin enthalten. Der Lysinanteil in *E. coli*-Proteinen beträgt nur 5%, so dass eine Codonanhäufung zu einem Lysyl-tRNA-Mangel führen kann. Dabei wird die Translation gestoppt, was zu einem Codonübersprung oder sogar zu einem Abbruch führen kann.^[119] Einen weiteren Einfluss auf die Expression haben die Translationsgeschwindigkeit und die Geschwindigkeit beim Faltungsprozess.^[163]

Die T7-RNA-Polymeraseaktivität wird über das lacI-Gen des pET- und pReceiver-Vektors reguliert. Die Expression des Proteins wird mit Galactosederivaten wie IPTG induziert. Auch andere Promotoren wie P_{trp}, P_{phoA} und P_{tac} wurden für die Regulation und Induktion der Expression von rekombinanten Chemokinen eingesetzt.^{[164],[82],[125]} Im Labormaßstab ist der Einsatz von IPTG gerechtfertigt, aber für die Produktion im Großmaßstab kostenintensiv. Hier

sollte die Induktion mit Hilfe von nährstoff- oder temperaturregulierten Promotoren wie P_{phoA} , P_{araB} und λP_L erfolgen.^[165]

Mit dem in dieser Studie verwendeten Vektor pReceiver wurde keines der humanen Chemokine außer geringe Mengen des Precursors von Eotaxin-1 exprimiert. Ohne Signalpeptid oder mit einem N-terminalen K3 (drei Lysinreste)-TEV-Anhang wurden keine Expressionsbanden detektiert. Um die Expression zu verbessern, wurden die cDNAs in den Vektor pET28a, der zusätzlich eine His₆-Sequenz enthielt, kloniert. Bei den in dieser Studie hergestellten Chemokinen mit und ohne His-tag wurden IL-8 teilweise und SDF1 α vollständig als unlösliche Produkte vorgefunden. Der His-tag kann zwar die Expression verbessern aber nicht die Löslichkeit.^[140] Sehr viele Gruppen fanden unabhängig ob mit oder ohne *tags* die exprimierten Chemokine ebenfalls in der unlöslichen Form vor.^{[134],[82],[107],[93]} Das Problem der Aggregatbildung rekombinanter Proteine ist bekannt und wird von deren Struktur, z.B. Disulfidbrücken beeinflusst.^{[166],[120],[132]} Fahey et al. erklärten schon 1977 den unterschiedlichen Disulfidbrückengehalt von cytosolischen und extrazellulären Proteinen.^[167] Da alle Chemokine Disulfidbrücken enthalten und im Cytoplasma von *E. coli* ein reduzierendes Milieu herrscht, ist die Wahrscheinlichkeit für die korrekte Faltung sehr gering. Proteine, die nach der Translation nicht schnell genug gefaltet werden, aggregieren eher zu unlöslichen Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) als korrekt gefaltete.^[168]

Im periplasmatischen Raum der Bakterien herrscht ein oxidierendes Milieu, das die Bildung von Disulfidbrücken, somit die Faltung eines Proteins begünstigt und deshalb die Entstehung von *inclusion bodies* verringert. Der Transport von Proteinen kann mit Hilfe bestimmter Signalpeptide, z.B. dem pelB-Peptid, erfolgen. Die Verwendung eines Signalpeptids für den Transport des Proteins in den periplasmatischen Raum wurde von einigen Gruppen angewendet.^{[164],[169],[170]} Pfistering et al. produzierten RANTES mit dem Signalpeptid ompA und extrahierten dieses aus dem periplasmatischen Raum.^[171]

Das Signalpeptid pelB wurde vom Vektor pET22b kodiert. Bei Expressionsansätzen mit dem Vektor pET22b waren die Mengen von SDF1 α und Eotaxin-1 sehr gering. Interleukin-8 wurde sehr gut exprimiert, aber das pelB-Signalpeptid für den Transport in den periplasmatischen Raum war bei mehr als 50% des Proteins nicht entfernt worden. In der vorliegenden Arbeit wurden trotzdem 3-13 mg Interleukin-8 pro Liter Expressionsansatz erhalten. Die Entfernung von Signalpeptiden ist meistens nicht optimal, und van Coillie erhielt nach der Reinigung nur 200-500 μg MCP-1-Varianten aus 3 Liter Expressionsansatz.^{[172],[170]} Andere Gruppen, die ebenfalls den Vektor pET22b verwendeten, aber die Sequenz für das pelB-Peptid bei der Klonierung entfernt hatten, berichteten, dass die Proteine als *inclusion bodies* vorlagen.^{[129],[138],[112]} In der Arbeit von Cho et al. wurde die Löslichkeit von SDF1 α mittels eines MBP-Fusionproteins erhöht und dadurch eine geringere Bildung von *inclusion bodies* erzielt. Aber der *tag* wurde nach der Reinigung nicht entfernt.^[138] Das wäre für viele Studien nicht annehmbar, da Chemokine wichtige Bindungsstellen an ihren Termini besitzen und daher ihre natürliche Aminosäuresequenz benötigen, um ihre Funktion beizubehalten.^{[93],[40]} Die Erzeugung des korrekten N-Terminus bei der Herstellung von rekombinanten IL-8 ist essentiell für die Bindung an Rezeptoren. Ein Aktivitätsverlust bzw. die Modifizierung zum Antagonisten durch einen veränderten N-Terminus konnte in mehreren Studien gezeigt werden.^{[173],[129]}

Daher wird oft die Expression des Chemokins mit N-terminalen *tags* vermieden. Bei der Anwendung von Affinitäts- und Fusionproteinen muss eine Proteaseschnittstelle vor der Sequenz für das native Chemokin integriert werden, um den Anhang später entfernen zu können. Da die Proteasen spezifische Aminosäuresequenzen erkennen und schneiden, werden oft ein bis mehrere Aminosäuren am N-terminus zurückgelassen, wenn die C-terminale Seite der Schnittstelle nicht mit dem N-terminus des Zielproteins übereinstimmt.^{[174],[47]}

In der Publikation von Ye et al. wurde ein Verfahren gezeigt wie zusätzliche Aminosäurereste vermieden werden können.^[143] Vom rekombinanten Eotaxin-1 mit His-tag wurden mehrere Varianten, die sich in der integrierten Proteaseschnittstelle unterschieden, exprimiert. Faktor Xa schnitt unspezifisch und die Enterokinase war ineffizient, wohingegen mit Thrombin sehr gute Ergebnisse erzielt wurden. Da Thrombin vor einem Glycinrest schneidet, wurde die Thrombinschnittstelle mit der Aminosäuresequenz von Eotaxin-1, die als erste Aminosäure Glycin enthält, fusioniert. Der korrekte N-Terminus des Chemokins wurde bei dem Verdau mit Thrombin freigesetzt.^[143]

In der hier präsentierten Arbeit wurde ähnlich vorgegangen, aber eine andere Proteaseschnittstelle verwendet. Die Erkennungssequenz der TEV-Protease lautet ENLYFQ/G oder S. Die DNA-Sequenz wurde im Vektor pET28a hinter der His-tagsequenz gesetzt. Die DNA-Sequenzen der Protease und der Chemokine wurden so fusioniert, dass bei der Entfernung des Anhangs durch die Protease die korrekten N-Termini von Eotaxin-1 und IL-8 erzeugt werden. Bei SDF1 α wird ein Glycin zurückgelassen, das aufgrund einer fehlenden Seitenkette wenig Einfluss auf die Struktur und Funktion haben sollte.

6.2 Zellysemethoden

Um Bakterienzellen aufzuschließen, werden mechanische Methoden wie Ultraschall und French press durchgeführt. Durch Eiskristalle werden die Zellwände beim Gefrier-Tau-Zyklus ebenfalls geschädigt. Der Einsatz von Lysozym zählt zu den enzymatischen und die Zugabe von Detergenzien zu den chemischen Lysemethoden. Die Lipopolysaccharidschicht gramnegativer Bakterien wird durch die Zugabe von EDTA durch Bindung der Ca²⁺-Ionen destabilisiert. Lysozym spaltet die Peptidoglykanschicht der Bakterien. Die Zerstörung der Zellmembran und die zusätzliche Inhibition hydrophober Interaktionen zwischen den freigesetzten Proteinen erfolgt durch Zugabe eines nichtionischen Detergenz. Der Abbau des rekombinanten Proteins durch Proteasen wird mit Proteasehemmern und dem Arbeiten bei niedrigen Temperaturen verhindert.

Bei der Reinigung rekombinanter Chemokine aus Bakterienzellen verwendeten einige Arbeitsgruppen nur eine einzelne mechanische Lysemethode, z.B. Ultraschall, French Press oder Homogenisierer.^{[138],[162],[108],[175],[130]} Da Bakterienzellen aufgrund ihrer Zellwand schwerer zu lysieren sind als Säugerzellen, sind Kombinationen mehrerer Lysemethoden effektiver als eine einzelne Methode. Viele Forschungsberichte beschrieben die Kombination von dem Einsatz von Lysozym sowie einer mechanischen Methode.^{[129],[82],[173]} Durch den Abbau der Peptidoglykanschicht sind die Zellen vorgeschädigt und können durch Ultraschall, Gefrier-Tau-Zyklen oder French Press besser aufgeschlossen werden. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist der Aufschluss der Zellen effektiver bei Anwendung einer Kombination von

drei bis vier der bekannten Lysemethoden. Oft wurden chemische sowie enzymatische und mechanische Lysemethoden nacheinander durchgeführt. Crump et al. lysierten die Bakterien mit Gefrier-Tauzyklen, Triton X-100 und mit der French Press.^[47] Durch eine Kombination von chemischen und mechanischen Methoden wurden die Proteine aus den Bakterien in den Studien von Eigenbrot et al. und Harun et al. freigesetzt. In der Studie von Eigenbrot et al. wurden die Zellen durch einen Gefrier-Tauzyklus, der Zugabe von EDTA und anschließender Zugabe einer hochkonzentrierten Zuckerlösung aufgeschlossen.^[127] Harun et al. verwendeten bei der Zellyse ein Detergenz und Ultraschall.^[176]

In der hier präsentierten Arbeit wurde die Kombination mehrerer Methoden wie Lysozymeinwirkung, Ultraschall und Gefrier-Tauzyklus getestet. Die Effektivität der kombinierten Lysemethoden wurde über die ermittelten Peakflächen bei der Affinitätschromatographie durch die Detektion bei 280 nm verglichen. Der Vergleich wurde nicht mit SDS-PAGE durchgeführt, weil bei dem Chromatographieverfahren gleichzeitig die Bindung des Zielproteins an die Säule getestet werden konnte.

Die Menge von freigesetzten Proteinen war nach einer Lysozymbehandlung von 60 min größer als bei 10 min, d.h. eine längere Einwirkung verbessert die Freisetzung der löslichen Proteine in den Zellysätüberstand. Ebenfalls wurde mit dem Gefrier-Tau-Zyklus eine Erhöhung der Proteinkonzentration im Lysatüberstand erzielt. Diese Methodenkombination wurde auch in den Arbeiten von Furuta und Koltermann durchgeführt.^{[82],[125]} Zusätzlich wurde in der hier beschriebenen Studie gezeigt, dass die Zugabe von DNaseI ebenfalls eine weitere Freisetzung von Proteinen insbesondere der positiv geladenen bewirkt. Die negativ geladene DNA bindet an positiv geladene Proteine wie Chemokine. Durch den Abbau der DNA wurden die Bestandteile in die lösliche Form überführt. Aus diesen Erkenntnissen wurde eine optimierte Zellysemethode etabliert: Die Zellen wurden mindestens 1 h mit Lysozym auf Eis inkubiert und zusätzlich EDTA, DNaseI und Proteasehemmer dazugegeben. Die Zellmembran wurde dann durch Zugabe von 0,25% Triton X-100 zerstört und die Lyse mit Ultraschall und einem Gefrier-Tau-Zyklus vollendet. Durch eine große Menge von DNaseI wurde der Verdau der DNA gewährleistet. Die eingesetzten Proteasehemmer sowie das EDTA reduzierten die Aktivität freigesetzter Proteasen und verhinderten dadurch den Abbau des Zielproteins. Die Zellyse wurde sowohl mit Phosphat- als auch mit Trispuffer erfolgreich durchgeführt.

Für die Reinigung von Proteinen mit His-tag wurde auf die Zugabe von EDTA verzichtet, um später die Nickelionen der Affinitätssäule nicht zu komplexieren. Dafür wurden eine höhere Salzkonzentration (300 mM statt 90 mM NaCl) sowie Imidazol mit einer Endkonzentration von 15 mM eingesetzt. Hohe Salzkonzentrationen (300-500 mM NaCl) wurden auch bei der Zellyse vor der Nutzung einer Nickelsäule in anderen Studien verwendet.^{[177],[176],[178]} Die hohen Salzkonzentrationen verhindern sowohl unspezifische Bindungen zwischen den Proteinen bei der Zellyse als auch an der Nickelsäule.

Rekombinante Proteine, die durch ein Signalpeptid in den periplasmatischen Raum der Bakterien transportiert wurden, können mit einem Sonderverfahren, dem osmotischen Schock freigesetzt werden. Einige Gruppen verwendeten hohe Saccharosekonzentrationen und eine darauffolgende Wasserzugabe, die eine Freisetzung des Proteins durch den osmotischen Schock bewirkte.^{[179],[170],[156]} Die Freisetzung des rekombinanten IL-8 aus den periplasmatischen

Raum durch den osmotischen Schock nach Chen et al. führte nicht zu den gewünschten Ergebnis, da keine Proteine im Überstand auf dem SDS-Gel zu sehen waren.^[156] Möglicherweise war das Chemokin aufgrund der Verwendung großer Volumen zu gering konzentriert. Zudem wurde eine Lyse der Zellen beobachtet, wodurch die genomische DNA am positiv geladenen IL-8 binden konnte.

6.3 Expression und Reinigung von rekombinantem Interleukin-8

In dieser Arbeit wurde Interleukin-8 mit den Vektoren pET22b und pET28a in *E. coli* erfolgreich exprimiert. Beim Einsatz beider Vektoren wurden sowohl lösliche als auch unlösliche Produkte gebildet. Die Expression von Interleukin-8 in *E. coli* wurde bereits von zahlreichen Arbeitsgruppen durchgeführt.^{[128],[164],[125],[180]} Fairbrother et al. und Lowman et al. verwendeten Systeme zur Sekretion von IL-8 in den periplasmatischen Raum, um die Bildung von *inclusion bodies* zu vermeiden und konnten somit die Reinigung in einem Puffersystem ohne denaturierende Substanzen durchführen.^{[164],[169]} Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit präsentierten Reinigungsmethode wurden von Fairbrother et al. zwei Verdünnungsschritte, Salzfällung, Entsalzung sowie Aufkonzentrierung zwischen den Chromatographieläufen angewendet.

Bei der Expression von rekombinantem IL-8 in den Projekten von Lindley et al. und Hebert et al. musste aufgrund der Bildung von unlöslichen Aggregaten (*inclusion bodies*) eine Denaturierung mittels Harnstoffzugabe erfolgen, um das Protein reinigen zu können.^{[128],[180]} Der Vorteil von in *inclusion bodies* vorliegenden Proteinen ist eine geringerer Abbau durch Proteasen.^[132] Der Nachteil ist der hohe Verlust von Protein aufgrund der schwierigen Rückfaltung. Besonders disulfidbrückenhaltige Proteine lassen sich schwer in ihre native Form überführen.^[120] Bei der Herstellung von rekombinantem IL-8 in dem Bericht von Furuta et al. wurden sowohl die löslichen und unlöslichen Produkte aus *E. coli* gereinigt. Der Einsatz von Ammoniumsulfat und Harnstoff in der Reinigungsmethode erforderte mehrere Dialyse- und Konzentrierungsschritte.^[82] Mehrere Dialyseschritte wurden auch von Alouani et al. während der Reinigungsprozedur durchgeführt.^[159] Lowman et al. konnten verschiedene Varianten von IL-8 in *E. coli* exprimieren und reinigten diese über Kationenaustausch- und hydrophobe Interaktionschromatographie. Allerdings wurde auch bei dieser Reinigungsmethode zwischen den Chromatographieläufen dialysiert und entsalzt. Die Ausbeute betrug 1 mg pro Liter Zellkultur.^[169] Zur Reinigung von IL-8 aus 15 Liter Zellkultur benutzten Koltermann et al. zweimal eine Heparinsäule. Im dritten Chromatographieschritt mit einer Hydroxylapatitsäule wurde der Puffer gewechselt und danach die IL-8-haltige Fraktion dialysiert. Am Ende der Reinigung betrug die Ausbeute 8 mg.^[125] In den Arbeiten von Hou et al. und später von Cheng et al. wurden viele bakterielle Proteine durch eine Temperaturerhöhung auf 70°C für 10 min und der sofortigen Abkühlung auf 0°C von der hitzestabilen IL-8-Variante abgetrennt.^{[173],[129]} Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Studie getestet, wobei das rekombinante Interleukin-8 während des folgenden Dialyseschrittes ausfiel und deshalb nicht weiter gereinigt werden konnte. D.h. die Durchführung von Zwischenschritten wie Dialyse, Umpufferungen und Membranfiltration sind sowohl zeitaufwändig und erhöhen die Wahrscheinlichkeit eines Proteinverlustes, z.B. durch Präzipitation und unspezifischen Bindungen an den Materialien.

In dieser Arbeit wurde eine einfache reproduzierbare Methode für die Reinigung von tagfreien löslichen Interleukin-8 etabliert. Diese Methode wurde von den physikalischen Eigenschaften des Chemokins hergeleitet. Aufgrund des hohen pI bei 9,2 wurde im ersten Schritt eine CIEX durchgeführt. Nach der 1:2 Verdünnung der IL-8-haltigen Fraktion mit dem Niedrigsalzpuffer (Puffer A2) wurde der Ansatz im zweiten Reinigungsschritt auf eine Heparinsäule gegeben. Die Bindung an die Affinitätssäule erfolgte mittels der Glykosaminoglykanbindungsstelle am C-Terminus des Proteins. Nach der Elution mit dem Hochsalzpuffer wurde eine Endreinigung mit Hilfe einer Ausschlusschromatographie durchgeführt. Hierbei wurde das gleiche Puffersystem, das auch für die vorangegangenen Chromatographiemethoden verwendet worden war, eingesetzt und auf eine annähernd physiologische Salzkonzentration von 138 mM NaCl in Phosphatpuffer mit pH 7 eingestellt. Am Ende lag das reine Chemokin in einem für Bindungsstudien kompatiblen Puffer vor.

Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Reinigung des tagfreien Chemokins IL-8 erfolgte mit einem einfachen Einpuffersystem (nur Phosphatpuffer) bei dem keine Dialyse- und Membranfiltrationsschritte durchgeführt werden mussten. Mit dieser Reinigungsmethode wurde das lösliche IL-8 mit Ausbeuten von durchschnittlich $6 \text{ mg} \pm 3 \text{ mg}$ pro Liter Zellkultur isoliert. Zusätzlich lag das gereinigte IL-8 am Ende des Prozesses einsatzbereit in einem für Bioassays kompatiblen Puffer vor.

IL-8 mit His-tag und einer TEV-Proteaseschnittstelle wurde mit dem Vektor pET28a sehr gut exprimiert. Um die Struktur des rekombinanten Proteins zu bewahren, wurde nur das lösliche Produkt gereinigt. Der His-tag wurde für die Reinigung mit einer Nickelsäule verwendet. Die TEV-Proteaseschnittstelle, die hinter der $6 \times$ Histidinsequenz eingefügt worden war, überlappte mit dem N-Terminus der 72aa Variante von IL-8. Daher konnte mittels TEV-Protease das Protein mit dem nativen N-Terminus erzeugt werden.

Damit die TEV-Protease eingesetzt werden kann, muss die Salzkonzentration nach der Elution verringert und das Imidazol entfernt werden, da diese Substanzen die Aktivität des Enzyms beeinflussen.^[181] Die Protease ist eine Cysteinprotease und benötigt ein Redoxsystem. Statt des üblichen DTT muss ein Redoxsystem in den Proteaseansatz eingesetzt werden, da sonst eine Reduktion an den Disulfidbrücken des Chemokins stattfindet. Von Waugh wurde in der kurzen Anleitung TEV Protease FAQ das Redoxsystem 3 mM GSH/0,3 mM GSSG als Ersatz für DTT vorgeschlagen.^[181] Die Protease ist in einer großen Temperaturspanne aktiv (4-34°C). Die Aktivität ist bei 20°C viermal höher als bei 4°C. Bei dem größten Teil des Fusionsproteins HisIL-8 war der Anhang nach 6 h bei 20°C vollständig abgetrennt.

Nach der Entfernung des Tags mittels TEV-Protease wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Das Chemokin lag nach der Größenausschlusschromatographie ebenfalls in einem für Aktivitätsstudien anwendbaren Phosphatpuffer vor. Durchschnittlich wurden mit dieser Methode 3 mg IL-8 pro Liter Zellkultur hergestellt.

6.4 Expression und Reinigung von rekombinantem SDF1 α

Mit den Expressionsvektoren pET22b und pET28a konnte ebenso das Chemokin SDF1 α in *E. coli* exprimiert werden. Die Expression des nativen Chemokins war mit dem Vektor

pET22b sehr gering, weshalb die Reinigung mit der etablierten Methode für tagfreies IL-8 für den in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde. In der Arbeit von Murphy et al. wurde das Chemokin ebenfalls mit Hilfe des Vektors pET22b in *E. coli* rekombinant exprimiert.^[182] Die Reinigung erfolgte mittels CIEX und RP-HPLC nach Zugabe von denaturierenden Substanzen zu dem als *inclusion bodies* vorliegenden Protein. In der Studie von Cho et al. wurde SDF1 α sowohl mit GST als auch mit MBP-tag mittels pET22b exprimiert. Mit letzterer Variante wurde eine sechsmal größere Menge an löslichem Produkt als *inclusion bodies* erhalten. Allerdings erfolgte keine Entfernung des MBP nach der Chromatographie.^[138] Holmes und Mitarbeiter reinigten 20 mg rekombinantes SDF1 α pro Liter Expressionsansatz.^[107] Die Reinigung war hier aufgrund mehrerer Wasch- und Filtrationsschritte, der Denaturierung und Rückfaltung des Proteins sowie der Lyophilisierung sehr zeitaufwändig. In der Arbeit von Chen et al. wurde das Produkt des ersten Expressionsvektors pCRII nach 3 h wieder abgebaut.^[134] Der Einsatz eines anderen Vektors resultierte in der Expression des rekombinanten SDF1 α , das noch das Initiator-methionin enthielt und als *inclusion bodies* vorlag. Die Reinigung wurde nach Zugabe von Harnstoff ähnlich wie von Murphy et al. ausgeführt.

Viele Forschungsgruppen haben rekombinantes SDF1 α mit His-tag exprimiert.^{[183],[41],[113],[184]} Im Projekt von Shimoda et al. wurde die Expression des Chemokins im Bakterienstamm M15 mit IPTG induziert, und die Reinigung erfolgte mit Hilfe eines Nickel-NTA-Resin spin Kits von Qiagen ohne anschließende Entfernung des His-tags. Die Präparationen wurden sowohl mit denaturierenden und nicht denaturierenden Puffern erfolgreich durchgeführt.^[183] Altenburg und Mitarbeiter verwendeten den Expressionsvektor pET23a zur Herstellung verschiedener Varianten von SDF1 im Expressionsstamm BL21-Gold DE3 pLysS. Die rekombinanten Proteine enthielten einen C-terminalen His-tag, der zur Reinigung mit einer Nickel-NTA-Säule genutzt wurde. Nach der Zugabe von Harnstoff wurde die Rückfaltung des Proteins durch einen stufenweise abfallenden Harnstoffgradienten erbracht.^[41] Der His-tag wurde nach der Elution von der Nickelsäule nicht entfernt und es wurden keine weiteren Reinigungsschritte durchgeführt. Als Gesamtausbeute der His-getagten SDF1-Varianten wurden 0,5-2,0 mg pro Liter Expressionsansatz angegeben. Ryu et al. und Veldkamp et al. exprimierten rekombinantes SDF1 α mit einem N-terminalen His-tag und TEV-Sequenz. Allerdings musste auch in dieser Arbeit eine Reinigung aus *inclusion bodies* erfolgen.^{[113],[184]} Zur Entfernung des abgeschnittenen His-tags wurde ein zweiter Chromatographieschritt an der Nickelsäule von Ryu und Mitarbeiter durchgeführt. Die Endreinigung erfolgte mit Hilfe der Gelfiltration.^[113]

Die Reinigungsmethode von Ryu et al. wurde auch in dieser Arbeit getestet, da ein ähnliches DNA-Konstrukt für die Expression verwendet worden war. Es wurden deutliche Expressionsbanden von SDF1 α mit His-tag detektiert. Nach der Zellyse zeigte sich im SDS-Gel, dass das rekombinante Chemokin nur als unlösliche Form im Pellet des Zellysats vorlag. Daher musste das Protein vor der Reinigung über die HisTrap-Säule mit denaturierenden Substanzen in die lösliche Fraktion überführt werden. Zusätzlich waren noch 15 mM Imidazol dazugegeben worden. Nach der Rückfaltung von SDF1 α durch Anwendung eines abfallenden Harnstoffgradienten und Zugabe des Redoxsystems 3 mM GSH/0,3 mM GSSG wurde die Elution mit einem Imidazolgradienten durchgeführt. Die Elution des Proteins erfolgte jedoch schon bei niedrigen Imidazolkonzentrationen (15-50 mM), was auf eine sehr schwache Bindung des

His-tags an der Säule zurück zuführen war. Mit einer Absenkung der Imidazolkonzentration im Lysis- und Rückfaltungspuffer könnte die Bindung des His-tags an das Säulenmaterial verstärkt werden. Ein Vorteil bei einer schwachen Bindung des His-tags wäre die aufgrund der in der eluierten Fraktion geringen Imidazolmenge entfallende Entfernung und sofortige Anwendung der TEV-Protease. Andererseits könnten mehr bakterielle Proteine an der Nickelsäule binden und die SDF1 α -haltige Fraktion wäre weniger rein. Die Endreinigung kann dann wie bei IL-8 mit einer Gelfiltration vollzogen werden.

6.5 Expression und Reinigung von rekombinantem Eotaxin-1

Schon in dem Bericht von Edgerton im Jahr 2000 wurde beschrieben, dass einige Chemokine, z.B. IL-8 und MCP-3 mit Hilfe von pET-Vektoren gut exprimierbar sind und andere, z.B. Eotaxin-1 und MCP-1 gar nicht oder in sehr geringen Mengen produziert werden. Die Limitierungen beruhen höchstwahrscheinlich auf Fehlern bei der Translation durch ungünstige Sekundärstrukturen der gebildeten mRNA.^[185] Rekombinantes Eotaxin-1 wurde von einigen Gruppen in Säugetier- und Insektenzellen exprimiert. Kitaura et al. hatten 1997 mit Insektenzellen humanes Eotaxin-1 hergestellt und nach der Dialyse des Mediums, das Protein über eine HiTrap Heparin- und anschließend mit einer SP FF-Säule gereinigt.^[105] Eine ähnliche Herstellung von Eotaxin-1 wurde in der nachfolgenden Arbeit von Nakajima et al. durchgeführt.^[186] Andere Arbeitsgruppen stellten humanes Eotaxin-1 mittels Festphasensynthese her.^{[187],[47]} Die Reinigung von in COS-Zellen exprimiertem Eotaxin-1 mit einem C-terminalen FLAG-tag mittels Anti-FLAG-Antikörper wurde von Garacia-Zepeda vorgestellt.^[188] Nach der Expression in COS-Zellen wurde das Protein von Ishi et al. nur über Ultrafiltration aus dem Kulturmedium gereinigt.^[189] Die Herstellung von rekombinantem Eotaxin in *E. coli* wurde von wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt.^{[190],[143],[162]} Morita und Kollegen stellten Eotaxin-1 mit einem N-terminalen His-tag gefolgt von einer Enterokinaschnittstelle her. Nach der Reinigung mit einer Affinitätssäule und der Entfernung des His-tags wurde die Endreinigung mit RP-HPLC durchgeführt.^[190] In der Studie von Ye et al. wurde die Expression des rekombinanten His-tag-Chemokins für 4-6 h mit 1 mM IPTG induziert. Die Zellen wurden direkt im Bindungspuffer für die Affinitätschromatographie durch dreimaliges Sonifizieren lysiert. Die drei gesammelten Lysatüberstände wurden auf eine Nickel-NTA-Säule gegeben. Der His-tag wurde mit Hilfe von Thrombin abgeschnitten.^[143] Als Endreinigungsschritt wurde eine CIEX durchgeführt. Ebenfalls konnte von dieser Gruppe gezeigt werden, dass die tagfreie Expression von Eotaxin sehr gering war. Die Expression des Proteins mit His-tag war deutlich höher als ohne tag und die Ausbeuten betrugen 5-10 mg pro Liter Zellkultur.^[143] Die gleiche Reinigungsmethode wurde auch von Chung und Mitarbeitern publiziert.^[162] Diese Berichte legen nahe, dass eine Expression von humanen Eotaxin-1 mit His-tag vorzuziehen ist.

Bei den in diesem Projekt durchgeführten Expressionstests von rekombinantem Eotaxin-1 mit Hilfe der Vektoren pReceiver, pET22b und pET28a wurden keine oder sehr geringe Mengen exprimiert. Das in geringen Mengen exprimierte Protein mittels pReceiver enthielt zusätzlich das Signalpeptid. Mit und ohne andere Anhänge wie K3TEV konnte das Chemokin nach der Expression nicht nachgewiesen werden. Auch nach der Expression mit dem Vektor pET22b wurden keine Expressionsbanden von tagfreien Eotaxin-1 im SDS-Gel ermittelt. Eine Verbes-

serung der Expression wurde mit dem Vektor pET28a erzielt. Im Gegensatz zur Studie von Ye et al. konnte die Expression von tagfreiem Eotaxin ebenfalls mittels pET28a in der hier vorliegenden Arbeit beobachtet werden.^[143] Das rekombinante Eotaxin mit His-tag war nach vierstündiger Expressionsdauer im SDS-Gel gut erkennbar. Bei beiden exprimierten Varianten wurde in weiteren Versuchen festgestellt, dass das Protein wieder abgebaut wurde. Nach der Expression über Nacht wurde die Expressionsbande, die in der Probe nach 4 h im SDS-Gel zu sehen war, nur noch im Western Blot detektiert. Auch nach der direkten Zellyse und der sofortigen Zugabe von Proteaseinhibitoren nach der vierstündigen Expression war das Chemokin weder im Überstand noch im Pellet des Zellysats erkennbar. In den Publikationen von Ye und Chung wurde dieses Phänomen nicht beschrieben, obwohl beide den Bakterienstamm BL21 DE3, der dem in dieser Arbeit benutzten Stamm BL21 DE3 RIL ähnlich ist, einsetzen.^{[143],[162]} Der Abbau ist vermutlich auf eine *E. coli*-Protease zurückzuführen.^[174] Eine Begründung wäre ein Fehler aufgrund einer falschen Transkription oder eines fehlenden Codons in der mRNA, der zu einer Markierung der mRNA durch *E. coli* führt. Dadurch enthält der C-Terminus des exprimierten Proteins eine Erkennungssequenz (SsrA) für die *E. coli*-Proteasen HflB und Clp, die das Protein abbauen.^[191] In der Studie von Herman et al. wurde dieser Erkennungsmechanismus genauer untersucht. Je mehr unpolare Aminosäurereste in den letzten fünf Aminosäuren des C-Terminus vorlagen, desto schneller wurde das Protein abgebaut.^[192] Beim Vergleich der C-Termini der Chemokine IL-8, SDF1 α und Eotaxin-1 wurden eine, zwei bzw. drei unpolare Aminosäuren in den letzten fünf Aminosäuren ermittelt. D.h. vermutlich wird Eotaxin-1 aufgrund seiner hohen Anzahl an unpolaren Aminosäureresten am C-Terminus von den *E. coli*-Proteasen HflB und Clp erkannt und abgebaut. Die Anwendung einer sehr schnellen Lysemethode wie von Ye et al. durchgeführt, schien den Abbau durch Proteasen zu unterbinden.^[143]

6.6 Verbesserungsansätze für die Expression von humanem SDF1 α und Eotaxin-1 in *E. coli*

Die Verbesserung der Expression von rekombinanten SDF1 α und Eotaxin-1 kann auf vier verschiedenen Ebenen stattfinden. Auf der DNA-Ebene ist eine Verbesserung in der Codonusage und der damit verbundenen tRNA-Verfügbarkeit möglich. Durch die Wahl eines geeigneten Expressionsstamms, z.B. Rosetta-gami DE3 pLysS und/oder der Verwendung eines bestimmten *tags* kann die Expression verstärkt sowie die Proteinfaltung verbessert werden. Die Einstellung der Zellkulturbedingungen ermöglicht eine weitere Verbesserung der Expression. Und eine Erhöhung der Ausbeute kann durch die Minimierung des proteolytischen Abbaus erfolgen.

Die im Menschen häufig genutzten Arginincodons agg/aga, cga und cgg gehören zu den am wenigsten genutzten Codons in *E. coli*. Auch die Cystein- und Prolincodons tgt, tgc, ccc und cca sind mit einer Frequenz von 3-5 pro 1000 Codons selten vertreten.^[119] Die zwei Aminosäuren Cystein und Prolin sind in den Sequenzen der Chemokine SDF1 α und Eotaxin-1 häufig vorhanden. Alle Chemokine enthalten Cystein, die Aminosäure, die in *E. coli*-Proteinen am wenigsten vertreten ist.^[119] Arginin liegt in der Aminosäuresequenz von SDF1 α mit einem höheren Anteil vor als in *E. coli*-Proteinen. Daher sollten mindestens diese Aminosäurecodons für in *E. coli* häufiger genutzte Codons umgewandelt werden. Mehr tRNAs stehen für die

Aminosäuren Arginin und Prolin zu Verfügung, wenn die Codons ctg und cct eingesetzt werden. Bei den Codons für Cystein kann keine Änderung erfolgen. Generell sind codonoptimierte synthetische cDNAs für die Expression rekombinanter Chemokine zu empfehlen.

Die Expression kann aber nicht nur durch selten verwendete Codons limitiert werden, sondern auch von der Häufigkeit der Codons bzw. den Anteil einer Aminosäure im Protein. Der Lysinanteil von 15% in Eotaxin-1 ist dreimal höher als in Proteinen des Wirtsorganismus. In der Studie von Wang et al. wurde ein Protein, das einen Lysinanteil von 12% aufwies, exprimiert. Die Expression wurde durch den zwei bis dreifachen Lysincodonanteil und den daraus resultierenden hohen Verbrauch an Lysyl-tRNA limitiert.^[119, 193] Der Unterschied, der zwischen den durchschnittlichen Anteil von einzelnen Aminosäuren in *E. coli*- und humanen Proteinen besteht, kann nicht beeinflusst werden. Daher sollten Expressionsstämme, die mehr seltene tRNAs überexprimieren, z.B. Rosetta DE3 pLysSRARE statt in der hier präsentierten Studie BL21 DE3 RIL, verwendet werden. Das könnte den Mangel an bestimmten tRNA-Molekülen während der Expression von Eotaxin-1 ausgleichen. Die Expression, insbesondere die Translation, wird nicht nur von seltenen Codons sondern auch vom Startcodon beeinflusst. Das Initiationscodon atg ist das in *E. coli* meist genutzte Startcodon (91%)^[116] und sollte daher für Expression von rekombinanten Proteinen verwendet werden.

Damit das Initiationsmethionin durch die endogene Aminopeptidase in *E. coli* entfernt werden kann, sollte in der Sequenz eine Aminosäure mit einer kurzen Seitenkette folgen, da sonst das Enzym aus sterischen Gründen nicht oder ineffizient schneidet.^[194] Bei den in der vorliegenden Arbeit exprimierten Chemokinen IL-8 und SDF1 α mit His-tag wurde mit der Massenspektrometrie festgestellt, dass das Initiationsmethionin entfernt worden war. Beide Chemokine enthielten ein Glycinrest an zweiter Stelle.

Um bei der Expression eine korrekte Faltung des Proteins und die Verminderung der Aggregatbildung zu gewährleisten, können zwei verschiedene Maßnahmen helfen. Erstens kann die Verwendung eines anderen Signalpeptids, z.B. StII oder ompA für den Transport in den periplasmatischen Raum, die Proteinfaltung aufgrund des oxidierenden Milieus verbessern.^{[164],[171]} Zusätzlich bleibt nach der Abtrennung des Peptids der N-Terminus des nativen Chemokins erhalten. Diese Anwendung führt aber nicht immer zum gewünschten Ergebnis, da in einigen Fällen wie auch in dieser Arbeit das Signalpeptid nicht vollständig entfernt wird.^[172] Eine Verbesserung der Faltung von rekombinanten Proteinen im Cytosol kann mit Hilfe von bestimmten Expressionsstämmen erreicht werden. Bardwell et al. hatten 1994 den Mechanismus für die verminderte Disulfidbrückenbildung im Cytoplasma von *E. coli* entdeckt und die Proteine dsbA-C als wichtige Bestandteile erkannt. Eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung des reduzierenden Milieus und die dadurch verringerte Bildung von Disulfidbrücken spielt außerdem die Thioredoxin-Reduktase (TrxB).^[195] Eine im Cytoplasma erhöhte Produktion von löslichen rekombinanten Antikörperfragmenten sowie löslichem MCP-1 mit Hilfe eines TrxB-defizienten Expressionsstammes konnte in den Studien von Proba et al. und Paavola et al. erzielt werden.^{[196],[121]} Es wurden ohne Bildung von *inclusion bodies* mit Hilfe des Expressionsstammes TAP302 0,5-5 mg MCP-1 aus 1,5 Liter Zellkultur gewonnen.^[121] Mittlerweile können diese trxB-defizienten Stämme käuflich erworben werden und sollten bei der Produktion von disulfidhaltigen Proteinen berücksichtigt werden. Zwei-

tens, kann die Verwendung von His-tag und löslichkeitsfördernden Fusionsproteinen die Expression verbessern.^[143] In der Arbeit von Chung und Mitarbeitern wurde, nachdem die Expression einer Eotaxin-1-MCP-3-Chimäre mit His-tag erfolglos war, ein kombinierter *tag* verwendet. Durch die Kombination von His₆- mit Thioredoxin (TRX) wurde die Expression deutlich verbessert und ein lösliches Produkt erhalten.^[162] Dieser kombinierte His₆-TRX-tag wäre eine Alternative zum in dieser Arbeit verwendeten einfachen His₆-tag für die Expression von SDF1 α und Eotaxin-1. Um am Ende der Reinigung ein natives Chemokin zu erhalten, muss eine Proteaseschnittstelle zwischen dem Anhang und der Aminosäuresequenz der Chemokine integriert sein.

Die dritte Ebene der möglichen Verbesserungen beruht auf den Einflüssen des Mediums und der Temperatur auf die Expression. Die Bildung von *inclusion bodies* kann durch das Herabsetzen der Temperatur und durch die Anpassung des pH reduziert werden.^{[197],[116],[120],[166]} Die Zugabe von frischem Medium zum Expressionsansatz nach dem Erreichen der log-Phase kann ebenfalls die Expressionsrate von rekombinanten Proteinen erhöhen.^[115] Die Zusammensetzung des Mediums beeinflusst signifikant die metabolischen Effekte sowohl in den Zellen als auch bei der Proteinproduktion.^{[198],[116]}

Um den Abbau von Eotaxin-1 zu verhindern, sollte die Zellen sehr schnell aufgeschlossen werden und das Protein durch Chromatographie von den Proteasen getrennt werden. Eine andere Möglichkeit ist die direkte Zugabe von Heparin zum Zelllysat. Ellyard et al. zeigten in ihrer Studie, dass Eotaxin durch die Bindung an Heparin vor einem proteolytischen Abbau geschützt wurde.^[87] Die Heparin-Eotaxin-1-Komplexe können durch Gelfiltration von anderen Proteinen sowie Proteasen isoliert und für weitere Reinigungsschritte eingesetzt werden.

6.7 Konzept zur Reinigung von rekombinantem SDF1 α und Eotaxin-1

Die Grundvoraussetzung für eine effektive Reinigung ist die Expression selbst, da in dieser Phase, die Menge sowie die Struktur und somit die Bildung von löslichen oder unlöslichen Produkten beeinflusst wird.

Die physikalischen Eigenschaften, die bei der Reinigung von IL-8 ausgenutzt werden, d.h. hoher pI und die GAG-Affinität, sind auch bei den anderen Chemokinen vorhanden. Die isoelektrischen Punkte von SDF1 α und Eotaxin-1 liegen bei 9,9 und 10,0 (Protein Calculator v3.3). Deshalb sind die beiden Proteine dafür prädestiniert, im ersten Schritt mit einem Kationenaustauscher gereinigt zu werden. Da die beiden Chemokine ebenfalls eine Glycosaminoglycanbindungstelle aufweisen, kann im zweiten Schritt wie bei IL-8 eine Heparinsäule benutzt werden.^{[11],[85]} Für lösliche tagfreie Formen von SDF1 α und Eotaxin-1 sollte die für IL-8 beschriebene Reinigungsmethode sehr gut anzupassen sein. Aufgrund der höheren pI-Werte würden die Chemokine mit einer höheren Salzkonzentration von der SP FF-Säule eluiert werden. Die Verdünnung vor dem Auftragen auf die Heparinsäule müsste entsprechend angepasst werden. Mit Hilfe der Gelfiltration können auch diese Chemokine endgereinigt und in eine gewünschte Pufferzusammensetzung überführt werden.

Für die His-getagten Varianten bieten sich zwei verschiedene Methoden an, abhängig davon, ob das Produkt löslich oder unlöslich vorliegt. Für die Reinigung von löslichen His-getagten

Chemokinen erfolgt die Zellyse ohne denaturierende Substanzen und Reduktionsmittel. Die Zugabe von Salz und geringen Mengen Imidazol kann unspezifische Bindungen an der HisTrap-Säule mindern, muss aber für jedes Protein angepasst werden. Bei dem ersten Reinigungsschritt wird das Protein mit einem linearen bzw. unter optimierten Bedingungen mit einem Stufengradienten eluiert.

Für den letzten Reinigungsschritt nach der Abtrennung des His-tags durch die Protease gibt es drei Möglichkeiten. Entweder die Reinigung erfolgt mit einer Heparinsäule, an der das tagfreie Chemokin bindet und der His-tag und die Protease im Durchfluss erscheinen oder mit einer HisTrap-Säule, an die der *tag* bindet und das Chemokin im Durchfluss vorliegt. Letztere Variante wäre aufgrund des im Durchfluss fehlenden Imidazols und weniger hohen Salzkonzentration als im Eluat der Heparinsäule besser. Die dritte Möglichkeit, wie für His-IL-8 gezeigt, ist, die Endreinigung über eine Gelfiltrationssäule durchzuführen. Dabei wird die Protease vor und der His-tag nach dem Chemokin eluiert. Außerdem kann mittels Gelfiltration der gewünschte Puffer, in dem das Protein am Ende der Reinigung vorliegen soll, eingestellt werden.

Für den Fall das unlösliche Varianten von SDF1 α und Eotaxin-1 vorliegen, wird die Methode bei der Zellyse und im ersten Chromatographieschritt abgewandelt. Um die Proteine in Lösung zu bringen, können 2 M Harnstoff oder GuanidinHCl sowie 3 mM GSH zum Lysispuffer und zum Bindungspuffer für die Nickelsäule gegeben werden. Nach der Bindung des Chemokins an der Säule kann eine *on-column*-Rückfaltung wie von Ryu et al. oder Veldkamp et al. beschrieben und danach die Elution mit Imidazol erfolgen.^{[113],[130]} Die weiteren Schritte werden wie für die Reinigung löslicher Chemokine mit His-tag durchgeführt.

6.8 Entfernung von Endotoxinen

Endotoxine sind Lipopolysaccharide aus der Zellwand gram-negativer Bakterien, die Monocyten und Makrophagen aktivieren. Um die Aktivität gereinigter Chemokine in Zellmigrationstests oder später *in vivo* testen zu können, sollten die Chargen nur sehr geringe Mengen von Lipopolysacchariden enthalten.^[145] Deshalb wurde in dieser Arbeit zusätzlich die Entfernung von Endotoxinen betrachtet.

In der Literatur wurden verschiedene Methoden, um LPS zu entfernen, beschrieben. Dazu gehören die Ultrafiltration, Affinitäts-, Ionenaustausch- und hydrophobe-Interaktionschromatographie, sowie die Zweiphasenextraktion und die Verwendung adsorptiver Membranen.^[147]

In dieser Studie wurden drei verschiedene Methoden getestet. Die erste beruht auf die Bindung der Endotoxine an Polymyxin B. Die Phasenabtrennung mittels Triton X-114, beschrieben von Aida et al., wurde als zweite Methode getestet.^[153] Bei der dritten Variante für die Entfernung von Endotoxinen wurde das Detergenz direkt zum Zellysat gegeben und mit Hilfe des Bindungspuffers im ersten Chromatographieschritt herausgewaschen. Hierbei sollten die freigesetzten Lipopolysaccharide im gekühlten Zellysat an das Triton X-114 binden und nach der Bindung des Proteins an dem Säulenmaterial entfernt werden. Der gleiche Prozess wurde auch mit Triton X-100 durchgeführt.

Eine IL-8-haltige Fraktion wurde nach der Gelfiltration manuell auf eine Polymyxin B-Säule gegeben. Dabei sollte das Endotoxin an der Säulenmatrix binden und die Proteine eluiert werden. Polymyxin B ist ein Peptid aus dem gram-positiven Bakterium *Bacillus polymyxa*, das mit einer sehr hohen Affinität an den Lipid A-Anteil der meisten Endotoxine gram-negativer Bakterien bindet.^[199] So konnte in der Studie von Issekutz et al. gezeigt werden, dass in Lösung vorliegende Endotoxine sehr effizient mit Hilfe von Polymyxin B-Säulen entfernt werden.^[151] Da aber viele Moleküle, z.B. kationische Proteine mit LPS interagieren, ist die Effektivität verschiedener Methoden zur Entfernung der Endotoxine von dem jeweiligen Protein abhängig.^{[200],[147]} Hauptsächlich werden elektrostatische Wechselwirkungen als treibende Kraft für die Bindungen von Endotoxinen an Proteine vermutet. Möglicherweise führen Kalziumionen zwischen den Carboxylgruppen der Proteine und den Phosphatgruppen der LPS-Moleküle zu dynamisch stabilen Bindungen zwischen den beiden Komponenten.^[145] Durch Zugabe des Detergenz Octyl- β -D-glucopyranosid und einer daraus resultierenden Dissoziation der LPS-Proteinkomplexe wurde in der Arbeit von Karplus et al. eine effektivere Entfernung der Endotoxine über eine Polymyxin B-Säule erzielt.^[152] Liu et al. demonstrierten durch den Vergleich verschiedener Methoden, dass die Anwendung einer Polymyxin B-Säule weniger erfolgreich war als die Phasentrennung mit TritonX-114.^[161] Auch in der vorliegenden Arbeit wurde durch die Benutzung der Polymyxin B-Säule keine optimale Reduktion der LPS-Menge erbracht.

Die Ergebnisse der Tests zur Endotoxinentfernung zeigten, dass sowohl mit der Phasentrennung mit Triton X-114 als auch mit der Zugabe von 0,5% Triton X-114 in den Zellyseansatz eine deutliche Verringerung der LPS-Konzentration erzielt worden war. Dabei werden die hydrophoben Interaktionen zwischen den Alkylketten des Lipid A und dem Detergenz ausgenutzt und aus der wässrigen Phase entzogen. Bei einer bestimmten Temperatur (*cloud point*) aggregieren die Micellen des Detergenz zu Tropfen mit einem geringen Wassergehalt und bilden dadurch eine neue Phase. Die Endotoxine verbleiben in der detergenzreichen Phase, die mittels Zentrifugation und Temperaturerhöhung sedimentiert.^{[153],[154]} Ursprünglich wurde die Phasentrennung zur Separation integraler Membranproteine von hydrophilen Proteinen entwickelt.^[201] Diese Methode wurde später von Aida et al. für die Endotoxinentfernung abgewandelt. In mehreren Studien wurde mit Hilfe dieses Verfahrens die erfolgreiche Absenkung der Endotoxinkonzentrationen gezeigt.^{[153],[202],[154],[203]} Triton X-114 ist aufgrund seines *cloud points* bei 22°C besser geeignet als Triton X-100 mit einem *cloud point* bei 75°C. Einerseits bleibt das Detergenz bei niedrigen Temperaturen (0-15°C) sehr gut in Lösung und bindet an die Endotoxine, andererseits lässt sich die Phasentrennung bei proteinschonenden Temperaturen durchführen.

Diese Eigenschaft wurde auch in der Studie von Cheng et al. genutzt, die das Detergenz in einer Endkonzentration von 1% in den Waschpuffer bei der CIEX gaben und damit die LPS-Konzentration im isolierten Protein drastisch reduzieren konnten.^[129] In der Arbeit von Hou et al. wurde mit Hilfe eines Anionenaustauschers die Entfernung von Endotoxinen aus Abwasser erfolgreich durchgeführt. Aber eine zufriedenstellende Entfernung von LPS aus Proteinlösungen wurde mit dieser Methode nicht erzielt. Erst durch die Variation der pH-Werte und der Salzkonzentration wurden ca. 75% der Endotoxine aus der Proteinlösung extrahiert. Allerdings führte diese Methode zu einem Proteinverlust.^[204] Die Ergebnisse eines Vergleichs ver-

schiedener Methoden wurde in einer Studie von Wilson et al präsentiert. Die Verwendung eines Kationenaustauschers, Anionenaustauschers oder Polymyxin B erzielte keine signifikante Reduktion der Endotoxinlevel. Waschschritte mit Ethanol, Isopropanol oder Essigsäure während der CIEX ergaben eine 70-90%ige Absenkung der Konzentrationen, aber hatten außerdem einen 50-60%igen Proteinverlust zur Folge. Andere Waschschritte mit 10 mM EDTA und 0,1% TritonX-100 konnten keine Endotoxinreduktion bewirken. Die effizienteste Reinigung ergab sich mit der Zugabe von 4 M GuanidinHCl und 0,75 M Ammoniumsulfat während einer Hydrophoben-Interaktionschromatographie.^[205] Für die Reinigung von löslichen Proteinen, die ihre korrekte Tertiärstruktur vorweisen, wäre diese Methode kontraproduktiv, da die Zugabe von GuHCl eine Denaturierung des Zielproteins verursacht.

Bei dem Vergleich mehrerer Studien wurde die Phasentrennung mit Detergenzien als effektivste Methode zur Endotoxineliminierung ermittelt.^{[153],[203],[161]} Das für Proteinlösungen gut geeignete Triton X-114 ist dabei die erste Wahl für diese Anwendung. Sowohl die Methode von Aida et al. als auch die selbst etablierte Methode, die Zugabe von Triton X-114 mit einer Endkonzentration von 0,5% im Zellyseansatz zeigten in der hier präsentierten Arbeit gute Ergebnisse mit Endotoxingehalten von unter 450 EU/ml. Die Proteinausbeute des mit 0,5% Triton X-114 versetzten Zellysats und dem darauffolgenden Waschschritt bei der Chromatographie war mit 5 mg/l Zellkultur deutlich höher als die des Lysats, das mit der Phasentrennung behandelt worden war, mit 3 mg/l Zellkultur. Eventuell könnte durch eine Kombination der beiden Methoden eine größere Reduktion der LPS-Level erzielt werden. Die Anwendung von 0,5% Triton X-100 oder 0,25% Triton X-114 im Zellysat erbrachte keine optimale Reduktion der Endotoxinkonzentration.

6.9 Ausblick

Voraussetzung für die Entwicklung und Prüfung potenzieller Inhibitoren in Bindungsstudien und Aktivitätstests ist die Verfügbarkeit der Chemokine. In dieser Arbeit wurde die Grundlage geschaffen, drei rekombinante humane Chemokine mit Hilfe zwei verschiedener Expressionsvektoren in *E. coli* zu exprimieren und die Möglichkeit, diese gezielt mit einer einfachen schnellen Methode reinigen zu können. Das Expressionssystem ermöglicht die tagfreie Expression und auch die Expression mit unterschiedlichen *tags*. Durch eine spezielle Konstruktion der DNA-Sequenzen von den Fusionsproteinen wird die Produktion der Chemokine mit ihrem natürlichen N-Terminus gewährleistet. Zudem können spezifische Änderungen wie Mutagenese und Isotopenmarkierung durchgeführt werden. Desweiteren wurde die Verbesserung der Zellyse durch die Kombination mehrerer Methoden und der daraus resultierenden erhöhten Freisetzung der löslichen Proteine in den Zellysatüberstand, welche zu einer besseren Ausbeute führt, dargestellt. Die Reduzierung der Endotoxinkonzentration durch die hier präsentierte einfache Methode, die Zugabe von 0,5% Triton X-114 ins Zellysat, ist für andere basische Chemokine anwendbar. Daher könnten die gereinigten Proteine auch in Aktivitätstests mit Zellen eingesetzt werden. Die entwickelte neuartige Reinigungsmethode basierend auf den physikalischen Eigenschaften von IL-8 ist für andere humane basische Chemokine kompatibel einsetzbar. Außerdem werden mit dieser Methode sowohl zeitaufwändige Arbeitsschritte wie Dialyse und Membranfiltration als auch daraus resultierende Proteinverluste

vermieden. Demzufolge können größere Mengen der für Bindungsstudien benötigten Chemokine hergestellt und direkt eingesetzt werden.

7 Literatur

1. Janeway, C.A. and P. Travers, *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease*. Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc., 1997. **2. Auflage**: p. 1-597.
2. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 675-705.
3. Yoshimura, T., et al., *Neutrophil chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1)*. J Immunol, 1987. **139**(3): p. 788-93.
4. Walz, A., et al., *Structure and properties of a novel neutrophil-activating factor (NAF) produced by human monocytes*. Agents Actions, 1989. **26**(1-2): p. 148-50.
5. Baggiolini, M., A. Walz, and S.L. Kunkel, *Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils*. J Clin Invest, 1989. **84**(4): p. 1045-9.
6. Bleul, C.C., et al., *A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1101-9.
7. Jose, P.J., et al., *Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 881-7.
8. Yoshimura, T., et al., *Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE*. FEBS Lett, 1989. **244**(2): p. 487-93.
9. Luster, A.D., S.M. Greenberg, and P. Leder, *The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 219-31.
10. Broxmeyer, H.E., *Regulation of hematopoiesis by chemokine family members*. Int J Hematol, 2001. **74**(1): p. 9-17.
11. Netelenbos, T., et al., *Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(2): p. 353-62.
12. Loetscher, P., et al., *Monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin 8 production by rheumatoid synoviocytes. Effects of anti-rheumatic drugs*. Cytokine, 1994. **6**(2): p. 162-70.
13. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 787-820.
14. Bacon, K., et al., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(10): p. 1067-8.
15. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines*. Adv Immunol, 1994. **55**: p. 97-179.
16. Askari, A.T., et al., *Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy*. Lancet, 2003. **362**(9385): p. 697-703.
17. Olson, T.S. and K. Ley, *Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. **283**(1): p. R7-28.
18. Kuschert, G.S., et al., *Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses*. Biochemistry, 1999. **38**(39): p. 12959-68.
19. Hoogewerf, A.J., et al., *Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines*. Biochemistry, 1997. **36**(44): p. 13570-8.

20. Patel, D.D., et al., *Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients*. Clin Immunol, 2001. **99**(1): p. 43-52.
21. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, Function and inhibition of chemokines*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2002. **42**: p. 469-499.
22. Luther, S.A. and J.G. Cyster, *Chemokines as regulators of T cell differentiation*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 102-7.
23. Mackay, C.R., *Chemokines: immunology's high impact factors*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 95-101.
24. Sozzani, S., et al., *Chemokines and dendritic cell traffic*. J Clin Immunol, 2000. **20**(3): p. 151-60.
25. Sozzani, S., et al., *Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties*. J Immunol, 1998. **161**(3): p. 1083-6.
26. Allavena, P., et al., *The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues*. Immunol Rev, 2000. **177**: p. 141-9.
27. Belperio, J.A., et al., *CXC chemokines in angiogenesis*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(1): p. 1-8.
28. Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis, *Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine*. FEBS Lett, 1992. **307**(1): p. 97-101.
29. Clore, G.M., et al., *Determination of the secondary structure of interleukin-8 by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. J Biol Chem, 1989. **264**(32): p. 18907-11.
30. Leonard, E.J. and T. Yoshimura, *Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8])*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1990. **2**(6): p. 479-86.
31. Barnes, P.F., et al., *Cytokine production induced by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure*. J Immunol, 1992. **149**(2): p. 541-7.
32. Tamura, M., et al., *Lipopolysaccharides of Bacteroides intermedius (Prevotella intermedia) and Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures*. Infect Immun, 1992. **60**(11): p. 4932-7.
33. Becker, S., J. Quay, and J. Soukup, *Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages*. J Immunol, 1991. **147**(12): p. 4307-12.
34. Eckmann, L., M.F. Kagnoff, and J. Fierer, *Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry*. Infect Immun, 1993. **61**(11): p. 4569-74.
35. Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia, *The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 593-620.
36. Freund, A., et al., *IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells*. Oncogene, 2003. **22**(2): p. 256-65.
37. Lowes, M.A., A.M. Bowcock, and J.G. Krueger, *Pathogenesis and therapy of psoriasis*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 866-73.
38. Keatings, V.M., et al., *Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 1996. **153**(2): p. 530-4.
39. Shirozu, M., et al., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*. Genomics, 1995. **28**(3): p. 495-500.
40. Crump, M.P., et al., *Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1*. EMBO J, 1997. **16**(23): p. 6996-7007.

41. Altenburg, J.D., et al., *A naturally occurring splice variant of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 is a potent human immunodeficiency virus type 1 inhibitor with weak chemotaxis and cell survival activities.* J Virol, 2007. **81**(15): p. 8140-8.
42. De La Luz Sierra, M., et al., *Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity.* Blood, 2004. **103**(7): p. 2452-9.
43. Nagasawa, T., H. Kikutani, and T. Kishimoto, *Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2305-9.
44. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development.* Nature, 1998. **393**(6685): p. 595-9.
45. Balabanian, K., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes.* J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35760-6.
46. Garacia-Zepada, E.A., Marc E. Rothenberg, Robert T. Ownbey, Jocelyn Celestin, Philip Leder und Andrew D. Luster, *Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia.* Nature Medicine, 1996. **2**: p. 449-456.
47. Crump, M.P., et al., *Solution structure of eotaxin, a chemokine that selectively recruits eosinophils in allergic inflammation.* J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22471-9.
48. Levina, V., et al., *Role of eotaxin-1 signaling in ovarian cancer.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(8): p. 2647-56.
49. Manns, J., et al., *The allergy-associated chemokine receptors CCR3 and CCR5 can be inactivated by the modified chemokine NNY-CCL11.* Allergy, 2007. **62**(1): p. 17-24.
50. Ponath, P.D., et al., *Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils.* J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2437-48.
51. Uguccioni, M., et al., *Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin.* J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 2379-84.
52. Hirai, K., et al., *Regulation of the function of eosinophils and basophils.* Crit Rev Immunol, 1997. **17**(3-4): p. 325-52.
53. Finkelman, F.D., et al., *Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses.* Immunol Today, 1991. **12**(3): p. A62-6.
54. Baggiolini, M., *Eotaxin: a VIC (very important chemokine) of allergic inflammation?* J Clin Invest, 1996. **97**(3): p. 587.
55. Gerard, C. and B.J. Rollins, *Chemokines and disease.* Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 108-15.
56. Bar-Eli, M., *Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma.* Pathobiology, 1999. **67**(1): p. 12-8.
57. Seitz, M., et al., *Interleukin-8 in inflammatory rheumatic diseases: synovial fluid levels, relation to rheumatoid factors, production by mononuclear cells, and effects of gold sodium thiomalate and methotrexate.* Rheumatol Int, 1992. **12**(4): p. 159-64.
58. Mattoli, S., et al., *Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(2): p. 299-301.
59. Minshall, E.M., et al., *Eotaxin mRNA and protein expression in chronic sinusitis and allergen-induced nasal responses in seasonal allergic rhinitis.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1997. **17**(6): p. 683-90.
60. Abbott, J.D., et al., *Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury.* Circulation, 2004. **110**(21): p. 3300-5.
61. Gan, L., et al., *[Promotion effect of stromal cell-derived factor 1 on the migration of epidermal stem cells in the healing process of frostbite-wound model ex vivo].* Zhonghua Shao Shang Za Zhi, 2010. **26**(3): p. 212-5.

62. Zhang, S., et al., *Tropism mechanism of stem cells targeting injured brain tissues by stromal cell-derived factor-1*. Chin J Traumatol, 2009. **12**(5): p. 263-8.
63. Bazan, H.A., et al., *Patterns of CCR5, CXCR4, and CCR3 usage by envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus type 1 primary isolates*. J Virol, 1998. **72**(5): p. 4485-91.
64. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 657-700.
65. Burns, J.M., et al., *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development*. J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2201-13.
66. Kryczek, I., et al., *Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(3): p. C987-95.
67. Bizzarri, C., et al., *ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets*. Pharmacol Ther, 2006. **112**(1): p. 139-49.
68. Baraldo, S., et al., *Neutrophilic infiltration within the airway smooth muscle in patients with COPD*. Thorax, 2004. **59**(4): p. 308-12.
69. Cairns, J.A. and A.F. Walls, *Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 275-83.
70. Sun, G., et al., *Interaction of mite allergens Der p3 and Der p9 with protease-activated receptor-2 expressed by lung epithelial cells*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 1014-21.
71. Kauffman, H.F., et al., *Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(6 Pt 1): p. 1185-93.
72. Borger, P., et al., *Proteases from Aspergillus fumigatus induce interleukin (IL)-6 and IL-8 production in airway epithelial cell lines by transcriptional mechanisms*. J Infect Dis, 1999. **180**(4): p. 1267-74.
73. Page, K., V.S. Strunk, and M.B. Hershenson, *Cockroach proteases increase IL-8 expression in human bronchial epithelial cells via activation of protease-activated receptor (PAR)-2 and extracellular-signal-regulated kinase*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **112**(6): p. 1112-8.
74. Van Dyke, T.E., et al., *Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis*. Infect Immun, 1980. **27**(1): p. 124-32.
75. Hjortoe, G.M., et al., *Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration*. Blood, 2004. **103**(8): p. 3029-37.
76. Brew, R., et al., *Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro*. Cytokine, 2000. **12**(1): p. 78-85.
77. Reiland, J., L.T. Furcht, and J.B. McCarthy, *CXC-chemokines stimulate invasion and chemotaxis in prostate carcinoma cells through the CXCR2 receptor*. Prostate, 1999. **41**(2): p. 78-88.
78. Kuwada, Y., et al., *Potential involvement of IL-8 and its receptors in the invasiveness of pancreatic cancer cells*. Int J Oncol, 2003. **22**(4): p. 765-71.
79. Conroy, D.M. and T.J. Williams, *Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung*. Respir Res, 2001. **2**(3): p. 150-6.
80. Lamkhioued, B., et al., *Increased expression of eotaxin in bronchoalveolar lavage and airways of asthmatics contributes to the chemotaxis of eosinophils to the site of inflammation*. J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4593-601.

81. Vasudevan, A.R., et al., *Eotaxin and obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(1): p. 256-61.
82. Furuta, R., et al., *Production and characterization of recombinant human neutrophil chemotactic factor*. J Biochem, 1989. **106**(3): p. 436-41.
83. Ali, S., et al., *Examination of the function of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta following interaction with heparin-like glycosaminoglycans*. J Biol Chem, 2000. **275**(16): p. 11721-7.
84. Goger, B., et al., *Different affinities of glycosaminoglycan oligosaccharides for monomeric and dimeric interleukin-8: a model for chemokine regulation at inflammatory sites*. Biochemistry, 2002. **41**(5): p. 1640-6.
85. Proudfoot, A.E., et al., *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1885-90.
86. Webb, L.M., et al., *Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7158-62.
87. Ellyard, J.I., et al., *Eotaxin selectively binds heparin. An interaction that protects eotaxin from proteolysis and potentiates chemotactic activity in vivo*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 15238-47.
88. Hebert, C.A., R.V. Vitangcol, and J.B. Baker, *Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding*. J Biol Chem, 1991. **266**(28): p. 18989-94.
89. Gayle, R.B., 3rd, et al., *Importance of the amino terminus of the interleukin-8 receptor in ligand interactions*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7283-9.
90. Clark-Lewis, I., et al., *Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3574-7.
91. Clark-Lewis, I., et al., *Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH2-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities*. J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 23128-34.
92. Gong, J.H. and I. Clark-Lewis, *Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH2-terminal residues*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 631-40.
93. Proudfoot, A.E., et al., *Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist*. J Biol Chem, 1996. **271**(5): p. 2599-603.
94. Huang, S., et al., *Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma*. Am J Pathol, 2002. **161**(1): p. 125-34.
95. Arenberg, D.A., et al., *Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice*. J Clin Invest, 1996. **97**(12): p. 2792-802.
96. Moser, B., et al., *Interleukin-8 antagonists generated by N-terminal modification*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7125-8.
97. Oberlin, E., et al., *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 833-5.
98. D'Souza, M.P. and V.A. Harden, *Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research*. Nat Med, 1996. **2**(12): p. 1293-300.
99. Simmons, G., et al., *Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist*. Science, 1997. **276**(5310): p. 276-9.

100. Wu, L., et al., *Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1373-81.
101. Baggiolini, M. and B. Moser, *Blocking chemokine receptors*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1189-91.
102. Bryan, S.A., et al., *Responses of leukocytes to chemokines in whole blood and their antagonism by novel CC-chemokine receptor 3 antagonists*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **165**(12): p. 1602-9.
103. Clark-Lewis, I., et al., *Chemical synthesis, purification, and characterization of two inflammatory proteins, neutrophil activating peptide 1 (interleukin-8) and neutrophil activating peptide*. Biochemistry, 1991. **30**(12): p. 3128-35.
104. Rajarathnam, K., et al., *Neutrophil activation by monomeric interleukin-8*. Science, 1994. **264**(5155): p. 90-2.
105. Kitaura, M., et al., *Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7725-30.
106. Li, H., et al., *High level expression and purification of active recombinant human interleukin-8 in Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2009. **68**(1): p. 60-4.
107. Holmes, W.D., et al., *Solution studies of recombinant human stromal-cell-derived factor-1*. Protein Expr Purif, 2001. **21**(3): p. 367-77.
108. Horcher, M., et al., *IL-8 derivatives with a reduced potential to form homodimers are fully active in vitro and in vivo*. Cytokine, 1998. **10**(1): p. 1-12.
109. Baneyx, F., *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(5): p. 411-21.
110. Sharma, S.S., F.R. Blattner, and S.W. Harcum, *Recombinant protein production in an Escherichia coli reduced genome strain*. Metab Eng, 2007. **9**(2): p. 133-41.
111. Studier, F.W., et al., *Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes*. Methods Enzymol, 1990. **185**: p. 60-89.
112. d'Alayer, J., N. Expert-Bezancon, and P. Beguin, *Time- and temperature-dependent acetylation of the chemokine RANTES produced in recombinant Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2007. **55**(1): p. 9-16.
113. Ryu, E.K., et al., *Crystal structure of recombinant human stromal cell-derived factor-1alpha*. Proteins, 2007. **67**(4): p. 1193-7.
114. Sorensen, H.P. and K.K. Mortensen, *Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli*. J Biotechnol, 2005. **115**(2): p. 113-28.
115. Gupta, J.C., et al., *Enhancing recombinant protein yields in Escherichia coli using the T7 system under the control of heat inducible lambda PL promoter*. J Biotechnol, 1999. **68**(2-3): p. 125-34.
116. Makrides, S.C., *Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli*. Microbiol Rev, 1996. **60**(3): p. 512-38.
117. Oppenheim, A.B., et al., *Vectors and transformed host cells for recombinant protein production at reduced temperatures*. International patent application, 1996. **WO 96/03521**.
118. Guzman, L.M., et al., *Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter*. J Bacteriol, 1995. **177**(14): p. 4121-30.
119. Kane, J.F., *Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 1995. **6**(5): p. 494-500.
120. Rudolph, R. and H. Lilie, *In vitro folding of inclusion body proteins*. FASEB J, 1996. **10**(1): p. 49-56.

121. Paavola, C.D., et al., *Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33157-65.
122. Bessette, P.H., et al., *Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13703-8.
123. Berthold, W. and J. Walter, *Protein purification: aspects of processes for pharmaceutical products*. Biologicals, 1994. **22**(2): p. 135-50.
124. Yoshimura, T., et al., *Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9233-7.
125. Koltermann, A., et al., *Production of human interleukin-8 expressed in Escherichia coli: from a laboratory scale for in vitro tests via a technical scale for animal studies to a process scale for a GMP-compatible production*. J Biotechnol, 1997. **54**(1): p. 29-42.
126. Proost, P., et al., *Purification and Identification of Natural Chemokines*. Methods, 1996. **10**(1): p. 82-92.
127. Eigenbrot, C., et al., *Structural change and receptor binding in a chemokine mutant with a rearranged disulfide: X-ray structure of E38C/C50AIL-8 at 2 Å resolution*. Proteins, 1997. **27**(4): p. 556-66.
128. Lindley, I., et al., *Synthesis and expression in Escherichia coli of the gene encoding monocyte-derived neutrophil-activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil-activating factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(23): p. 9199-203.
129. Cheng, H.T., et al., *A new protocol for high-yield purification of recombinant human CXCL8((3-72))K11R/G31P expressed in Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2008. **61**(1): p. 65-72.
130. Veldkamp, C.T., et al., *On-column refolding of recombinant chemokines for NMR studies and biological assays*. Protein Expr Purif, 2007. **52**(1): p. 202-9.
131. Clark, E.D.B., *Refolding of recombinant proteins*. Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(2): p. 157-63.
132. Lilie, H., E. Schwarz, and R. Rudolph, *Advances in refolding of proteins produced in E. coli*. Curr Opin Biotechnol, 1998. **9**(5): p. 497-501.
133. Fischer, B., I. Sumner, and P. Goodenough, *Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in Escherichia coli as inclusion bodies*. Biotechnol Bioeng, 1993. **41**(1): p. 3-13.
134. Chen, W.J., et al., *Recombinant human CXC-chemokine receptor-4 in melanophores are linked to Gi protein: seven transmembrane coreceptors for human immunodeficiency virus entry into cells*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(2): p. 177-81.
135. Gu, Z., Z. Su, and J.C. Janson, *Urea gradient size-exclusion chromatography enhanced the yield of lysozyme refolding*. J Chromatogr A, 2001. **918**(2): p. 311-8.
136. Chayen, N.E., *Turning protein crystallisation from an art into a science*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(5): p. 577-83.
137. Kapust, R.B. and D.S. Waugh, *Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused*. Protein Sci, 1999. **8**: p. 1668-1674.
138. Cho, H.J., et al., *Maltose binding protein facilitates high-level expression and functional purification of the chemokines RANTES and SDF-1alpha from Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2008. **60**(1): p. 37-45.
139. Gaberc-Porekar, V. and V. Menart, *Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography*. J Biochem Biophys Methods, 2001. **49**: p. 335-360.
140. Waugh, D.S., *Making the most of affinity tags*. Trends Biotechnol, 2005. **23**(6): p. 316-20.

141. Choi, S.I., et al., *Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: expression from Saccharomyces cerevisiae and its utilities in fusion protein technology*. Biotechnol Bioeng, 2001. **75**(6): p. 718-24.
142. Jenny, R.J., K.G. Mann, and R.L. Lundblad, *A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa*. Protein Expr Purif, 2003. **31**(1): p. 1-11.
143. Ye, J., L. Laws Kohli, and M.J. Stone, *Characterisation of Binding between the Chemokine Eotaxin and Peptides Derived from the Chemokine Receptor CCR3*. JBC, 2000. **275**, no **35**(September 1): p. 27250-27257.
144. Kapust, R.B., et al., *The P1' specificity of tobacco etch virus protease*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(5): p. 949-55.
145. Petsch, D. and F.B. Anspach, *Endotoxin removal from protein solutions*. J Biotechnol, 2000. **76**(2-3): p. 97-119.
146. Daneshian, M., et al., *In vitro pyrogen test for toxic or immunomodulatory drugs*. J Immunol Methods, 2006. **313**(1-2): p. 169-75.
147. Magalhaes, P.O., et al., *Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review*. J Pharm Pharm Sci, 2007. **10**(3): p. 388-404.
148. Ohno, N. and D.C. Morrison, *Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. Binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity*. J Biol Chem, 1989. **264**(8): p. 4434-41.
149. Ellass-Rochard, E., et al., *Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to Escherichia coli 055B5 lipopolysaccharide*. Biochem J, 1995. **312** (Pt 3): p. 839-45.
150. Anspach, F.B. and O. Hilbeck, *Removal of endotoxins by affinity sorbents*. J Chromatogr A, 1995. **711**(1): p. 81-92.
151. Issekutz, A.C., *Removal of gram-negative endotoxin from solutions by affinity chromatography*. J Immunol Methods, 1983. **61**(3): p. 275-81.
152. Karplus, T.E., R.J. Ulevitch, and C.B. Wilson, *A new method for reduction of endotoxin contamination from protein solutions*. J Immunol Methods, 1987. **105**(2): p. 211-20.
153. Aida, Y. and M.J. Pabst, *Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114*. J Immunol Methods, 1990. **132**(2): p. 191-5.
154. Liu, C.L., Y.J. Nikas, and D. Blankschtein, *Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems*. Biotechnol Bioeng, 1996. **52**(2): p. 185-92.
155. Reichelt, P., C. Schwarz, and M. Donzeau, *Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents*. Protein Expr Purif, 2006. **46**(2): p. 483-8.
156. Chen, Y.-C., et al., *A modified osmotic shock for periplasmic release of a recombinant creatinase from Escherichia coli*. Biochemical Engineering Journal, 2004. **19**: p. 211-215.
157. Stano, N.M., *T7 Lysozyme Represses T7 RNA Polymerase Transcription by Destabilizing the Open Complex during Initiation*. J Biol Chem, 2004: p. 1-34.
158. Amanda E. Proudfoot, T.N.W., Christine A. Power, *Chemokine Protocols*. Methods in Molecular Biology **138**.
159. Alouani, S., et al., *A fluorescent interleukin-8 receptor probe produced by targetted labelling at the amino terminus*. Eur J Biochem, 1995. **227**(1-2): p. 328-34.
160. Yu-Cheng Chen, L.-A.C., Shu-Jen Chen, Ming-Chung Chang, Teh-Liang Chen, *A modified osmotic shock for periplasmic release of a recombinant creatinase from Escherichia coli*. Biochemical Engineering Journal, 2004. **19**: p. 211-215.
161. Liu, S., et al., *Removal of endotoxin from recombinant protein preparations*. Clin Biochem, 1997. **30**(6): p. 455-63.

-
162. Chung, I.Y., et al., *Eotaxin and monocyte chemotactic protein-3 use different modes of action*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **314**(2): p. 646-53.
 163. Wu, X., et al., *Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in Escherichia coli: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **313**(1): p. 89-96.
 164. Fairbrother, W.J. and H.B. Lowman, *Molecular approaches to structure-function analysis of interleukin-8*. Methods Enzymol, 1997. **287**: p. 45-58.
 165. Sawers, G. and M. Jarsch, *Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol, 1996. **46**(1): p. 1-9.
 166. Strandberg, L. and S.O. Enfors, *Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 1991. **57**(6): p. 1669-74.
 167. Fahey, R.C., J.S. Hunt, and G.C. Windham, *On the cysteine and cystine content of proteins. Differences between intracellular and extracellular proteins*. J Mol Evol, 1977. **10**(2): p. 155-60.
 168. Kiefhaber, T., et al., *Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation*. Biotechnology (N Y), 1991. **9**(9): p. 825-9.
 169. Lowman, H.B., et al., *Monomeric variants of IL-8: effects of side chain substitutions and solution conditions upon dimer formation*. Protein Sci, 1997. **6**(3): p. 598-608.
 170. Van Coillie, E., et al., *Functional comparison of two human monocyte chemotactic protein-2 isoforms, role of the amino-terminal pyroglutamic acid and processing by CD26/dipeptidyl peptidase IV*. Biochemistry, 1998. **37**(36): p. 12672-80.
 171. Pfisteringer, J. and M. Mack, *Expression of chemokines in the periplasmic space of E. coli*. Methods Mol Biol, 2000. **138**: p. 41-5.
 172. Sooryanarayana, P.R. Adiga, and S.S. Visweswariah, *Hyperexpression of chicken riboflavin carrier protein: antibodies to the recombinant protein curtail pregnancy in rodents*. Protein Expr Purif, 1996. **7**(2): p. 147-54.
 173. Hou, D., et al., *Expression and one-step ion-exchange purification of (AAR)IL-8 (human IL-8 receptor antagonist)*. Protein Expr Purif, 2005. **44**(2): p. 104-9.
 174. Arnau, J., et al., *Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins*. Protein Expr Purif, 2006. **48**(1): p. 1-13.
 175. Shinkai, A., et al., *N-terminal domain of eotaxin-3 is important for activation of CC chemokine receptor 3*. Protein Eng, 2002. **15**(11): p. 923-9.
 176. Harun, N.O., et al., *The biological effects of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) recombinant interleukin-8*. Dev Comp Immunol, 2008. **32**(6): p. 673-81.
 177. Fernando, H., G.T. Nagle, and K. Rajarathnam, *Thermodynamic characterization of interleukin-8 monomer binding to CXCR1 receptor N-terminal domain*. FEBS J, 2007. **274**(1): p. 241-51.
 178. Lowman, H.B., et al., *Exchanging interleukin-8 and melanoma growth-stimulating activity receptor binding specificities*. J Biol Chem, 1996. **271**(24): p. 14344-52.
 179. Neu, H.C. and L.A. Heppel, *The release of enzymes from Escherichia coli by osmotic shock and during the formation of spheroplasts*. J Biol Chem, 1965. **240**(9): p. 3685-92.
 180. Hebert, C.A., et al., *Endothelial and leukocyte forms of IL-8. Conversion by thrombin and interactions with neutrophils*. J Immunol, 1990. **145**(9): p. 3033-40.
 181. Waugh, D.S., *TEV Protease FAQ*. National Cancer Institute: p. 1-5.
 182. Murphy, J.W., et al., *Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 alpha) binding to heparin*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 10018-27.
-

183. Shimoda, K., et al., *Interleukin-8 and hIRH (SDF1-alpha/PBSF) mRNA expression and histological activity index in patients with chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 1998. **28**(1): p. 108-15.
184. Veldkamp, C.T., et al., *The monomer-dimer equilibrium of stromal cell-derived factor-1 (CXCL 12) is altered by pH, phosphate, sulfate, and heparin*. *Protein Sci*, 2005. **14**(4): p. 1071-81.
185. Edgerton, M.D., et al., *Expression of chemokines in Escherichia coli*. *Methods Mol Biol*, 2000. **138**: p. 33-40.
186. Nakajima, T., et al., *Intracellular localization and release of eotaxin from normal eosinophils*. *FEBS Lett*, 1998. **434**(3): p. 226-30.
187. Ponath, P.D., et al., *Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(3): p. 604-12.
188. Garcia-Zepeda, E.A., Marc E. Rothenberg, Robert T. Ownbey, Jocelyn Celestin, Philip Leder und Andrew D. Luster, *Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia*. *Nature Medicine*, 1996. **2**: p. 449-456.
189. Ishi, Y., et al., *Cloning of rat eotaxin: ozone inhalation increases mRNA and protein expression in lungs of brown Norway rats*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(1 Pt 1): p. L171-6.
190. Morita, A., et al., *Development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for eotaxin and measurement of its levels in human blood*. *J Immunol Methods*, 1999. **226**(1-2): p. 159-67.
191. Keiler, K.C., P.R. Waller, and R.T. Sauer, *Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA*. *Science*, 1996. **271**(5251): p. 990-3.
192. Herman, C., et al., *Degradation of carboxy-terminal-tagged cytoplasmic proteins by the Escherichia coli protease HflB (FtsH)*. *Genes Dev*, 1998. **12**(9): p. 1348-55.
193. Wang, B.Q., L. Lei, and Z.F. Burton, *Importance of codon preference for production of human RAP74 and reconstitution of the RAP30/74 complex*. *Protein Expr Purif*, 1994. **5**(5): p. 476-85.
194. Hirel, P.H., et al., *Extent of N-terminal methionine excision from Escherichia coli proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(21): p. 8247-51.
195. Bardwell, J.C., *Building bridges: disulphide bond formation in the cell*. *Mol Microbiol*, 1994. **14**(2): p. 199-205.
196. Proba, K., L. Ge, and A. Pluckthun, *Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of Escherichia coli: influence of thioredoxin reductase (TrxB)*. *Gene*, 1995. **159**(2): p. 203-7.
197. Schein, C.H., *Formation of soluble recombinant proteins in Escherichia coli is favored by lower growth temperature*. *Biol Technology*, 1988. **6**: p. 291-294.
198. Jacques, N., J. Guillerez, and M. Dreyfus, *Culture conditions differentially affect the translation of individual Escherichia coli mRNAs*. *J Mol Biol*, 1992. **226**: p. 597-608.
199. Morrison, D.C. and D.M. Jacobs, *Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides*. *Immunochemistry*, 1976. **13**(10): p. 813-8.
200. de Haas, C.J., et al., *Affinities of different proteins and peptides for lipopolysaccharide as determined by biosensor technology*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **252**(2): p. 492-6.
201. Bordier, C., *Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution*. *J Biol Chem*, 1981. **256**(4): p. 1604-7.

202. Liu, C.L., et al., *Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998. **711**(1-2): p. 127-38.
203. Adam, O., et al., *A nondegradative route for the removal of endotoxin from exopolysaccharides*. Anal Biochem, 1995. **225**(2): p. 321-7.
204. Hou, K.C. and R. Zaniewski, *Endotoxin removal by anion-exchange polymeric matrix*. Biotechnol Appl Biochem, 1990. **12**(3): p. 315-24.
205. Wilson, M.J., et al., *Removal of tightly bound endotoxin from biological products*. J Biotechnol, 2001. **88**(1): p. 67-75.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Monomere von Interleukin-8 (CXCL8), SDF1(CXCL12) und Eotaxin-1 (CCL11) ..	12
Abb. 2: DNA-Fragment (Insert) und Vektor nach Restriktionsverdau mit den Restriktions- enzymen XmnI und NotI.....	17
Abb. 3: Ligation der DNA-Fragmentenden mit den Enden des geöffneten Vektors	17
Abb. 4: pET-System mit lac-Operator und lacI-Gen ^[114]	18
Abb. 5: Bindung des His ₆ -tag an Ni ²⁺ -Nitriloessigsäure, www.nanopros.com.....	21
Abb. 6: Struktur von Lipopolysacchariden ^[145]	23
Abb. 7: vollständige Wildtyp- cDNA-Sequenzen von SDF1 α und Eotaxin-1 im Expressions- vektor pReceiver	52
Abb. 8: Western Blots von den Proben der Expressionsanalyse von BL21 DE3 RIL mit den rekombinanten Vektoren nach Codonänderung mittels <i>sdm</i> PCR.....	55
Abb. 9: Amplifizierte cDNA ohne Signalpeptid für die Klonierung in pReceiver	58
Abb. 10: Der Expressionsvektor pReceiver nach dem Restriktionsverdau	58
Abb. 11: Kontroll-PCR-Ansätze nach Klonierung K1 auf 2%igen Agarosegelen	59
Abb. 12: Western Blots von den Proben der Expressionsanalyse von BL21 DE3 RIL mit den rekombinanten Vektoren, A, pReceiverSDF1 α o.P. B, pReceiverEotaxin-1 o.P.	60
Abb. 13: Codonoptimierte synthetische cDNAs von Eotaxin-1, Interleukin-8 und SDF1 α im Amplifikationsvektor pMA von der Firma MrGene.....	61
Abb. 14: Struktur der Inserts nach der PCR für die Klonierung K2	62
Abb. 15: Kontroll-PCR-Ansätze von Klonierung K2 auf einem 2%igem Agarosegel.....	62
Abb. 16: Western Blots von den Proben der Expressionsanalyse von BL21 DE3 pLysS mit den rekombinanten Vektoren pReceiverEotaxin-1K3TEV und pReceiverIL-8 K3TEV	63
Abb. 17: Western Blots von den Proben der Expressionsanalyse mit den rekombinanten Vektor pReceiverIL-8o.K3TEV; A, in BL21 DE3 RIL; B, in BL21 DE3	64
Abb. 18: Expressionsvektor pET22b, Multiple Cloning Site und exprimierbare tags.....	65
Abb. 19: Expressionsvektor pET28a, Multiple Cloning Site und exprimierbare tags.....	66
Abb. 20: Struktur der Inserts nach der PCR für Klonierung K3 in den Vektor pET28a	66
Abb. 21: Kontroll-PCR-Ansätze des Klonierungsversuches K3 auf 2%igem Agarosegel.....	67
Abb. 22: A, Expressionsvektor pET22b nach dem Restriktionsverdau mit NotI, B, Kontroll- PCR-Ansätze der cDNA von Eotaxin-1 im Expressionsvektor pET22b	67
Abb. 23: Kontroll-PCR-Ansätze von der cDNA für SDF1 α im Klonierungsexperiment K3	68
Abb. 24: SDS-Gel mit den Proben der Expressionsanalyse von pET22bIL-8 und pET28aIL-8 in BL21 DE3 RIL	69
Abb. 25: SDS-Gele mit den Proben der Expressionsansätze von Eotaxin-1 in BL21 DE3 RIL A, ohne His-tag und B, mit His-tag	70
Abb. 26: SDS-Gele mit den Proben der Expressionanalyse von SDF1 α in BL21 DE3 RIL; A, pET22bSDF1 α und B, pET28aSDF1 α	70
Abb. 27: Kontroll-PCR-Ansätze der cDNA vom Klonierungsexperiment K4	71
Abb. 28: SDS-Gel mit den Proben der Expressionsanalyse von Rosetta DE3 und BL21 DE3 RIL mit dem rekombinanten Vektor pET28aIL-8o.H	72

Abb. 29: SDS-Gel (A) und Western Blot (B) mit den Proben der Expressionsanalyse von BL21 DE3 RIL pET28aEotaxin-1o.H.....	73
Abb. 30: Peakflächen der Durchflussfraktionen (DF) und Fraktionen im NaCl-Gradienten von Chromatogrammen verschiedener Zellyseansätze.....	75
Abb. 31: Peakflächen der Durchflussfraktionen von Chromatogrammen verschiedener Zellyseansätze ohne und mit Gefrier-Tau-Zyklus (G-T-Zyklus).....	75
Abb. 32: Chromatogramm der Affinitätschromatographie mit einer Heparinsäule mit 100 µg gekauften rhIL-8	78
Abb. 33: Massenspektren von Interleukin-8	79
Abb. 34: Chromatogramm der Affinitätschromatographie an einer Heparinsäule mit 7 ml Zellysatüberstand von BL21 DE3 RIL pIL8tac.....	80
Abb. 35: SDS-Gele mit den FPLC-Fraktionen der Läufe 25-28 mit 10 µg Gesamtproteinmenge pro Probe, HiTrap Heparin FF 1 ml-Säule	81
Abb. 36: Massenspektren von FPLC-Fraktionen der Affinitätschromatographie an einer Heparinsäule, 7 ml Zellysatüberstand von BL21 DE3 RIL pIL8tac.....	82
Abb. 37: Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie mit 7 ml Zellysatüberstand von BL21 DE3 RIL pIL8tac	83
Abb. 38: SDS-Gel mit den FPLC-Fraktionen einer Kationenaustauschchromatographie, SP FF 1 ml-Säule, 10 µg Gesamtproteinmenge pro Probe	83
Abb. 39: Massenspektren der FPLC-Fraktionen von dem Test an der Kationenaustauschersäule, 7 ml eines Zellysatsüberstands	85
Abb. 40: Chromatogramm einer Kationenaustauschchromatographie, SP FF 1 ml-Säule, 20 ml Zellysatüberstand von BL21 DE3 RIL pET22bIL-8	86
Abb. 41: Massenspektren von FPLC-Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie nach Auftragung von 20 ml Zellysatüberstand.....	88
Abb. 42: Chromatogramm der Affinitätschromatographie an der Heparinsäule mit 26 ml der vereinten mit Puffer A2 verdünnten IL-8-haltigen Fraktionen vom Kationenaustauscher	89
Abb. 43: Chromatogramm der Gelfiltration mit 6 ml der gepoolten IL-8-haltigen Fraktionen von der Heparinsäule.....	89
Abb. 44: Massenspektren zur Reinheitskontrolle der IL-8 haltigen FPLC-Fraktionen	91
Abb. 45: SDS-Gel mit Proben der Expression, Zellyse und Reinigung von rekombinantem IL-8 ohne His-tag aus BL21 DE3 RIL pET22bIL-8.....	92
Abb. 46: Chromatogramm der Affinitätschromatographie mit einer HisTrap 5 ml-Säule von 12,5 ml Probenvolumen eines Ansatzes mit BL21 DE3 RIL pET28aIL-8.....	93
Abb. 47: Massenspektrum einer FPLC-Fraktion von der Reinigung des rhIL-8 mit His-tag mittels einer Nickelsäule	94
Abb. 48: SDS-Gel mit den Proben des TEV-Proteaseansatzes; HisIL-8-haltige entsalzte Fraktion	95
Abb. 49: Chromatogramm der Gelfiltration nach der Entfernung des His-tag im TEV-Proteaseansatz	96
Abb. 50: Massenspektrum nach der Reinigung von rhIL-8 mit His-tag.....	96
Abb. 51: Chromatogramm der Affinitätschromatographie mit einer HisTrap 1 ml-Säule mit 36 ml Probenvolumen eines Zellysatüberstandes von BL21 DE3 RIL pET28aSDF1α.....	97

Abb. 52: Massenspektrum der FPLC-Fraktion von der HisTrap-Säule nach der Rückfaltung des HisSDF1 α vor Beginn des Imidazolgradienten 98

Abb. 53: CD-Spektrum von Interleukin-8 in 100 mM NaF, Auswertung mit dem Algorithmus CDSSTR..... 99

Abb. 54: Endotoxinkonzentrationen von Proben mit rhIL-8 nach Entfernung der Lipopolysaccharide mit verschiedenen Methoden..... 101

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemikalien und Material.....	27
Tab. 2: Geräte und Software	29
Tab. 3: Verwendete Bakterienstämme (E. coli)	30
Tab. 4: Verwendete Medien und Antibiotika in der Zellkultur.....	30
Tab. 5: Verwendete cDNA (complementary DNA).....	32
Tab. 6: Verwendete Expressionsvektoren	32
Tab. 7: Verwendete Enzyme, Puffer und Lösungen für die Arbeiten mit DNA.....	32
Tab. 8: Lösungen und Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese	34
Tab. 9: Verwendete cDNA und Primer für die <i>sdm</i> PCR	35
Tab. 10: Zusammensetzung der Ansätze für die <i>sdm</i> PCR.....	35
Tab. 11: Verwendete Primer für die Klonierungen und Kontroll-PCR	36
Tab. 12: Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE.....	41
Tab. 13: Marker und Positivkontrollen für die SDS-PAGE.....	42
Tab. 14: Zusammensetzung der Trenngellösung und Sammelgellösung für die SDS-PAGE. 42	
Tab. 15: Eingesetzte Probenvolumina bei der SDS-PAGE.....	42
Tab. 16: Verwendete Puffer für die Western Blots	43
Tab. 17: Verwendete Antikörper für Western Blots	43
Tab. 18: Puffer und Lösungen für die Zellyse	44
Tab. 19: In der Chromatographie verwendete Puffer.....	46
Tab. 20: In der Chromatographie eingesetzte Säulen	47
Tab. 21: Verwendete Lösungen für MALDI-MS.....	49
Tab. 22: Eingesetzte cDNA und zu veränderndes Codon mittels <i>sdm</i> PCR.....	53
Tab. 23: Verwendete Primer für <i>sdm</i> PCR mit den Gesequenzen von Eotaxin-1 und SDF1 α . 53	
Tab. 24: Sequenzen der cDNA für Eotaxin-1 und SDF1 α nach der <i>sdm</i> PCR.....	53
Tab. 25: Erkennungssequenzen und Schnittstellen der Restriktionsenzyme	56
Tab. 26: Klonierungsexperimente K1-K4.....	57
Tab. 27: Ergebnis der Sequenzierung der cDNA vom Klonierungsexperiment K1	59
Tab. 28: Ergebnis der Sequenzierung der cDNA nach dem Klonierungsexperiment K2.....	63
Tab. 29: Ergebnis der Sequenzierung der cDNAs nach dem Klonierungsexperiment K3	68
Tab. 30: Ergebnis der Sequenzierung der cDNAs nach dem Klonierungsexperiment K4	72
Tab. 31: Vergleich der Peakflächen der Chromatogramme von Zelllysaten nach Bearbeitung mit verschiedenen Zellysemethoden.....	74
Tab. 32: Peakflächen der Durchflussfraktion und Fraktionen im NaCl-Gradient von Chromatogrammen der Überstände von den vereinigten Pellets der Zelllysate nach Einwirkung von DNaseI.....	76

10 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BBXB	B basische Aminosäure, X beliebige Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure
BL21 DE3, BL21 DE3 RIL oder pLysS	<i>E. coli</i> Expressionsstämme
bp	Basenpaar
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Circular Dichroism
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CDSSTR	Algorithmus zur Auswertung von CD-Spektren
CHAPS	Ein zwitterionisches Detergenz
CIEX	Cation exchange chromatography
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CV	Säulenvolumen, engl. column volume
CXCR	Chemokinrezeptor
Da	Dalton
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxytyrosintriphosphat
DE3	Gen für T7-RNA-Polymerase
DF und X1	Durchflussfraktion eines FPLC-Laufes
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

10. Abkürzungsverzeichnis

ELR ⁺	Aminosäuremotiv im N-Terminus einiger CXC-Chemokine
Eotaxin-1	Eotaxin-1, Chemokin, CC-Familie, CCL11
EU	Endotoxin Units
F1-xx oder A1-xx	Fraktionen der Chromatographieläufe
FLAG-tag	Octapeptid für Affinitätschromatographie
FPLC	Fast performance liquid chromatography
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAG	Glykosaminoglykane
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein gekoppelter Rezeptor Kinase
GSH/GSSG	reduziertes Glutathion/ oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
G-T-Zyklus	Gefrier-Tau-Zyklus (Zelllysemethode)
GuHCL	Guanidin-HCL
HCl	Salzsäure
HIC	Hydrophobe Interactions Chromatography
HisIL-8, HisSDF1 α , HisEotaxin-1	Chemokine mit His-tag
His ₆ -tag oder His-tag	Sechs Histidinreste für die Affinitätschromatographie mit einer Nickelsäule
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IEX	Ion exchange chromatography
IL	Interleukin
IL-8	Interleukin-8, Chemokin, CXC-Familie, CXCL8
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
K3TEV	3 Lysinreste gefolgt von einer TEV-Proteaseerkennungsequenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharide
mAU	Milliabsorptionseinheiten
MBP	Maltose Binding Protein
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1

MCS	Multiple cloning site
mRNA	Messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAP-2	Neutrophil activating protein-2
NK	Natürliche Killerzellen
NTA	Nitrilotriacetic acid
NusA	Fusionsprotein, das die Löslichkeit verbessert
o.P.	Ohne Precursor, ohne Signalpeptid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ompA	Signalpeptid für den Transport in den periplasmatischen Raum
ori	Replikationsstartpunkt eines Plasmids
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. Polymerase chain reaction
PDB	Proteindatenbank
pDNA	Plasmid-DNA
pelB	Signalpeptid für den Transport in den periplasmatischen Raum
pET	Expressionsvektor /Plasmid mit T7-Promotor (Expression durch T7-RNA-Polymerase)
pET22b, pET28a	Expressionsvektoren
pI	Isoelektrischer Punkt
pReceiver	Expressionsvektor
P _{trp} , P _{phoA} und P _{tac}	Promotoren
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
rEotaxin-1, rhEotaxin-1, Eotaxin-1	rekombinantes humanes Eotaxin-1
rIL-8, rhIL-8 und IL-8	rekombinantes humanes Interleukin-8
RNA	Ribonukleinsäure, engl. Ribonucleic acid

10. Abkürzungsverzeichnis

ROS	Reactive oxygen species
Rosetta DE3	<i>E. coli</i> Expressionsstamm
RP-HPLC	Reverse phase High Performance Liquid Chromatography
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
rSDF1 α , rhSDF1 α und SDF1 α	rekombinanter humaner Stromal cell derived factor-1 α
Rt und RT	Raumtemperatur
SDF1	Stromal cell derived factor-1, Chemokin, CXCL12
<i>sdm</i>	site-directed mutagenesis
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, engl. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Tab.	Tabelle
TAP302	Expressionsstamm, Thioredoxin-Reduktase defizient
TBS	Trisgepufferte Salzlösung, engl. tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methyl-ethylenediamine
TEV	Tobacco Etch Virus
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtskulturen
UV	ultraviolettes Licht
Wb und WB	Western Blot
Wt	Wildtyp
ZK	Zellkultur
λ P _L	Promotor aus dem Lambdaphagen

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Katja Schmitz angefertigt. Ich möchte mich bei ihr für die intensive Betreuung, vor allem für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Hilfe bei der Bearbeitung von Präsentationen bedanken.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Stefan Bräse, für die Möglichkeit an einem sehr interessanten Thema arbeiten zu dürfen und für seine Bereitschaft, mich bei Fragen und Problemen immer an Ihn wenden zu können.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Das Projekt wurde durch das Konzept für die Zukunft des KIT mit der Exellenzinitiative und durch das KIT Kompetenzfeld „Applied Life Science“ finanziert.

Ich bedanke mich bei der Firma Bayer Schering Pharma AG, dass sie uns den rekombinanten Vektor pIL8/tac zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Arbeitskollegen für die gute Atmosphäre und Zusammenarbeit bedanken, besonders bei Ebru Diler und Dorothea Helmer für die interessanten wissenschaftlichen und auch philosophischen Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern der Analytikgruppe von Herrn Dr. Gerald Brenner-Weiß, vor allen Dingen Herrn Boris Kühl und Herrn Frank Kirschhöfer, für die große Hilfsbereitschaft und die fachkompetenten Ratschläge zum Thema MALDI-MS und HPLC.

Bei Frau Dr. Ute Schepers bedanke ich mich ganz herzlich für die Einführung in die Welt der Chromatographie.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Matthias Franzreb und von Herrn Dr. Thomas Schwartz für die gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit bedanken.

Frau Ines Röhrig danke ich ganz herzlich für die Hilfestellung bei Problemen mit den MS Office Programmen. Bei Werner Bernshausen bedanke ich mich für die Hilfe und Unterstützung in den letzten 10 Jahren.

Meinem Freund Harald danke ich von ganzem Herzen für die Wartung meines Computers und dass er immer für mich da ist.

Zuletzt und im besonderen Maße möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Mutter und meiner Schwester Lena bedanken. Meiner Mutter danke ich besonders für die seelische Unterstützung, dass sie mein ganzes Leben lang an mich geglaubt hat und immer für mich da war. Diese Arbeit wäre ohne sie nicht möglich gewesen. Lena danke ich dafür, dass sie immer zu mir steht und für die stundenlangen Gespräche.

12 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Poster

I. Meliciani, M.Döbele, D. Wiese, D. Maisch, Katja Schmitz; From molecular modeling and binding assays to tailored ligands for chemokines of leukocytes; 2008, EMBL Chemical Biology Meeting, Heidelberg

Irene Meliciani, Dana Wiese, Wolfgang Wenzel, Katja Schmitz; Modelling and screening of small-molecule ligands; 2009, Research program BioInterfaces, Karlsruhe

Dana Wiese and Katja Schmitz; Expression and purification of recombinant chemokines; 2009, CFN Summer School on Nano-Biology, Bad Herrenalb

Dana Wiese and Katja Schmitz; Expression and purification of recombinant chemokines for binding studies and cell migration assays; 2010, EMBO Conference Series 2010: Chemical Biology, Heidelberg

Paper

Dana Wiese, Katja Schmitz; Expression of recombinant human interleukin-8 and its purification using a single buffer system, *Journal of Immunological Methods*, 2010, In Press, Available online 18. November 2010

13 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dana Wiese
Geburtsdatum: 24.04.1979
Geburtsort: Potsdam-Babelsberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Insterburger Str. 21D, 76139 Karlsruhe

Ausbildung

Sept. 1985 – Juli 1991 Amilcar-Cabral-Oberschule, Teltow
Aug. 1991 – Juni 1998 Immanuel-Kant-Gymnasium, Teltow
Okt. 1998 – Sept. 2004 Studium in der Fachrichtung Diplom-Biologie,
Universität Potsdam

Beruflicher Werdegang

Juni 2002 – Okt. 2003 Studentische Hilfskraft im Max-Planck-Institut (MPI) für
Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm
Nov. 2003 – Sept. 2004 Diplomandin im MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie,
Golm
Thema: Physiologische Untersuchungen zur Frosttoleranz
verschiedener Ökotypen von *A. thaliana*
Dez. 2004 – Jan. 2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in den Unikliniken Mainz
Projekt: Die pathobiochemischen Prozesse der Arteriosklerose am Mausmodell
Febr. 2007 – Dez. 2007 Bewerbungsphase, Teilnahme an Sprachkursen

13. Lebenslauf

seit Jan. 2008 Doktorandin am Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Thema: Herstellung rekombinanter humaner Chemokine
in *E. coli*: Etablierung von Methoden zur Expression, Reinigung und Endotoxinentfernung

Kenntnisse

EDV Microsoft Word, Excel, Power Point, Unicorn 5.0

Grundkenntnisse: Graph Pad Prism 3.03, Peak Net 5.1,
Proteomweaver, BioEdit, Corel Draw X3, Endnote X3

Fremdsprachen Englisch

Weiterbildung

Juni 2006 - Juli 2006 Praktikum: Methoden der zellulären Immunologie,
Unikliniken Mainz

Apr. 2008 – Febr. 2009 Vorlesungen: Organische Chemie I und II
Universität Karlsruhe, KIT

Juni 2008 Fortbildungsveranstaltung: Brandschutzhelfer, KIT

Febr. 2010 Kurs: ÄKTA design systems and UNICORN control software,
GE Healthcare, München