

Klonierung und Expression  
der Gelatin-Bindungsdomäne aus Fibronectin  
und aus der Gelatinase A  
in *Escherichia coli*

Diplomarbeit vorgelegt von

Jörn Schnepel

Prof. Dr. H. Tschesche

Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

Bielefeld, Juni 1997

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Prof. Dr. H. Tschesche in der Zeit von Dezember 1996 bis Juni 1997 an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld.

Herrn Prof. Dr. H. Tschesche danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dipl. Chem. Michaela Kröger und Herrn Dipl. Chem. Jens Unger für die gute Betreuung während meiner Diplomarbeit. Ihre ständige Bereitschaft zu gemeinsamen Diskussionen und ihre wertvollen Ratschläge waren mir eine große Hilfe und ermöglichten ein erfolgreiches Bearbeiten der gestellten Aufgabe.

Desweiteren möchte ich Frau Dipl. Chem. Heike Hölscher für ihre ständige Bereitschaft, mich bei genetischen sowie proteinchemischen Fragen zu unterstützen, danken.

Für die Durchführung der DNA- und Protein-Sequenzierung danke ich Frau Sabine Grabolle und Herrn Marc-Oliver Luther.

Weiteren Dank möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und die kollegiale Zusammenarbeit aussprechen.

Einen ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die durch ihre Unterstützung das Studium ermöglicht haben und stets Interesse an dieser Arbeit gezeigt haben.

---

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Abkürzungen

<u>1.1. Allgemeines</u>	1
<u>1.2. DNA-Basen</u>	2
<u>1.3. Aminosäuren</u>	2

## 2. Einleitung

<u>2.1. Die extrazelluläre Matrix (ECM)</u>	3
<u>2.2. Fibronectin</u>	4
2.2.1. Struktur und Funktion	4
2.2.2. Fibronectin-Varianten durch alternatives Spleißen	5
2.2.3. Fibronectine in physiologischen Prozessen	7
<u>2.3. Matrixmetalloproteinasen</u>	8
2.3.1. Domänenstruktur der MMPs	9
2.3.2. Tumorbildung und Metastasierung	11
<u>2.4. Typ IV-Kollagenasen</u>	12
2.4.1. Kollagene	12
2.4.2. Typ IV-Kollagen	13
2.4.3. Typ IV-Kollagenasen	14

## 3. Zielsetzung

## 4. Zusammenfassung der Ergebnisse

## 5. Materialien und Geräte

<u>5.1. Materialien</u>	22
5.1.1. Antibiotika	22
5.1.2. Enzyme	22
5.1.3. Standard-Marker	22
5.1.4. Farbstoffe	22
5.1.5. Chemikalien	23
5.1.6. Materialien für Säulenchromatographie	23
5.1.7. Sonstige Materialien	23

<u>5.2. Geräte</u>	24
<u>5.3. Bakterienstämme</u>	24
5.3.1. <i>Escherichia coli</i> [INV $\alpha$ F']	25
5.3.2. <i>Escherichia coli</i> [JM 83]	25
5.3.3. <i>Escherichia coli</i> [BL21(DE3)]	25
5.3.4. <i>Escherichia coli</i> [HMS174(DE3)]	26
<u>5.4. Vektoren</u>	26
5.4.1. pCR <sup>TM</sup> II-Vektor	26
5.4.2. pET-11a-Vektor	27
5.4.3. pET-12b-Vektor	28
5.4.4. pET-15b-Vektor	28

## 6. Methoden

### I. Gentechnische Methoden

<u>6.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>-Stämmen</u>	30
6.1.1. Übernachtkulturen	30
6.1.2. Tiefkühlkulturen	31
<u>6.2. DNA-Gelelektrophorese in Agarosegelen</u>	31
6.2.1. Durchführung der Gelelektrophorese	32
6.2.2. Färbung der DNA im Agarosegel	33
6.2.3. Größenbestimmung der DNA-Fragmente	33
<u>6.3. Isolierung von Plasmid-DNA</u>	34
6.3.1. Alkalische Mini-Lyse	34
6.3.2. Plasmidisolierung nach „QIAprep <sup>TM</sup> -Spin“	35
<u>6.4. DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen</u>	36
6.4.1. Elektroelution im Dialyse-Schlauch	36
6.4.2. Isolierung mittels „RF <sup>TM</sup> -Purification“	36
<u>6.5. Reinigung von DNA</u>	37
6.5.1. Phenolextraktion	37
6.5.2. Ethanol-fällung	37
6.5.3. Isopropanol-fällung	38
<u>6.6. Polymerase-Chain-Reaction (PCR)</u>	39
<u>6.7. Klonierung mittels <i>TA Cloning Kit</i></u>	40
6.7.1. Ligation	40
6.7.2. Transformation mittels <i>TA Cloning Kit</i>	41
6.7.3. Screening nach positiven Klonen	42

<u>6.8. Klonierung in Expressionsvektoren</u>	42
6.8.1. Restriktion von DNA	43
6.8.2. 5'-Dephosphorylierung von Vektoren	43
6.8.3. Ligation von DNA-Fragmenten	44
6.8.4. Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	44
6.8.5. Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	45

## **II. Proteinchemischer Methoden**

<u>6.9. Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i></u>	46
6.9.1. Anwachsen der Expressionskultur	46
6.9.2. Induktion der Expression	47
6.9.3. Expressionskontrolle	47
6.9.4. Zellyse, Reinigung und Aufschluß der „ <i>inclusion bodies</i> “	48
<u>6.10. SDS-Gelelektrophorese</u>	49
6.10.1. Durchführung der SDS-Gelelektrophorese	49
6.10.2. Vorbereitung der Proben	50
6.10.3. Coomassie-Blue-Färbung	51
6.10.4. Silberfärbung	51
<u>6.11. Sequenzierung</u>	52
6.11.1. Sequenzblotting	52
6.11.2. Mikrosequenzierung nach Edman	53
<u>6.12. Proteinaufreinigung durch Säulenchromatographie</u>	53
6.12.1. Ionenaustauschchromatographie	53
6.12.2. Gelfiltration	54
6.12.3. Affinitätschromatographie an der Ni-NTA-Säule	55
6.12.4. Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose 4B	56
<u>6.13. Faltungs- und Aktivitätsexperimente</u>	57
6.13.1. Faltung durch Dialyse	57
6.13.2. Faltung durch Verdünnung	57
6.13.3. Faltung an Ni-NTA-Agarose	58
6.13.4. Gelatin-Substratgel	60

## **7. Ergebnisse**

<u>7.1. Klonierung der cDNA der Domänen FnColA, FnColB, FnGel72 und FnKat72</u>	63
7.1.1. PCR-Amplifizierung der cDNA-Fragmente	63

7.1.2. Klonierung der PCR-Produkte in den pCR <sup>TM</sup> II-Vektor	66
7.1.3. DNA-Sequenzierung der klonierten PCR-Amplifikate	67
7.1.4. Umklonieren der DNA-Fragmente in Expressionsvektoren	68
<u>7.2. Expression der Typ IV-Kollagenase FnColA</u>	72
7.2.1. Testexpression des FnColA-Proteins	72
7.2.2. Identitätsnachweis von FnColA durch N-terminale Sequenzierung	73
7.2.3. Großexpression des FnColA-Proteins	74
<u>7.3. Expressionsversuche der Typ IV-Kollagenase FnColB</u>	74
<u>7.4. Expression der fibronectinähnlichen Domäne FnGel72</u>	75
7.4.1. Testexpression des FnGel72-Proteins	75
7.4.2. Identitätsnachweis von FnGel72 durch N-terminale Sequenzierung	76
7.4.3. Großexpression des FnGel72-Proteins	77
<u>7.5. Expression der fibronectinähnlichen Domäne mit katalytischem Zentrum FnKat72</u>	77
7.5.1. Testexpression des FnKat72-Proteins	77
7.5.2. Identitätsnachweis von FnKat72 durch N-terminale Sequenzierung	79
7.5.3. Großexpression des FnColA-Proteins	79
<u>7.6. Zellyse und Aufschluß der „inclusion bodies“</u>	80
<u>7.7. Aufreinigung der Typ IV-Kollagenase FnColA</u>	81
7.7.1. Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose	81
7.7.2. Gelfiltration an einer Sephacryl S-100-Säule	82
<u>7.8. Aufreinigung des FnKat72-Proteins</u>	83
7.8.1. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose	83
7.8.2. Gelfiltration an einer Sephacryl S-100-Säule	84
<u>7.9. Faltungsexperimente</u>	85
7.9.1. Faltung im Verdünnungsansatz	85
7.9.2. Faltung durch Dialyse	86
7.9.3. Faltung von FnColA an Ni-NTA-Agarose	86
<b>8. Diskussion</b>	
<u>8.1. Klonierung und Expression</u>	87
<u>8.2. Aufreinigung</u>	89
<u>8.3. Faltungsexperimente</u>	89
<u>8.4. Ausblick</u>	90
<b>9. Literatur</b>	92

---

# 1. Abkürzungen

## 1.1. Allgemeines

Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
cDNA	copy-DNA
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
ib	inclusion body
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
lacZ	$\beta$ -Galactosidase-Gen
LB	Luria Broth
LMW	Low Molecular Weight
M	molar
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA-Tris
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

---

U	Unit
üN	über Nacht
v/v	Volumenverhältnis
w/v	Gewichts-Volumenverhältnis
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosid

### 1.2. DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

### 1.3. Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin



## 2. Einleitung

### 2.1. Die extrazelluläre Matrix (ECM)

Sowohl die Entwicklung als auch die normale Funktionalität aller Zellen im lebenden Organismus hängt von den Wechselwirkungen von Molekülen mit ihrer Umgebung ab. Die Hauptklassen von Molekülen, die zelluläre Funktionen regulieren, sind Wachstumsfaktoren, Zell-Adhäsionsmoleküle und Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM). Als ECM wird der Raum zwischen den Zellen bezeichnet, der von einem komplexen Makromolekülgeflecht ausgefüllt wird. Zusammen mit den Zellen stellt die ECM das organische Gewebe dar.<sup>[1]</sup>

Hauptbestandteile der ECM sind sehr unterschiedliche Moleküle wie Strukturproteine (z.B. Kollagene und Elastin), Adhäsionsproteine (z.B. Fibronectin und Laminin) und Proteoglykane. Diese Proteine lassen sich wiederum in Unterklassen einteilen, die untereinander große Unterschiede aufweisen. So sind z.B. mehr als 14 Kollagene und eine ähnliche Anzahl von adhäsiven Glykoproteinen bekannt. Mehrere Gene und alternatives Spleißen tragen außerdem zu der Mannigfaltigkeit dieser Klassen von ECM-Bestandteilen bei.<sup>[2],[3],[4]</sup>

Durch unterschiedliche Zusammensetzung und Strukturierung der ECM-Komponenten kann die extrazelluläre Matrix stark in ihren physikalischen Eigenschaften variieren und so unterschiedliche Gewebe wie Blutgefäße, Sehnen, Knorpel, Knochen oder Basalmembranen ausbilden. Die ECM trägt somit zu mechanischen Eigenschaften, wie z.B. Starrheit oder Elastizität, verschiedener Gewebe und Organe bei.

Die ECM ist kein inertes, stabiles Gewebe. Zu ihrer Erhaltung ist ein fein reguliertes, dynamisches Gleichgewicht aus Matrixaufbau und Matrixabbau notwendig. Dieses dynamische Gleichgewicht spielt eine wichtige Rolle für die physiologischen Funktionen der extrazellulären Matrix und der in sie eingebetteten Zellen. Die an der Degradierung der ECM beteiligten Proteinase werden nach Art ihres katalytischen Zentrums in fünf Klassen eingeteilt : Serinproteinase, Cysteinproteinase, Aspartatproteinase, Threoninproteinase und Metallo-proteinase.<sup>[5]</sup>

Auch bei pathologischen Prozessen spielt das Gleichgewicht eine Rolle. Hier unterliegt der Regulationsmechanismus einer Störung, so daß das Gleichgewicht in Richtung Matrixabbau verschoben wird. Die gestörte Balance zwischen matrixabbauenden Proteinase und ihren Inhibitoren führt zu chronischen Veränderungen der ECM (z.B. rheumatoide Arthritis oder Osteoarthritis).<sup>[6]</sup>

Eine wichtige Klasse der ECM-abbauenden Proteinase sind die Matrixmetalloproteinase, die den Hauptbestandteil der ECM, die Kollagene, abbauen.<sup>[7]</sup> Bei der Regulation des Matrixumbaus spielt das Fibronectin als Adhäsionsmolekül eine bedeutende Rolle.

## 2.2. Fibronektin

### 2.2.1. Struktur und Funktion

Fibronektine sind makromolekulare Glykoproteine und kommen in der extrazellulären Matrix, auf vielen Zelloberflächen und im Blutplasma vor. Ihr Name leitet sich von den lateinischen Wörtern *fibra* (Faser) und *nectere* (kleben, binden) ab und beschreibt somit auch ihre Funktion. Fibronektine bestehen aus zwei Polypeptidketten (235-250 kDa), welche durch zwei Disulfidbrücken nahe ihrer Carboxylenden miteinander verknüpft sind. Sie unterstützen die Zell-Adhäsion und die Organisation des Cytoskelettes einer Zelle. Somit bewirken sie die Migration, Morphologie und Differenzierung.

Beide Untereinheiten setzen sich aus Domänen mit unterschiedlicher Struktur und Funktionalität zusammen.<sup>[2],[8]</sup> In Abb.1 ist die Domänenstruktur mit den entsprechenden Bindungsaffinitäten dargestellt :

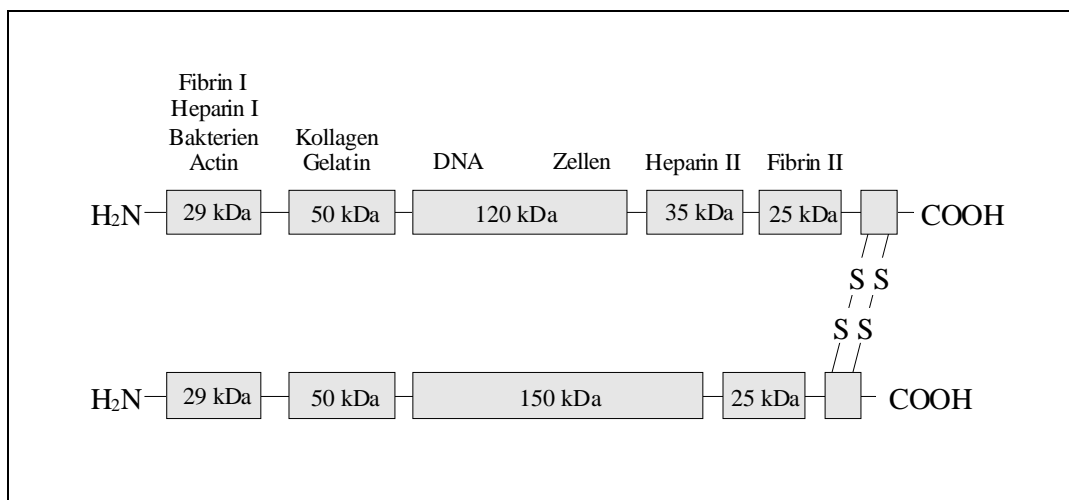


Abb.1: Domänenstruktur von Fibronektin

Die 29 kDa große Domäne am N-Terminus ist die Fibrin I- bzw Heparin I-Bindungsdomäne. Sie zeigt außerdem Bindungsaffinität zu Bakterien und Actin. Es folgt die 50 kDa große Gelatin-Bindungsdomäne, die auch Kollagen bindet. Im Zentrum der Untereinheit liegt die Zell-Bindungsdomäne (120 kDa). Am C-terminalen Ende folgen die Heparin II-Bindungsdomäne (35 kDa) und die Fibrin II-Bindungsdomäne (25 kDa). In der zweiten Untereinheit beträgt die Größe der Zell-Bindungsdomäne 150 kDa, dafür fehlt jedoch die Heparin II-Domäne.

Jede Polypeptidkette setzt sich aus drei Typen von Aminosäuresequenzen (I, II, III) zusammen. Es existieren 12 Typ I-Sequenzen, jede 45 Aminosäuren groß, aufgeteilt in drei Gruppen. Benachbart liegen zwei Typ II-Sequenzen (60 AS) und 15-17 Typ III-Sequenzen, ca. 90 AS groß (Abb.2).

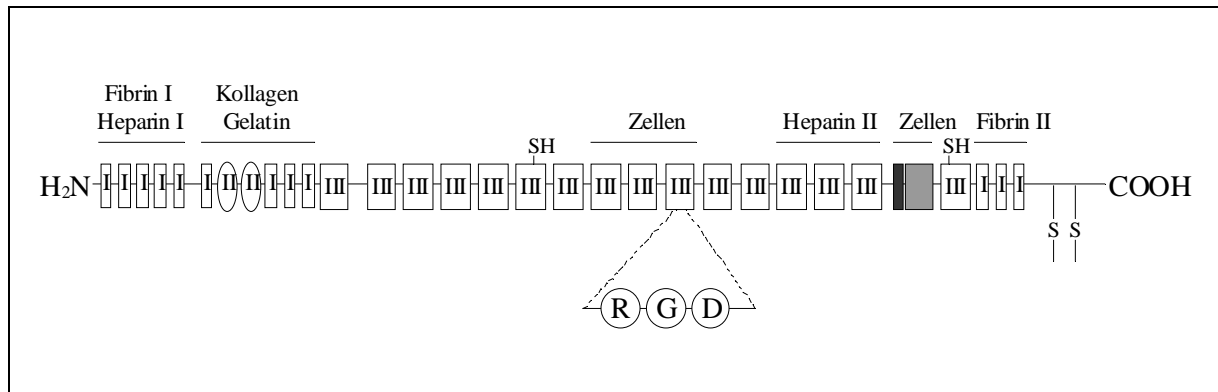


Abb.2 : Gliederung einer Polypeptidkette des Fibronectins in Aminosäuresequenzen

Die Typ I- und Typ II-Sequenzen enthalten jeweils zwei Disulfidbrücken, welche in der Typ III-Sequenz fehlen. Außerdem existieren, wie in Abb.2 ersichtlich, jeweils zwei freie Cysteine pro Polypeptidkette. Die Sequenzen vom Typ III sind sich zwar ähnlich, aber keinesfalls immer identisch. So unterscheidet sich der Typ III in der ersten Zellbindungsdomäne von den restlichen Typ III-Abschnitten durch die Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (R-G-D). Diese Sequenz ermöglicht die Bindung an Zelloberflächen-Rezeptoren (z.B. Integrine). Auch unter den Typ I- und Typ II-Abschnitten gibt es geringe Sequenzabweichungen, die für unterschiedliche Bindungsspezifitäten verantwortlich gemacht werden. Außerdem kann die Anzahl der einzelnen Typen von Untereinheit zu Untereinheit variieren.<sup>[9]</sup>

### 2.2.2. Fibronectin-Varianten durch alternatives Spleißen

Man unterscheidet zwischen zwei Arten von Fibronectinen : den Plasma-Fibronectinen (PFn) und den Zelloberflächen-Fibronectinen (ZFn). Sie unterscheiden sich durch zwei fehlenden Typ III-Abschnitte bei den PFn. Plasma-Fibronectine sind lösliche Dimere, die von Leberzellen, Endothelzellen und Makrophagen sezerniert werden und sich frei im Blutstrom bewegen. PFn sind weniger morphologisch aktiv, tragen jedoch zur Blutgerinnung bei.

Die Zelloberflächen-Fibronektine werden von einer ganzen Reihe von Zellen (z.B. Epithelzellen, Fibroblasten, Chondrozyten, Myoblasten) synthetisiert und auf deren Oberfläche gebunden. Es handelt sich hierbei ebenfalls um Dimere, die jedoch durch weitere Disulfidbrücken zu Fibrillen und anderen Zellen hochmolekulare Strukturen ausbilden. Aufgrund dieser hohen Affinität zu Zellen und Makromolekülen, wie z.B. Kollagen oder Fibrin, sind sie überwiegend am Gewebeaufbau beteiligt.<sup>[10]</sup>

Mit Hilfe unterschiedlicher Spleißprozesse können aus dem einzigen vorhandenen Fibronektin-Gen beide Proteinvarianten entstehen. In Abb.3 ist ein alternativer Spleißprozeß schematisch dargestellt :

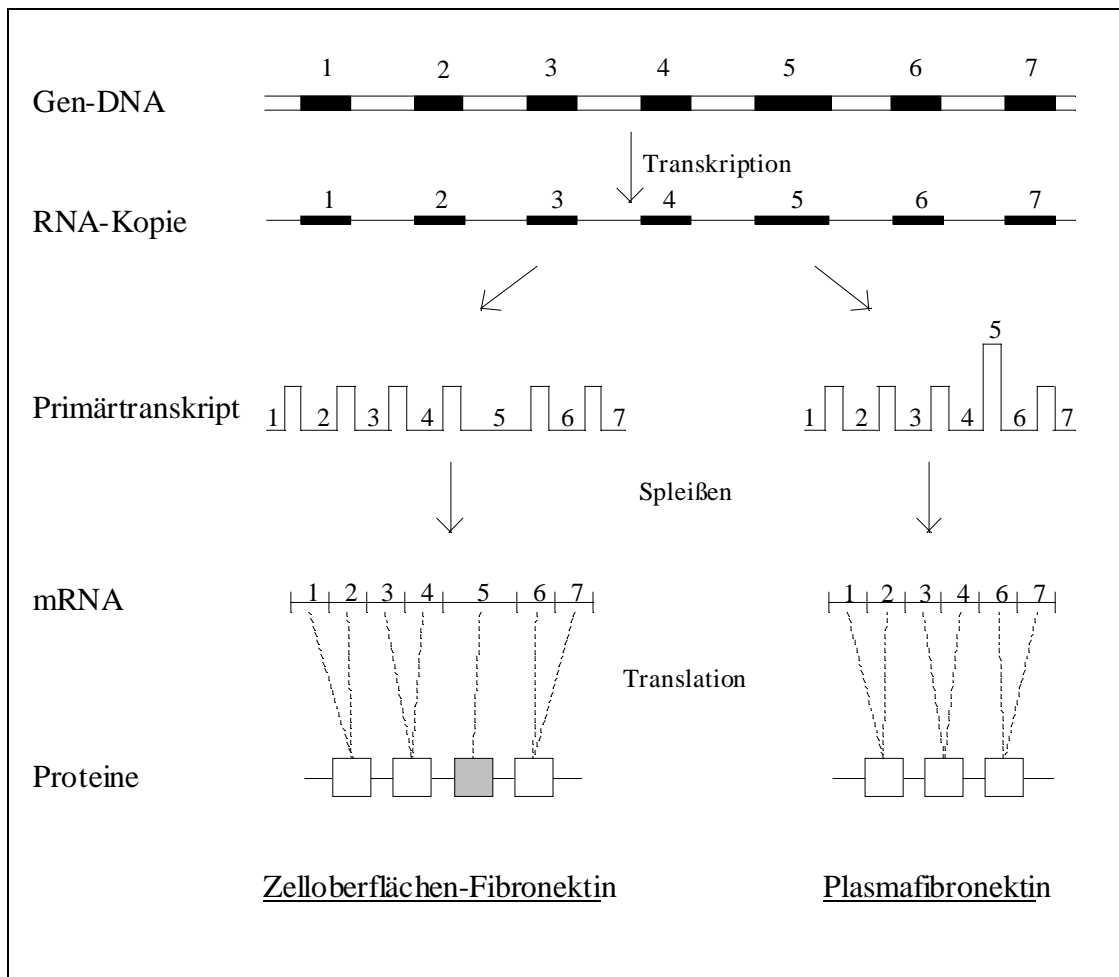


Abb.3 : Fibronektin-Varianten durch alternatives Spleißen<sup>[10]</sup>

Dem Plasma-Fibronectin fehlen zwei Typ III-Fragmente (ED<sub>a</sub> und ED<sub>b</sub>, ED = extra domain). Jedes dieser fehlenden Fragmente ist im Gen in einem einzigen großen Exon verschlüsselt (in Abb.3 als Beispiel das Exon 5). Rechts und links von ihm befinden sich jeweils andere wiederkehrende Abschnitte des Typs III, für die zwei kleinere Exons kodieren. Alle diese Exons werden in die primäre RNA-Kopie transkribiert. In Fibroblasten und anderen Zellen werden bei der späteren Bearbeitung ausschließlich die Introns aus dem Primärtranskript herausgeschnitten und die verbleibenden Exons zur mRNA gespleißt, die schließlich in Zelloberflächen-Fibronectin translatiert wird (links). In Leberzellen dagegen entsteht durch Abtrennung der für die ED-Fragmente kodierenden Exons das Plasma-Fibronectin (rechts).

### 2.2.3. Fibronectine in physiologischen Prozessen

Die Fibronectine spielen in vielen physiologischen Prozessen eine große Rolle. Ein wichtiger Prozeß ist die Krebsentwicklung. So wird z.B. von Tumorzellen kein Fibronectin mehr ausgeschüttet. Aber auch bei der Wundheilung oder der Infektionsabwehr kommt dem Fibronectin große Bedeutung zu.<sup>[11],[12]</sup>

1973 fand Hynes heraus, daß nach der Mutation einer gesunden Zellen zu einer Tumorzelle von ihr kein Fibronectin mehr ausgeschüttet wird.<sup>[13],[14]</sup> Die Zellen verlieren so ihre Adhäsionsfähigkeit und können so, unterstützt durch andere Prozesse (z.B. vermehrte MMP-Ausschüttung), Lage und Form verändern. Durch Zugabe von Plasma-Fibronectin ändert sich zwar nicht die erhöhte Teilungsrate der Krebszelle, aber dafür nähert sich ihre Struktur und Adhäsivität wieder der normalen Zelle. Zudem stimuliert Plasma-Fibronectin die Sekretion des Tumor-Nekrose-Faktors (TNF) durch Makrophagen, wodurch die Tumorzellen selektiv lysiert werden.

Wichtig bei der Wundheilung ist die schnelle Reaktion des Organismus durch die Blutgerinnung. Dieses System verschließt die Wunde binnen weniger Minuten mit einem Blutpfropfen bestehend aus Fibrin, Thrombozyten, Granulozyten und Plasma-Fibronectin. Die Folge ist ein temporärer Verschuß der Verletzung. Anschließend vermittelt das Fibronectin die Wanderung von Fibroblasten und später Monozyten entlang von Fibrinfibrillen in das betroffene Gewebe. Dort heftet es die Zellen an das Blutgerinnsel und leitet so die Bildung von neuem Gewebe ein. Auf dem gleichen Weg wird beschädigtes Gewebe aus der Wunde wegtransportiert.<sup>[15]</sup>

Polymorphkernige neutrophile Leukozyten (PMNL) fungieren bei der Wundheilung als Infektionsabwehr.<sup>[16]</sup> Die Phagozytose von Bakterien durch PMNL wird durch Fibronectin begünstigt.<sup>[17]</sup> Außerdem fördert es bei Monozyten und Makrophagen noch die Aufnahme weiterer Partikel. Weiterhin hat Fibronectin eine chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen und Fibroblasten, Fibronectin-Fragmente dagegen auf Monozyten.<sup>[18]</sup>

### **2.3. Matrixmetalloproteinasen**

Die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bilden eine Familie von zinkhaltigen, extrazellulären Enzymen, die eine oder mehrere Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) abbauen. Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch große Homologien in ihrer Primärstruktur und ihren enzymatischen Eigenschaften aus.

Die MMPs zeichnen sich durch folgende gemeinsame Charakteristika aus .<sup>[19-22]</sup>

- Jedes Mitglied der Familie baut mindestens einen Bestandteil der ECM ab.
- Sie werden als latente Enzyme sezerniert, die durch Abspalten eines ca. 88 AS großen Propeptids aktiviert werden.
- Das Propeptid enthält einen hochkonservierten Cystein-Rest, der das Zn-Atom im katalytischen Zentrum zu komplexieren vermag.
- Die Aktivierung der Proenzyme erfolgt *in vivo* proteolytisch oder *in vitro* durch quecksilberorganische Verbindungen.
- Das Zn-Atom im katalytischen Zentrum wird durch drei Histidin-Reste komplexiert.
- Das aktive Enzym benötigt eine neutrale pH-Umgebung und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.
- Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivität der MMPs durch spezifische Inhibitoren, den TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*), gehemmt.

Die Familie der MMPs umfaßt bisher 14 Mitglieder, welche in folgende Unterklassen aufgeteilt werden :

- Kollagenasen, die sich durch ihre Fähigkeit fibrilläres, interstitielles Kollagen abzubauen auszeichnen.
- Gelatinasen, welche besonders gegen denaturiertes Kollagen (Gelatin) und Typ IV-Kollagen wirksam sind.
- Stromelysine besitzen eine breite Substratspezifität und bauen Glykoproteine und Proteoglykane ab.
- MT-MMPs sind membranständige MMPs und spalten verschiedene ProMMPs.
- Elastase (Metalloelastase) spaltet Elastin.

Sämtliche Matrixmetalloproteinasen sind samt ihrer Substrate und Molekulargewichte in Tabelle 1 aufgeführt :

Unterklassen	Proteinase (MMP)	M [kDa]	Matrix-Substrate
Kollagenasen	Interstitielle Kollagenase (MMP-1)	52	Kollagen Typ I, II, III, VII, X
		85	Kollagen Typ I, II, III
	Neutrophile Kollagenase (MMP-8)	54	Kollagen Typ I, II, III, Gelatin
	Kollagenase-3 (MMP13)		
Stromelysine	Stromelysin-1 (MMP-3)	52	Laminin, Fibronectin, Gelatin
	Stromelysin-2 (MMP-10)	58	Laminin, Fibronectin, Gelatin
	Stromelysin-3 (MMP-11)	29	$\alpha$ 1-Antitrypsin
	Matrilysin (MMP-7)	28	Laminin, Fibronectin, Gelatin
Gelatinasen	Gelatinase A (MMP-2)	72	Kollagen Typ I, IV, Gelatin, Elastin, Fibronectin
	Gelatinase B (MMP-9)	92	Kollagen Typ IV, V, Gelatin, Elastin
MT-MMPs	MT1-MMP (MMP-14)	63	Progelatinase A, Prokollagenase-3
	MT2-MMP (MMP-15)	72	?
	MT3-MMP (MMP-16)	64	Progelatinase A
	MT4-MMP (MMP-17)	57	?
Elastase	Metalloelastase (MMP-12)	53	Elastin

Tab.1 : Die Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) <sup>[23]</sup>

### 2.3.1. Domänenstruktur der MMPs

Die Homologien in der Primärstruktur lassen sich anhand der verschiedenen Domänen der Matrixmetalloproteinasen gut erkennen. Von der gemeinsamen Grundstruktur unterscheiden sich lediglich die Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) durch ihre fibronectinähnliche Domäne (Gelatin-Bindungsdomäne) und das Matrilysin (MMP-7), in dem die C-terminale hämopexinähnliche Domäne fehlt. Eine Veranschaulichung der Domänenstruktur ist in Abb.4 gezeigt.

Den einzelnen Domänen der Matrixmetalloproteinasen lassen sich verschiedene Eigenschaften und Funktionen zuordnen :

Das *Signalpeptid* dient der Ausschleusung des Proteins aus der Zelle in den extrazellulären Raum. Es wird während der Sekretion abgespalten.

Die *Propeptid-Domäne* ist für die Latenz des Zymogens verantwortlich. Sie enthält die hochkonservierte PRCGVDP-Sequenz. Das in dieser Sequenz auftretende Cystein koordiniert an das Zn-Atom des katalytischen Zentrums und inaktiviert dieses dadurch. Bei Aktivierung des Enzyms wird das Propeptid in mehreren Schritten abgespalten und die Komplexierung durch den sogenannten „*cystein-switch*“-Mechanismus aufgehoben. <sup>[24]</sup>

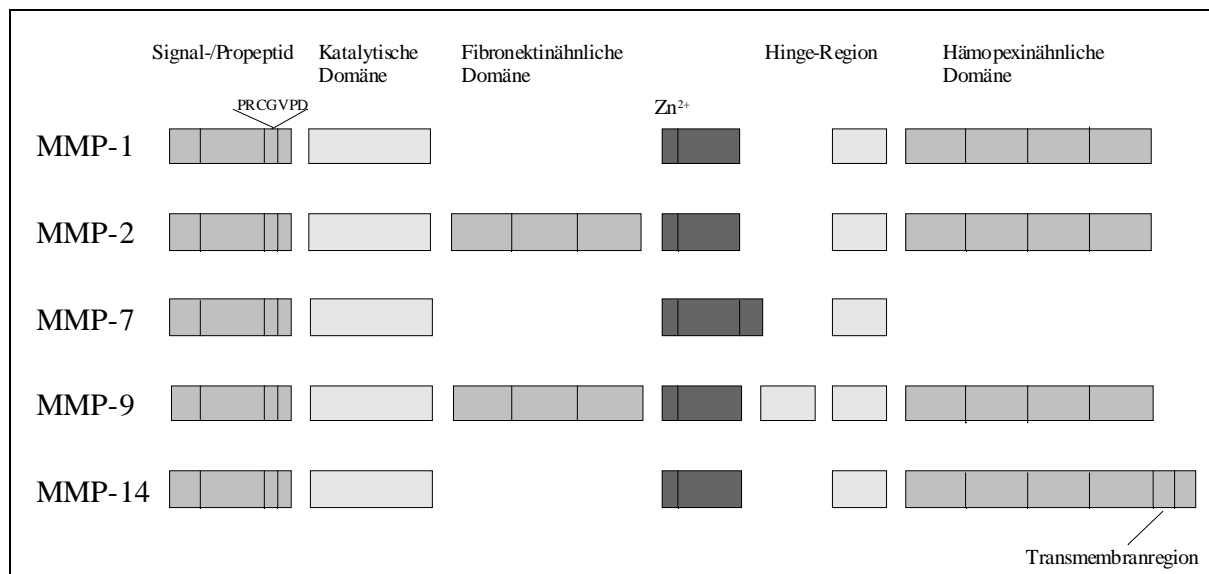


Abb.4 : Domänenstruktur einiger typischer Matrixmetalloproteinase

Die *katalytische Domäne* enthält das konservierte AAHEXXHXXGXXH-Motiv, dessen drei Histidin-Reste das Zn-Atom im aktiven Zentrum koordinieren. Die Gelatinasen besitzen in der katalytischen Domäne einen Einschub von 175 Aminosäureresten, der in drei Wiederholungen unterteilt ist. Diese Wiederholungen sind homolog zum Typ II-Motiv der gelatinbindenden Domäne des Fibronektin.<sup>[25]</sup> Diese *fibronektinähnliche Domäne* ist für die Bindung an ECM-Moleküle (z.B. Fibronektin) verantwortlich.<sup>[26]</sup>

Die *Hinge-Region* stellt ein Verbindungsglied zwischen der katalytischen Domäne und der hämopexinähnlichen Domäne dar, indem sie ein flexibles „Scharnier“ sehr unterschiedlicher Größen (17-63 Aminosäurereste) ausbildet. Auffällig ist der hohe Prolin-Gehalt in dieser Proteinregion.

Die C-terminale *hämopexinähnliche Domäne* der Matrixmetalloproteinase zeigt Sequenzhomologien zu einigen anderen nicht verwandten Proteinen, wie dem Häm-bindenden Serum-Protein *Hämopexin*<sup>[27]</sup>, zu *Vitronektin*<sup>[28]</sup>, einem Adhäsionsprotein der extrazellulären Matrix, oder zum *Erbsen Albumin 2*<sup>[29]</sup>. Eine Funktion der hämopexinähnlichen Domäne ist die Vermittlung der Substratspezifität der Kollagenasen für Typ I-, II- und III-Kollagen. Sie ist weiterhin verantwortlich für die Bindung von ECM-Molekülen und der TIMPs. So vermögen die um diese Domäne verkürzten Kollagenasen nicht mehr tripelhelikales Typ I-,II- und III-Kollagen zu spalten. Sie behalten jedoch ihre Gelatinase-Aktivität.<sup>[30]</sup>

Nur die membranständigen MT-MMPs weisen zusätzlich eine *Transmembranregion* auf, die sich C-terminal an die hämopexinähnliche Domäne anschließt. Diese Region zeichnet sich durch eine Sequenz von ca. 30 hydrophoben Aminosäureresten aus, die die Membranen durchspannt.<sup>[31]</sup>



### 2.3.2. Tumorbildung und Metastasierung

In den letzten 20 Jahren hat die Forschung eine Reihe von Gesetzmäßigkeiten aufgedeckt, die der Entstehung von Krebs zugrunde liegen. Man weiß, daß die Zellen eines Tumors von einer gemeinsamen „Ursprungszelle“ abstammen, die irgendwann - meist Jahrzehnte, bevor ein Tumor überhaupt sichtbar oder tastbar wird - erstmals vom kontrollierten Weg der Zellteilung abgekommen ist. Ferner ist bekannt, daß der Wandel zur Bösartigkeit dadurch zustande kommt, daß sich in einer solchen Zelle, genauer in einer Linie ihrer Nachkommenschaft, Mutationen anhäufen, die bestimmte Klassen von Genen betreffen. Zwei Klassen von Genen spielen bei der Krebsentstehung eine Rolle : die Proto-Onkogene (Krebsgen-Vorläufer) und die Tumorsuppressorgene (tumorunterdrückende Gene). In ihrer normalen Form steuern sie den Lebenszyklus einer Zelle. Hierbei regulieren sie die verwickelte Abfolge von Vorgängen, durch die sich eine Zelle vergrößert und bei Bedarf teilt.

Mutiert ein Proto-Onkogen in der Regulator- oder Strukturregion, wird zu viel von seinem wachstumsfördernden Protein synthetisiert oder dieses ist übermäßig aktiv. Das Proto-Onkogen ist dann zu einem krebsbegünstigendem Onkogen mutiert, welches die Zelle zu übermäßiger Zellteilung anregt. Demgegenüber können auch Tumorsuppressorgene zur Krebsentstehung beitragen, sie werden dabei durch Mutationen inaktiviert. Als Folge verliert die Zelle Tumorsuppressor-Proteine und damit entscheidene Wachstumsbremsen. Auf diese Weise wird den Zellen auch die Fähigkeit, auf wachstumshemmende Signale ihrer Nachbarzellen zu reagieren, entzogen. Beispielsweise vermag der Botenstoff TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*) das Wachstum verschiedenartiger normaler Zellen zu unterbinden. Manche Dickdarmkarzinome sprechen jedoch nicht mehr darauf an, weil das Gen für den zuständigen Oberflächenrezeptor inaktiviert wurde.<sup>[32]</sup>

Zur Ausbildung von Metastasen müssen sich in weiteren Genen einer Tumorzelle Mutationen bilden. Bis eine sich vom Primärtumor absondernde Krebszelle an anderer Stelle eine Tochtergeschwulst bilden kann, hat sie mehrere natürliche Barrieren zu überwinden.

Sie muß zuerst umliegendes Gewebe durchbrechen und in eines der Blutgefäße eindringen, die als Kapillarnetz den ursprünglichen Tumor durchwachsen und ihn versorgen. Mit dem Blutstrom gelangt sie zunächst in eine Vene und bleibt schließlich, falls sie die dortige Turbulenz und den Angriff der Immunabwehr übersteht, in einem anderen Kapillarnetz hängen. Dort muß sie wiederum in das umliegende Gewebe eindringen, wachsen und sich teilen. Der Sekundärtumor induziert nun seinerseits die Ausbildung neuer Blutgefäße zu seiner Versorgung und kann so Ausgangspunkt neuer Metastasen werden.<sup>[33]</sup>

Der Schritt der Invasion gesunden Gewebes erfordert ein komplexes Zusammenspiel der beteiligten Zellen, wobei die Tumorzelle den aktiven Teil übernimmt. Sie muß zunächst an der Stelle, an der sie im Blutstrom steckengeblieben ist, das Endothel überwinden, mit dem das Blutgefäß ausgekleidet ist. Tumorzellen neigen zur Adhäsion an diese Zellschicht und an den Stellen, an denen es zur Anlagerung kommt, werden die Endothelzellen verdrängt und das darunterliegende Gewebe freigelegt. Eine schwieriger zu durchdringende Barriere ist die kollagenhaltige extrazelluläre Matrix, die Organe und Gewebe umschließt und unterteilt. Außerdem umgibt sie Blutgefäße als Basalmembran, welche hauptsächlich aus Typ IV-Kollagen besteht. Die Tumorzelle bindet mit bestimmten Rezeptoren ihrer Membranoberfläche an die jetzt freiliegende Basalmembran. Gleichzeitig werden bestimmte MMPs (Typ IV-Kollagenasen) sezerniert, die die Kollagenfasern proteolytisch spalten. In die entstandene freie Stelle kann die Krebszelle sich mit vorgeschobenen Ausläufern hineinziehen und durch Ausschüttung anderer Proteinase weiteres Gewebe auflösen. Daher kommt allen Typ IV-Kollagenasen bei der Metastasierung eine besondere Bedeutung zu.<sup>[34],[35]</sup>

## **2.4. Typ IV-Kollagenasen**

### **2.4.1. Kollagene**

Die Kollagene bilden eine Superfamilie von extrazellulären Matrixproteinen, deren unterschiedliche Strukturen ihre primären Funktionen bedingen. Basierend auf der Exon-Struktur ihrer Gene und auf den Aminosäuresequenzen der Proteine können sie in verschiedene Familien oder Gruppen eingeteilt werden. Alle Kollagene besitzen jedoch Domänen, die die gleiche Konformation einer Tripel-Helix aufweisen. Diese Domänen bestehen aus drei Untereinheiten - den  $\alpha$ -Ketten - und beinhalten jeweils das wiederkehrende (Gly-X-Y)<sub>n</sub>-Sequenz-Motiv. Die Tripel-Helix besteht aus drei linksdrehenden  $\alpha$ -Helices, die eine rechtsdrehende Superhelix bilden.<sup>[36]</sup>

Weitere Kennzeichen für Kollagene ist zum einen die Einbettung in die extrazelluläre Matrix, zum anderen die Ausbildung von supramolekularen Aggregaten, wie Fibrillen oder Filamente.<sup>[37]</sup>

---

Die Kollagene werden in folgende Familien unterteilt <sup>[31],[38]</sup> :

- *Fibrilläre Kollagene* bestehen aus Typ I, II, III, V und XI-Kollagenen, die in unterschiedlichen Gewebearten Fibrillen ausbilden.
- *Oberflächenkollagene* sind Kollagene der Typen IX, XII und XIV, welche mit Fibrillen assoziiert sind
- *Short-Chain-Kollagene*; sie enthalten Typ VIII- und Typ X-Kollagen. Ihre kleinen Moleküle bilden Teile der extrazellulären Matrix.
- *Basalmembran-Kollagene* bestehen aus einigen unterschiedlichen Molekülen, die unter Typ IV-Kollagen bekannt sind. Sie bilden den Hauptbestandteil der Basalmembranen.
- *Andere Kollagene*, wie Typ VI, VII und XIII, formen spezielle Strukturen in vielen Geweben (z.B. Typ VI : Mikrofibrillen oder Typ VII : verankernde Fibrillen).

#### 2.4.2. Typ IV-Kollagen

Typ IV-Kollagen ist der Hauptbestandteil der Basalmembranen. Es bildet eine Netzwerk-Struktur aus, mit der andere Basalmembran-Komponenten, wie Laminin, Nidogen, Heparin oder Zellen Wechselwirkungen eingehen können. Bisher wurden fünf Gene entdeckt, die für die Basalmembran-Kollagenfamilie kodieren.<sup>[39]</sup>

Typ IV-Kollagen-Moleküle sind Heterotrimere bestehend aus zwei  $\alpha 1$ -Ketten und einer  $\alpha 2$ -Kette. Jede der Ketten ist ca. 1700 Aminosäuren lang und enthält drei verschiedene Domänen : die N-terminale Cystein-reiche Domäne (7S), eine zentrale tripelhelikale Domäne und eine nichthelikale Domäne (NC1) am C-Terminus.<sup>[40]</sup>

Typ IV-Moleküle sind in ein Netzwerk eingebunden, welches sich von den Fibrillen der fibrillären Kollagene unterscheidet. In diesem Netzwerk sind manche Moleküle über die 7S-Region kovalent quervernetzt, andere durch Wechselwirkungen ihrer NC1-Domänen verknüpft. Seitliche Assoziationen, die zwischen tripelhelikalen Bereichen entstehen, wurden ebenfalls beobachtet.

Bisher wurden noch drei weitere Typ IV-Kollagen-Ketten entdeckt und charakterisiert. Diese Ketten ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ) bilden zusätzliche Typ IV-Moleküle in speziellen Basalmembranen. Ihre genaue Struktur und ihre Aufgaben im Gewebe sind jedoch noch nicht vollends verstanden.<sup>[41]</sup>

### 2.4.3. Typ IV-Kollagenasen

Typ IV-Kollagen-Strukturen können von den entsprechenden Proteinasen, den Typ IV-Kollagenasen aufgespalten werden. Die Typ IV-Kollagenasen gehören zur Familie der Matrixmetalloproteinasen. Es handelt sich bei ihnen vor allem um die Gelatinasen A und B (MMP-2 und MMP-9) und um die Kollagenase 3 (MMP13). Sie zeigen eine sehr hohe Aktivität gegenüber Typ IV-Kollagen. Ebenfalls Aktivität besitzen die Stromelysine 1 und 2 (MMP-3 und MMP-10). Im Vergleich zu den Gelatinasen ist diese Aktivität allerdings sehr gering.<sup>[22]</sup>

Gelatinase A wird von verschiedenen Zellen, meist als Komplex mit TIMP-2, sezerniert. Gelatinase B wird in Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen exprimiert und wird von Makrophagen als Komplex mit TIMP-1 ausgeschüttet. Die Aktivierung dieser Enzyme ist sehr komplex. Als Ort der Aktivierung wurde die Zellmembran identifiziert, so daß ein membrangebundener Aktivator postuliert wurde.<sup>[42]</sup> 1994 wurde dann die erste MMP mit Transmembranregion (MT1-MMP) entdeckt und als Aktivator der Progelatinase A nachgewiesen.<sup>[31]</sup> Im Gegensatz zu den interstitiellen Kollagenasen verlieren die Gelatinasen A und B und die Kollagenase 3 ihre Substratspezifität durch Abspaltung der hämopexinähnlichen Domäne nicht.

Zwei weitere Typ IV-Kollagenasen wurden durch proteolytische Spaltung von Plasma-Fibronektin mit Fibronektinase erhalten. Aus dem zunächst erhaltenen 45 kDa-Fragment entstand nach autokatalytischer Aktivierung ein aktives, Typ IV-Kollagen spaltendes 40 kDa-Enzym, die Fn-Typ IV-Kollagenase A. Nach weiterer Abspaltung eines 13 kDa-Fragmentes wurde die ebenfalls aktive Fn-Typ IV-Kollagenase B (27 kDa) erhalten.<sup>[43]</sup>

Das 45 kDa-Fragment, welches in der Gelatin-Bindungsdomäne liegt, besteht aus vier Typ I- und zwei Typ II-Sequenzen (s. Abb.2). Während die Typ I-Sequenzen auch in anderen Domänen des Fibronektins vorkommen, sind die Typ II-Sequenzen für die Gelatin-Bindungsdomäne spezifisch. Daher wird angenommen, daß die Typ II-Sequenzen verantwortlich sind für die Wechselwirkung von Fibronektin mit Kollagen, einem fundamentalen Mechanismus zur Organisation der extrazellulären Matrix.

Verschiedene Studien haben ergeben, daß die kollagenbindende Sequenz zwischen dem zweiten Typ II- und dem benachbarten Typ-I-Bereich lokalisiert ist. Hier findet man das AAHE-Motiv mit zwei später folgenden Histidinen, welches auch an der Zn-Koordination im katalytischen Zentrum der MMPs beteiligt ist.

Untersuchungen der Substratspezifität ergaben, daß die Fn-Typ IV-Kollagenasen eine 3-4mal größere Spezifität gegenüber Typ IV-Kollagen besitzen als die Gelatinasen. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität gegenüber Gelatin wesentlich geringer. Inhibiert werden die Fn-Typ IV-Kollagenasen durch 1,10-Phenanthrolin und EDTA, die TIMPs hemmen nicht.

Aktiviert werden die Fn-Typ IV-Kollagenasen wie beschrieben durch Fibronectinase, einer Serin-Proteinase mit einer Trypsin-ähnlichen Spezifität. Der erste Schritt der Prozessierung, der zur Aktivierung des 40 kDa-Proteins führt, ist die Abspaltung eines ca. 5 kDa großen Fragmentes vom C-Terminus der Gelatin-Bindungsdomäne. Die weitere Abtrennung eines 13 kDa großen Fragmentes bedeutet gleichzeitig den Verlust der Spezifität für Laminin und einem Rückgang der Aktivität gegenüber Gelatin.

Die Typ IV-Kollagenasen sind entscheidend am Abbau der Basalmembranen beteiligt. Ihnen kommt daher eine große Rolle bei der Metastasierung zu. Im Zusammenhang mit den TIMPs sind sie in der Krebsforschung von besonderem Interesse.

### 3. Zielsetzung

Der Zusammenhalt der extrazellulären Matrix wird durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Synthese und lokalem Abbau ihrer strukturbildenden Komponenten kontrolliert. Eine Störung dieses empfindlichen Gleichgewichtes kann zu pathologischen Erscheinungsformen an Matrixneustrukturierungen führen, die zum Teil durch einen exzessiven Abbau der ECM-Komponenten gekennzeichnet sind.

Vor allem die Gelatinasen A und B und die Kollagenase 3, also die Typ IV-Kollagenasen, gelten wegen ihrer Überexpression in Tumorzellen als prognostische Faktoren in klinischen Proben menschlicher Tumore.<sup>[44-47]</sup> In experimentellen Tumorsystemen konnte außerdem eine Korrelation zwischen der Fähigkeit von Zellen einerseits MMPs zu sezernieren und andererseits zu metastasieren beobachtet werden.<sup>[48],[49]</sup> Bei Nacktmäusen wurde die Metastasierung von Tumorzellen, die die cDNA der Gelatinase B tragen, festgestellt.<sup>[48]</sup> Dagegen führte die Inhibierung der Gelatinase auch zur Einschränkung der Metastasenbildung.<sup>[50-54]</sup>

Durch proteolytische Spaltung von Fibronectin mit Fibronectinase wurden zwei weitere, den Gelatinasen verwandte Matrixmetalloproteinasen erhalten. Die Gelatin-Bindungsdomäne des Fibronectin enthält diese latenten Typ IV-Kollagenasen.<sup>[43]</sup>

Aus einem 45 kDa großen Fragment wurde die 40 kDa Fn-Typ IV-Kollagenase A und die 27 kDa Fn-Typ IV-Kollagenase B durch Prozessierung erhalten. Die Substratspezifität ist unterschiedlich, das 40 kDa-Protein spaltet Gelatin, Laminin und Typ IV-Kollagen, das 27 kDa-Enzym dagegen nur Typ IV-Kollagen und sehr begrenzt Gelatin.

Diese Erkenntnisse zeigen, daß das Adhäsionsprotein Fibronectin nach proteolytischer Spaltung und Prozessierung großen Anteil an der Metastasierung und dem damit verbundenen Abbau von extrazellulärem Gewebe haben kann.

Um weitere Untersuchungen durchführen zu können, werden größere Mengen der Proteine benötigt. Aus diesem Grund sollen die Fn-Typ IV-Kollagenasen A und B aus der Gelatin-Bindungsdomäne rekombinant hergestellt werden. Wegen der großen Homologie der Gelatin-Bindungsdomäne des Fibronectins zur fibronectinähnlichen Domäne der Gelatinase A wird auch für diese ein Expressionssystem zur rekombinanten Herstellung etabliert.

Ziel dieser Arbeit ist es nun also die Fn-Typ IV-Kollagenasen A und B aus dem Fibronectin sowie zwei Varianten der fibronectinähnlichen Domäne der Gelatinase A rekombinant herzustellen.

Dazu erfolgt zunächst die PCR-Amplifizierung der entsprechenden vier cDNA-Fragmente, ihre Klonierung und die Etablierung potentieller Expressionssysteme in *E. coli*. Nach erfolgter Expression und Proteinaufarbeitung sollen Versuche zur Aktivierung durchgeführt werden.

Folgende vier Bereiche des Fibronectins und der Gelatinase A wurden für die Klonierungs- und Expressionsexperimente ausgewählt :

1. Der erste Bereich entspricht der Fn-Typ IV-Kollagenase A. Er enthält somit 300 Aminosäurereste und hat ein Molekulargewicht von ca. 35 kDa. Dieser Bereich wird als FnColA bezeichnet.
2. Der zweite Bereich entspricht der Fn-Typ IV-Kollagenase B. Er besteht aus 210 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von ca. 23 kDa. Dieser Bereich wird als FnColB bezeichnet.
3. Bei dem dritten Fragment handelt es sich um die fibronectinähnliche Domäne der MMP2 (Gelatinase A). Sie wird als FnGel72 benannt, enthält 174 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 20 kDa.
4. Das vierte Protein enthält zusätzlich zur fibronectinähnlichen Domäne FnGel72 noch das Fragment mit dem Metallbindungszentrums der Gelatinase A. Es besteht aus 225 Aminosäuren und sein Molekulargewicht beträgt ca. 24 kDa.

In Abb.5 sind die einzelnen Domänen schematisch dargestellt :

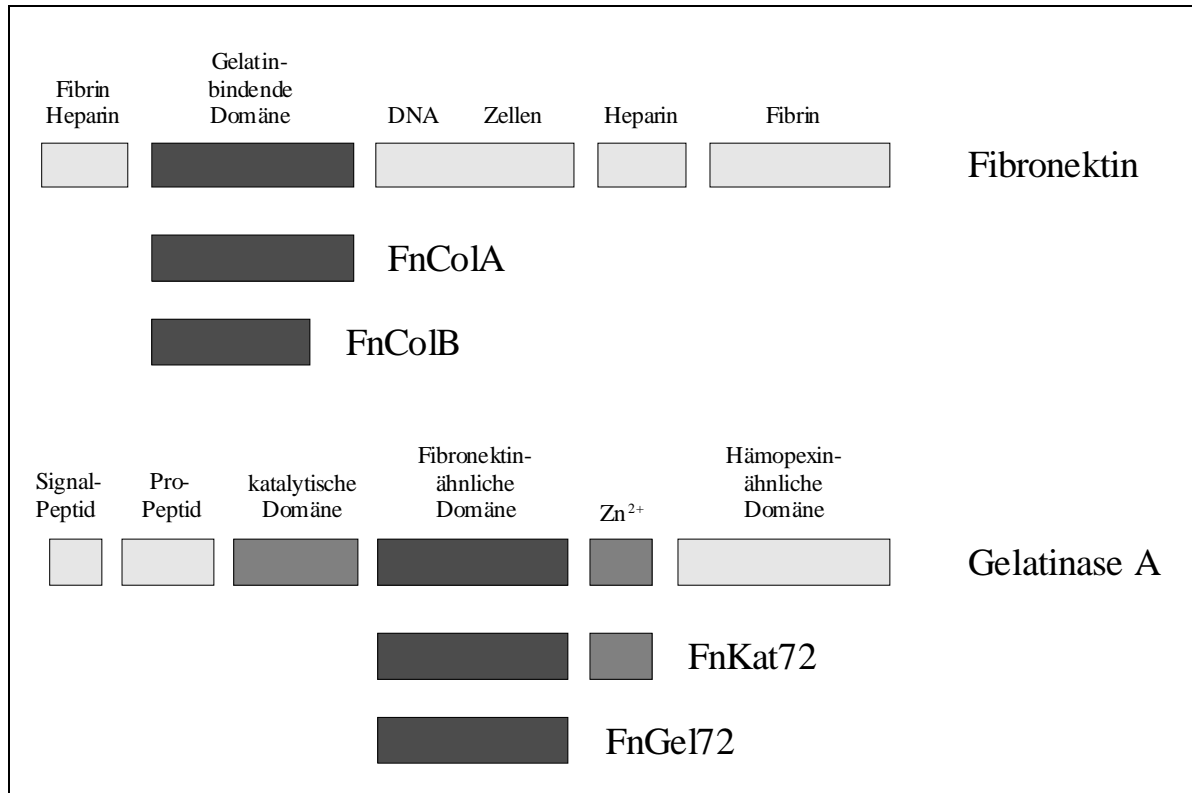


Abb.5 : Darstellung der klonierten Domänen



## 4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit standen die cDNA des Fibronektins<sup>[55]</sup> und die cDNA der Gelatinase A<sup>[56]</sup> zur Verfügung. Sie wurden in einer Polymerase-Ketten-Reaktion als Template eingesetzt.

Aus der Fibronektin-cDNA wurden die cDNA-Fragmente der Typ IV-Kollagenasen FnColA und FnColB amplifiziert. Die cDNA der Gelatinase A diente der Anreicherung der Domänen FnGel72 und FnKat72. Die einzelnen cDNA-Fragmente wurden an den Enden durch *in-vitro-Mutagenese* mit Start- und Stopcodons sowie mit Restriktionsstellen versehen.

Nach Isolierung der PCR-Produkte wurden diese mittels TA-Klonierung mit dem Vektor pCR<sup>TM</sup>II ligiert. Anschließend wurde der *E. coli*-Stamm [INV $\alpha$ F'] mit den erhaltenen Plasmiden FnColA-pCR<sup>TM</sup>II, FnColB-pCR<sup>TM</sup>II, FnGel72-pCR<sup>TM</sup>II und FnKat72-pCR<sup>TM</sup>II transformiert.

Die korrekten Klonierungen der vier PCR-Produkte in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung nachgewiesen.

Die cDNA-Fragmente wurden an den eingefügten Restriktionsstellen aus dem pCR<sup>TM</sup>II-Vektor herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pET-12b einkloniert. Bei den Fragmenten FnColA und FnColB erfolgte außerdem die Klonierung in die Expressionsvektoren pET-11a und pET-15b. Anschließend wurden die *E. coli*-Expressionsstämme [HMS174(DE3)] und [BL21(DE3)] mit den erhaltenen Plasmiden transformiert.

Die erfolgreichen Transformationen wurden durch erneute Plasmidisolierung und Restriktionsanalyse bestätigt. Insgesamt wurden somit 16 potentielle Expressionssysteme erhalten.

Mit folgenden drei Expressionssystemen konnten rekombinante Proteine erhalten werden :

FnColA-pET-15b [BL21(DE3)]  
FnGel72-pET-12b [HMS174(DE3)]  
FnKat72-pET-12b [HMS174(DE3)]

Somit konnten für die Proteine FnColA, FnGel72 und FnKat72 Systeme zur Expression etabliert werden.

Bei allen drei Systemen wurden entsprechende Proteine in großer Ausbeute exprimiert. Die Proteine wurden durch Zellyse und Aufschluß der *inclusion bodies* gewonnen.

Für die Domäne FnColB wurde kein Expressionssystem etabliert. Obwohl laut DNA-Sequenzierung die für das Protein kodierende cDNA mit Start- und Stopcodons in vollständiger und korrekter Form vorlag, konnte keine Expression erreicht werden.

Die Typ IV-Kollagenase FnColA wurde aus dem pET-15b-Vektor mit einer *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz am N-Terminus exprimiert. Die Identität des Proteins wurde durch N-terminale Sequenzierung eindeutig nachgewiesen.

Die Aufreinigung des FnColA-Proteins konnte aufgrund der *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz durch eine Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose durchgeführt werden. Es wurden jedoch nicht alle Verunreinigungen abgetrennt, so daß weitere Schritte zu Isolierung erforderlich waren. Durch anschließende Gelfiltration an einer Sephacryl S-100-Säule konnte das Protein dann in nahezu homogener Form erhalten werden.

Die Varianten der fibronectinähnlichen Domänen der Gelatinase A, FnGel72 und FnKat72, wurden ebenfalls durch N-terminale Sequenzierung eindeutig identifiziert.

Die erste Aufreinigung des FnKat72-Proteins erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE-Säule. Diese Methode erwies sich als erfolgreich zur Vorreinigung des Proteins. Der zweite Aufreinigungsschritt erfolgte ebenfalls durch Gelfiltration an einer Sephacryl S-100-Säule. Die vorgereinigte FnKat72-Domäne konnte so von sämtlichen Verunreinigungen befreit werden und wurde in reiner Form erhalten.

Desweiteren wurden Experimente zur Naturierung der exprimierten bzw. vorgereinigten rekombinanten Proteine durchgeführt.

Zunächst wurden Proben der *ib*-Aufschlüsse gegen einen nativen Puffer dialysiert. Die Aktivität der Proteine sollte mit einem Gelatin-Substratgel nachgewiesen werden. Bei keinem der drei Proteine wurde jedoch eine entsprechende Bande erhalten. Ein weiterer Aktivitätstest war die Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose. Doch auch hier konnte keine Bindungsspezifität zu dem verwendeten Säulenmaterial festgestellt werden.

Der zweite Naturierungsversuch wurde in Verdünnungsansätzen durchgeführt. Jeweils 10 ml Proben der aufgereinigten Proteine FnColA und FnKat72 und 10 ml des FnGel72-ib-Aufschlusses wurden in je 500 ml eines Faltungspuffers verdünnt und für mehrere Tage bei 4°C inkubiert.

In diesem Fall gelang durch ein Gelatin-Substratgel oder die Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose jedoch ebenfalls kein Aktivitätsnachweis.

Bei der Typ IV-Kollagenase FnColA bestand aufgrund der N-terminalen *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz die Möglichkeit der Faltung auf der Ni-NTA-Säule. Zu diesem Zweck wurden dem verwendeten Puffer schrittweise alle denaturierenden Reagenzien entzogen. Das an die Matrix gekoppelte Protein sollte so langsam renaturieren

Das Protein konnte jedoch weder mit saurem pH-Shift noch mit einer erhöhten Imidazolkonzentration wieder von der Säule eluiert werden, so daß keine Aktivitätstests möglich waren.

---

## 5. Materialien und Geräte

### **5.1. Materialien**

#### **5.1.1. Antibiotika**

Ampicillin	Serva, Heidelberg
------------	-------------------

#### **5.1.2. Enzyme**

Alkalische Phosphatase	Pharmacia, Freiburg
Lysozym	Boehringer, Mannheim
Nde I	New England Biolabs
Sal I	New England Biolabs
EcoRI	New England Biolabs
BamHI	New England Biolabs
HindIII	New England Biolabs
Vent-Polymerase	Boehringer, Hamburg
Tth-Polymerase	Promega
T4-DNA-Ligase	Promega

#### **5.1.3. Standard-Marker**

1 kb-DNA-Leiter	Pharmacia, Freiburg
LMW-Protein Standard	Pharmacia, Freiburg

#### **5.1.4. Farbstoffe**

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Coomassie Blue	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, München
X-Gal	Biomol, Hamburg

### 5.1.5. Chemikalien

Acrylamid	Roth, Heidelberg
Agarose	AGS GmbH, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Serva, Heidelberg
IPTG	Biomol, Hamburg
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
Select Peptone	Gibco Brl, Eggenstein
Select Yeast Extract	Gibco Brl, Eggenstein
TEMED	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt und der Firma Baker, Deventer in p.a.-Qualität bezogen.

### 5.1.6. Materialien für Säulenchromatographie

DEAE-Sepharose	Pharmacia-LBK, Freiburg
Gelatin-Sepharose 4B	Pharmacia-LBK, Freiburg
Gelfiltrationssäule S-100	Pharmacia-LBK, Freiburg
Ni-NTA-Agarose	QIAgen GmbH, Hilden

### 5.1.7. Sonstige Materialien

Blotpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe
PVDF-Membran	Millipore, Bedford (USA)
QIAgen <sup>TM</sup> -Säulen	QIAgen GmbH, Hilden
QIAgen <sup>TM</sup> -Spin Plasmid Kit	QIAgen GmbH, Hilden
Sterilfilter	Millipore, Bedford (USA)
TA-Cloning Kit	Invitrogen

**5.2. Geräte**

Autoklav	Webeco Typ A5
Blotapparatur	Biometra, Göttingen
Clean Bench	DLF/Bss 6.Kl.IIA B. V., Clean Air Technik
Elektrophoresekammer	Eigenbau, Universität Bielefeld
Fotoapparate	Polaroid CU-5 Nikon F3
Fraktionssammler	Redi-Frac, Pharmacia, Freiburg
Inkubator	G-25 Incubator Shaker, Mew Brunswick Scientific Co., Inc. Edison, New Jersey (USA)
Netzgerät	Eigenbau, Universität Bielefeld
Peristaltische Pumpe	Peristaltic-PUMP-1, Pharmacia, Freiburg
pH-Meter	PHM 62 Standard pH-Meter, Radiometer, Kopenhagen
Photometer	Eppendorf 1101 M
Proteinsequenzer	modularer Flüssigphasensequenzer mit PTH-online- Identifizierung, Knauer, Berlin
Schreiber	Rec 101, Pharmacia-LKB, Freiburg
Thermocycler (PCR)	Mini Cycler Modell PTC-150-16, MJ Research, Inc. Watertown, Massachusetts (USA)
UF-Kammer	Amicon D2, Amicon, Witten
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Neu Isenburg

**5.3. Bakterienstämme**

Die verwendeten *E. coli*-Stämme sind Sicherheitsstämme für das Arbeiten in Genlaboratorien der Sicherheitsstufe S1. Sie können nur auf Vollmedien wachsen, da sie Mutationen in ihren Aminosäurebiosynthesewegen tragen, die das Überleben der Bakterien außerhalb des Labors verhindern sollen. Auch fehlt den verwendeten Stämmen der *Fertilitätsfaktor F*, wodurch Konjugationsprozesse, wie der Austausch von DNA zwischen verwandten Bakterienarten, ausgeschlossen werden können. Um auch eine Rekombination zwischen chromosomaler DNA und Plasmid-DNA zu verhindern, besitzen die Stämme eine *Rekombinationsdefizienz (recA)*.

### 5.3.1. *Escherichia coli* [INV $\alpha$ F']

Genotyp : end, hsd, thi, gyr, rel,  $\Phi$  80 d lac Z  $\Delta$  M 15

Phänotyp : antibiotikasensitiv (Ampicillin)

Der *E. coli*-Stamm [INV $\alpha$ F'] wird für die Transformation von Ligationsansätzen aus der TA-Klonierung und zur Vermehrung von Plasmid-DNA eingesetzt.

Er ermöglicht mit einem  $\alpha$ -komplementationsfähigen Vektor eine Insertionskontrolle über eine Blau-Weiß-Selektion : Kloniert man ein DNA-Fragment in das  $\beta$ -Galactosidasegen (lacZ) des pCR<sup>TM</sup>II-Vektors, so sind diese Rekombinationen genotypisch lacZ und produzieren keine aktive  $\beta$ -Galactosidase. Sie können deshalb das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) nicht zu einem blauen Indigofarbstoff umsetzen. Die Plaques solcher Klone bleiben also farblos. Klone mit rezykliertem Vektor besitzen eine aktive  $\beta$ -Galactosidase und färben das X-Gal blau.

### 5.3.2. *Escherichia coli* [JM 83]

Genotyp : thi, ara, rps L,  $\Delta$  (lac-Pro AB),  $\Phi$  80 d Z  $\Delta$  M 15

Phänotyp : antibiotikasensitiv (Ampicillin)

Der *E. coli*-Stamm [JM 83] ist ein sogenannter „*high-copy*“-Stamm, in dem die Plasmide in großer Anzahl vorliegen. Deshalb eignet er sich neben der Möglichkeit zur Transformation von Ligationsansätzen besonders zur Plasmidanreicherung.

### 5.3.3. *Escherichia coli* [BL21(DE3)]

Genotyp : B<sup>-</sup> F<sup>-</sup>, Omp T, R<sub>B</sub><sup>-</sup>, M<sub>B</sub><sup>-</sup>, (r<sub>b</sub><sup>-</sup> m<sub>b</sub><sup>-</sup>) (DE3)

Phänotyp : antibiotikasensitiv (Ampicillin)

Der *E. coli*-Stamm [BL21(DE3)] ermöglicht in Verbindung mit pET-Vektoren die Expression von rekombinanten Proteinen.

Durch die Integration des lysogenen  $\lambda$ -DE3-Phagen, der ein T7 RNA-Polymerasegen unter Kontrolle des lacUV5/lacI Promotor/Operator-Systems trägt, wird eine Transkriptionskontrolle ermöglicht. Erst durch Induktion mit IPTG wird die Expression des rekombinanten Proteins gestartet. Die Kontrolle der Expression verhindert, daß der Expressionsstamm beim Kultivieren mit Mutanten, die die Fähigkeit zur Expression verloren haben, überwachsen wird.

### 5.3.4. *Escherichia coli* [HMS174(DE3)]

Genotyp : F<sup>-</sup>, recA, hsdR (r<sub>K12</sub><sup>-</sup>m<sub>K12</sub><sup>+</sup>) Rif<sup>R</sup> (DE3)

Phänotyp : antibiotikasensitiv (Ampicillin)

Der *E. coli*-Stamm [HMS174(DE3)] ist wie der [BL21(DE3)]-Stamm ein Expressionsstamm für rekombinante Proteine, deren cDNA in pET-Vektoren inseriert ist. Er verfügt durch die Integration des  $\lambda$ -DE3-Phagen ebenfalls über eine Transkriptionskontrolle, die über IPTG reguliert wird.

## 5.4. Vektoren

Die verwendeten Vektoren vermitteln dem zur Transformation eingesetzten *E. coli*-Stamm eine Ampicillin-Resistenz, so daß die transformierten Bakterienklone selektiert werden können. Die Vektoren zur Plasmidanreicherung tragen auch einen Teil des  $\beta$ -Laktamase-Gens, das in Verbindung mit dem [INV $\alpha$ F']-Stamm über die  $\alpha$ -Komplementation eine Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal-Substraten ermöglicht. Bei den Expressionsplasmiden besteht diese Möglichkeit nicht.

### 5.4.1. pCR<sup>TM</sup>II-Vektor

Der pCR<sup>TM</sup>II-Vektor ist aus dem *pUC-Plasmid* entwickelt worden. Er ist ein gebräuchlicher Vektor zur Klonierung von PCR-Amplifikaten (Abb.6).

Zum einen gestattet der pCR<sup>TM</sup>II-Vektor eine durch den T-Überhang an den 5'-Enden vermittelte *TA-Klonierung*, zum anderen kann der mit der cDNA ligierte Vektor direkt zur DNA-Sequenzierung eingesetzt werden.



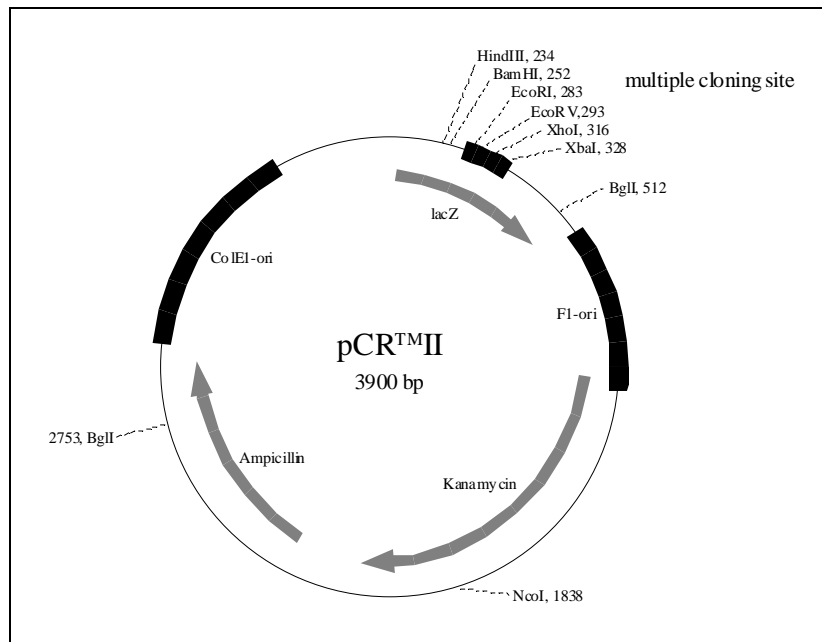


Abb.6 : Genkarte und Schnittstellen des pCR™II-Vektors

### 5.4.2. pET-11a-Vektor

Der pET-11a-Vektor ermöglicht in Verbindung mit den *E. coli*-Stämmen [BL21(DE3)] und [HMS174(DE3)] die Expression rekombinanter Proteine (Abb.7).

Die Expression wird durch IPTG, welches an den lac-Repressor bindet und damit die Anlagerung der T7-Polymerase an den T7-lac-Promotor ermöglicht, induziert.

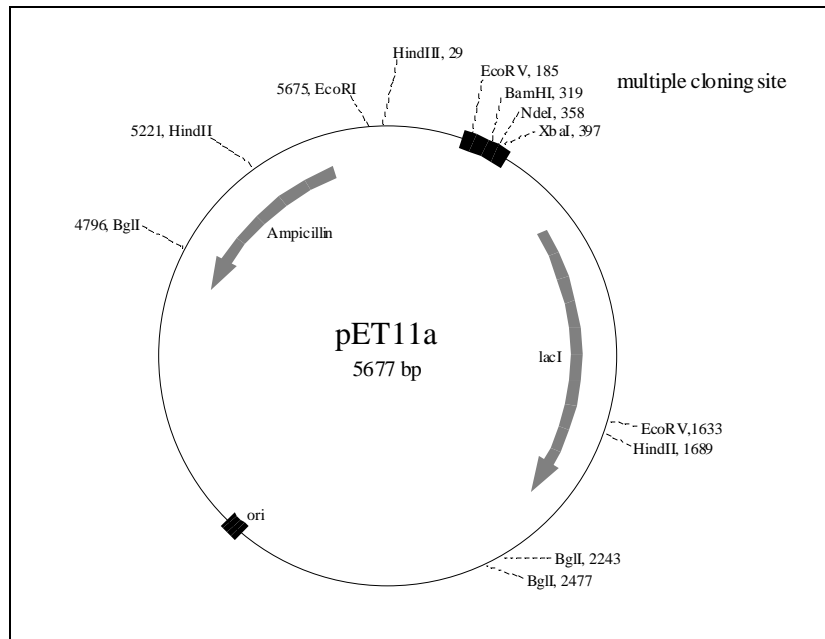


Abb.7 : Genkarte und Schnittstellen des pET-11a-Vektors

### 5.4.3. pET-12b-Vektor

Der pET-12b-Vektor stellt wie der pET-11a-Vektor in Kombination mit den *E. coli*-Stämmen [BL21(DE3)] und [HMS174(DE3)] einen Expressionsvektor für rekombinante Proteine dar (Abb.8). Die Expression wird ebenfalls durch IPTG induziert.

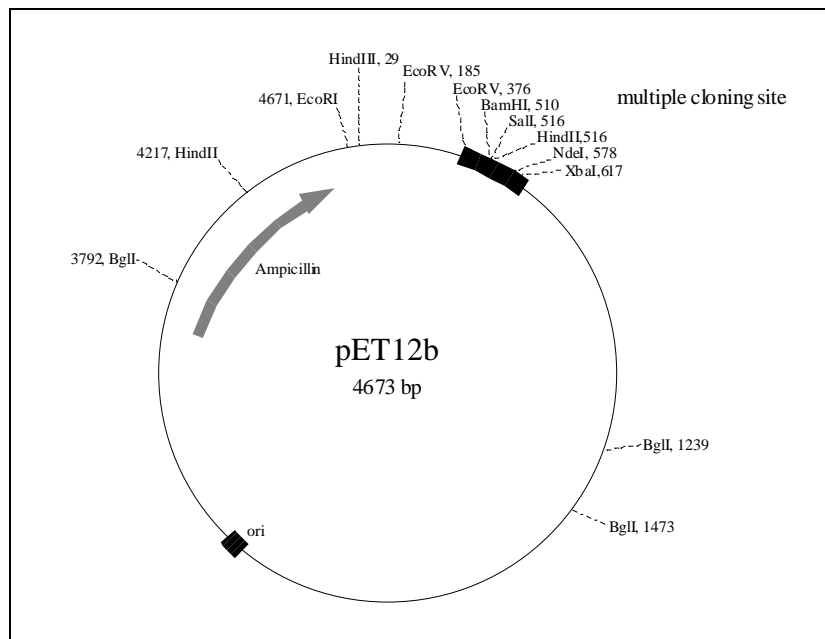


Abb.8 : Genkarte und Schnittstellen des pET-12b-Vektors

#### 5.4.4. pET-15b-Vektor

Der Vektor pET-15b gehört in Verbindung mit den *E. coli*-Stämmen [BL21(DE3)] und [HMS174(DE3)] ebenfalls zu den Expressionsvektoren (Abb.9).

Er bietet jedoch zusätzlich eine Alternative zur einfachen Isolierung des rekombinanten Proteins. Wird die zu exprimierende cDNA über die NdeI-Schnittstelle in den pET-15b-Vektor inkloniert, so wird eine Sequenz von 20 Aminosäuren, der sogenannten *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz, bei der Expression an den N-Terminus des rekombinanten Proteins angefügt. Diese Sequenz zeichnet sich durch zwei Besonderheiten aus :

1. Sie enthält sechs aufeinanderfolgende Histidinreste, welche dem Protein die Koordination an Ni-NTA-Agarose ermöglichen. Auf diese Weise bietet sich die Gelegenheit zur Aufreinigung und ggf. zur Aufreinigung des Proteins über eine Ni-NTA-Säule.
2. Zwischen den Histidinresten und der Proteinregion befindet sich eine Sequenz, die von der Proteinase Thrombin erkannt wird und mit deren Hilfe die *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz nach Isolierung des rekombinanten Proteins wieder abgespalten werden kann.

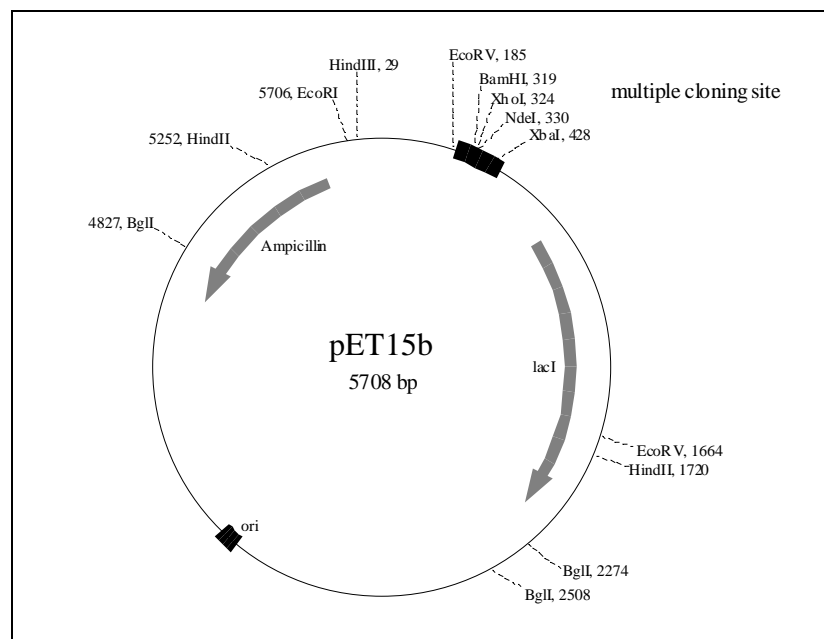


Abb.9 : Genkarte und Schnittstellen des pET-15b-Vektors

---

## 6. Methoden

### I. Gentechnische Methoden

Alle gentechnischen Arbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um eine Kontamination der Materialien mit Fremd-DNA oder Fremdorganismen zu vermeiden. Die verwendeten Gefäße, Arbeitsgeräte und Nährmedien werden daher vor Benutzung autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

#### 6.1. Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Die für gentechnische Arbeiten und für prokaryotische Expressionen am häufigsten verwendeten Wirte sind *E. coli*-Bakterien. Sie haben zum einen kurze Regenerationszeiten, zum anderen enthalten sie außer der chromosomalen DNA extrachromosomale Plasmide, in welche fremde DNA-Sequenzen eingefügt werden können. Die Plasmide erhalten durch Modifizierung des Inserts so eine eigene Transkriptions- und Translationskontrolle.

Die in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind Sicherheitsstämme, welche bestimmte Stoffwechseldefekte aufweisen. Die Anzucht der Bakterien erfolgt daher im Vollmedium.

##### **6.1.1. Übernachtkulturen**

Die Anzucht von *E. coli*-Bakterien zu Übernachtkulturen (üN-Kulturen) erfolgt durch Animpfen von 5 ml LB-Medium mit einem Klon einer LB-Plattenkultur oder 5 µl einer Tiefkühlkultur. Da die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide eine Antibiotikaresistenz (gegen Ampicillin) aufweisen, wird dem Nährmedium Ampicillin zugesetzt und die Anzucht erfolgt unter Selektionsdruck.

- 5 ml LB-Medium mit 5µl Amp<sup>200</sup>-Lsg. versetzen
- Animpfen mit Zellen eines *E. coli*-Stammes
- Inkubation über Nacht bei 37°C im Rollinkubator

→ Isolierung von Plasmid-DNA (6.3.)

→ Tiefkühlkulturen (6.1.2.)

---

Verwendete Lösungen :

LB-Medium :	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl mit bidestilliertem Wasser auf 1 l auffüllen
Ampicillin-Lsg. :	200 mg Ampicillin-Na/ml 70 %igem Ethanol

**6.1.2. Tiefkühlkulturen**

Zur Langzeitlagerung von Bakterien werden Tiefkühlkulturen angelegt. Das zugesetzte Glycerin verhindert dabei die Zellschädigung, die das Medium durch Kristallisation bei tiefen Temperaturen hervorrufen würde. Die Kultur kann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  (Kurzzeitlagerung) oder  $-70^{\circ}\text{C}$  (Langzeitlagerung) aufbewahrt werden.

- 1,5 ml einer üN-Kultur 5 min bei 5000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Zellpellet in 500 µl LB-Medium resuspendieren
- Addition von 500 µl 87 %igem Glycerin und vorsichtig mischen
- Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder  $-70^{\circ}\text{C}$

**6.2. DNA-Gelelektrophorese in Agarosegelen** <sup>[57]</sup>

Diese Methode erlaubt die Auftrennung von DNA-Fragmenten von ca. 300 bp bis 20 kb. Die negativ geladene DNA wandert bei konstantem angelegten elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Laufgeschwindigkeit ist direkt proportional zu der Größe des DNA-Fragmentes. Auf diese Weise erfolgt die Auftrennung von DNA-Fragmenten, ihre Größen- und Konzentrationsbestimmung und ggf. die Elution aus dem Gel.

### 6.2.1. Durchführung der Gelelektrophorese

Abhängig von der Größe der zu analysierenden DNA verwendet man 0,7 %ige (für große Fragmente) bis 2 %ige Agarose-Gele (für kleine Fragmente).

Vorschrift für 1 %ige Gele :

- 1g Agarose durch Aufkochen in 100g TBE-Puffer lösen
- verdampftes Wasser wieder auffüllen
- Lösung auf ca. 50°C abkühlen lassen und in eine Flachbett-Gelkammer gießen
- zur Ausbildung von Geltaschen einen Plastikkamm einsetzen
- Gel ca. eine Stunde auspolymerisieren lassen
- Überschichten des Geles mit TBE-Puffer
- Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernen

Auftragen der Proben :

- Proben mit ca. 0,5 Volumen BPB-Saccharose-Lösung versetzen
- maximal 15 µl Probenlösung in die Geltaschen pipettieren
- 2 µl 1kb-Leiter als Referenz in eine Geltasche pipettieren
- Gelelektrophorese bei konstanter Stromstärke von 80 mA ca. eine Stunde laufen lassen

#### Verwendete Lösungen :

TBE-Puffer :	90 mM Tris/HCl    pH 4,8 90 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
BPB-Saccharose-Lösung. :	0,05 % (w/v) Bromphenolblau 60 % Saccharose in H <sub>2</sub> O
1kb-Leiter :	20 µl 1kb-Leiter 40 µl BPB-Saccharose-Lösung 80 µl H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

### 6.2.2. Färbung der DNA im Agarosegel

Die DNA-Banden werden mit Ethidiumbromid gefärbt. Dabei lagert sich dieses spezifisch an die DNA an und bildet einen Komplex, welcher im UV-Licht ( $\lambda=302$  nm) fluoresziert. Die Interkalierung des Ethidiumbromids in die DNA bedingt jedoch auch eine hohe Cancerogenität, so daß die Handhabung mit großer Sorgfalt erfolgen muß.

- das Agarosegel ca. 10 min in einer Ethidiumbromidlösung inkubieren
- das Gel ca. 10 min in Wasser waschen, bis überschüssiges EtBr entfernt ist
- Sichtbarmachung der Banden im UV-Licht bei  $\lambda=302$  nm (Floureszenz)
- Analyse des Gels und ggf. Dokumentation durch Sofortbild

#### Verwendete Lösung :

Ethidiumbromidlösung                      1 $\mu$ g/ml Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

### 6.2.3. Größenbestimmung der DNA-Fragmente

Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wird ein DNA-Vergleichsstandard mit auf das Gel aufgetragen. Diese sogenannte 1kb-Leiter enthält definierte DNA-Fragmente folgender Größen (bp) :

12216	7126	2036	396
11198	6108	1636	344
10180	5090	1018	298
9162	4072	517	220
8144	3054	506	200

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer untersuchten Lösung basiert auf dem Vergleich mit Proben bekannter Konzentration. Jedes Fragment der 1kb-Leiter hat eine Konzentration von 200 ng/ $\mu$ l. So ist es möglich durch einen Vergleich der Helligkeit der Marker-Banden mit den Proben-Banden auf die Konzentration der aufgetrennten DNA-Fragmente zu schließen.

### **6.3. Isolierung von Plasmid-DNA** <sup>[58]</sup>

Die Isolierung rekombinanter Plasmide erfolgt aus üN-Kulturen transformierter *E. coli*-Zellen. Die Zellen werden unter geeigneten Bedingungen aufgebrochen, die Plasmide von *E. coli*-Bestandteilen getrennt und anschließend aufgereinigt. Die so gewonnenen DNA-Fragmente können zur Sequenzierung, zur Restriktionsanalyse, zu PCR-Reaktionen oder für weitere Transformationen verwendet werden.

Je nach Anforderung an Reinheit und Menge der Plasmid-DNA werden verschiedene Methoden zur Isolierung angewendet.

#### **6.3.1. Alkalische Mini-Lyse**

Die Alkalische Mini-Lyse dient der schnellen Isolierung von größeren Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterien. Bei dieser Methode werden die *E. coli*-Zellen lysiert, die Plasmid-DNA im alkalischen Milieu denaturiert und chromosomale DNA sowie Proteine der Bakterien durch Zentrifugation abgetrennt. Durch darauffolgende RNase-Behandlung wird die verbliebene RNA hydrolysiert und die Plasmide durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt.

- 1,5 ml üN-Kultur in ein Eppendorfgefäß überführen
  - Zellen 5 min bei 5000 rpm abzentrifugieren; Überstand verwerfen
  - Zellpellet in 100 µl A1-Lösung 1 resuspendieren
  - Inkubation 5 min bei RT (Zell-Lyse)
  - Addition von 200 µl A1-Lsg.2; Inkubation 5 min bei 0°C
  - Addition von 150 µl A1-Lsg.3 ; vortexen ; Inkubation 5 min bei 0°C
  - *E. coli*-Bestandteile 10 min bei 11000 rpm abzentrifugieren
  - Plasmidtragenden Überstand in neues Eppendorfgefäß überführen
  - Addition von 10 µl RNase-Lösung ; vortexen
  - Inkubation 30 min bei 37°C
- Phenolextraktion (6.5.1.)  
→ Ethanol-fällung (6.5.2.)

#### Verwendete Lösungen :

Al-Lösung 1 :	25 mM Tris/HCl pH 8,0
	1 % (W/V) Glucose
	10 mM EDTA
	2 mg/ml Lysozym



Al-Lösung 2 :	0,2 N NaOH 1 % (W/V) SDS
Al-Lösung 3 :	3 M Kaliumacetat-Lösung pH 4,8
RNase-Lösung :	10 mM Tris/HCl pH 7,0 10 mg/ml RNase A

### 6.3.2. Plasmidisolierung nach „QIAprep<sup>TM</sup>-Spin“<sup>[59]</sup>

Diese Methode wurde von der Firma QIAGEN entwickelt, um schnell sehr saubere, besonders zur Sequenzierung geeignete DNA zu erhalten. Die Isolierung basiert auf einer modifizierten Alkalischen Lyse. Dabei wird die Eigenschaft von Plasmid-DNA ausgenutzt in einem Puffer mit einer hohen Konzentration an chaotropen Salzen an eine Siliciummembran zu binden, welche unter diesen Bedingungen keine RNA oder Proteine bindet. Nach Reinigung der Membran durch zwei Waschvorgänge wird die Plasmid-DNA mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> oder salzfreiem Puffer von der Membran eluiert.

- 3 ml üN-Kultur 5 min bei 5000 rpm zentrifugieren
- Zellpellet in 250 µl Puffer P1 resuspendieren
- Addition von 250 µl Puffer P2 ; vorsichtig invertieren
- Inkubation 5 min bei RT (Zell-Lyse)
- Addition von 350 µl Puffer N3 ; vorsichtig invertieren
- *E. coli*-Bestandteile 10 min bei 13000 rpm abzentrifugieren
- Überstand in QIAprep<sup>TM</sup>-Spin-Säule überführen
- 30-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren (Adsorption Plasmid-DNA)
- Überstand verwerfen
- 500 µl Puffer PB auftragen
- 30-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren; Überstand verwerfen
- 750 µl Puffer PE auftragen
- 30-60 s bei 13000 rpm zentrifugieren; Überstand verwerfen; nochmals zentrifugieren
- QIAprep<sup>TM</sup>-Spin-Säule in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auftragen; 3-4 min Inkubation
- Plasmid-DNA durch Zentrifugation bei 13000 rpm eluieren

Die verwendeten Puffer werden von der Firma QIAGEN im QIAprep<sup>TM</sup>-Spin-Kit bereitgestellt.

## **6.4. DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen**

### **6.4.1. Elektroelution im Dialyse-Schlauch**

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente werden durch Elektroelution aus der Gelmatrix isoliert. Die entsprechenden Banden werden aus dem Gel ausgeschnitten und durch Anlegen eines elektrischen Feldes eluiert.

- Gelstück mit entsprechender Bande unter UV-Licht ausschneiden und in einen Dialyseschlauch überführen
- 200 µl 0,5 × TBE-Puffer zugeben und luftblasenfrei verschließen
- Dialyseschlauch in eine mit 0,5 × TBE-Puffer gefüllte Flachbettkammer legen, so daß das Gelstück parallel zur Kathode am Rand des Dialyseschlauches liegt
- ca. 20 min einen Strom von 40 mA anlegen
- ca. 1 min die Stromrichtung umkehren
- Elutionskontrolle unter UV-Licht (302 nm)
- Pufferlösung in ein Eppendorfgefäß überführen
- Dialyseschlauch nochmals mit 200 µl 0,5 × TBE-Puffer waschen
- Lösungen vereinigen und aufarbeiten

→ Phenolextraktion (6.5.1.)

→ Ethanol-fällung (6.5.2.)

### **6.4.2. Isolierung mittels „RF<sup>TM</sup>-Purification“**

Die im Agarosegel aufgetrennten DNA-Banden werden aus dem Gel ausgeschnitten. Durch Auflösen der Agarose in Silica-Binding-Puffer und Isolierung analog zur „QIAprep<sup>TM</sup>-Spin“-Plasmid-isolierung gereinigt.

- DNA-Banden unter UV-Licht ausschneiden und in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- pro 100 mg Agarosegel 300 µl Silica-Binding-Puffer zugeben
- bei 60°C inkubieren, bis das Gelstück vollständig aufgelöst ist
- Lsg. auf eine „QIAprep<sup>TM</sup>-Spin“-Säule auftragen; 60s bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen; nochmals zentrifugieren
- „QIAprep<sup>TM</sup>-Spin“-Säule in ein Eppendorf-Gefäß überführen
- 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auftragen und 3-4 min inkubieren
- Plasmid-DNA durch Zentrifugation bei 13000 rpm eluieren

## **6.5. Reinigung von DNA**

Nach Kontakt mit Puffer, Medien oder Lösungen ist die schnelle Aufreinigung von DNA-Proben von besonderer Bedeutung. Reproduzierbare Ergebnisse können nur mit absolut reiner DNA erhalten werden

### **6.5.1. Phenolextraktion**

Bei der Phenolextraktion werden Proteinverunreinigungen aus wäßrigen DNA-Lösungen beseitigt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaft des Phenols reichern sich die Proteine in der phenolischen Phase an, während die Plasmid-DNA in der wäßrigen Phase bleibt.

- zu 1 Volumen DNA-Lsg. Addition von 1 Volumen Phenol-Lösung
- Gemisch kurz vortexen
- 7 min bei 7000 rpm zentrifugieren (Phasentrennung)
- obere Phase vorsichtig abpipetieren

→ Ethanol-fällung (6.5.2.)

→ Isopropanol-fällung (6.5.3.)

#### Verwendete Lösungen :

Phenol-Lösung :	1 kg Phenol
	1 l Chloroform
	41,6 ml Isoamylalkohol
	1,65 g 8-Hydroxychinolin
	mit 10 mM Tris/HCl auf pH 7,5 einstellen

### **6.5.2. Ethanol-fällung**

Die Ethanol-fällung von DNA-Proben dient der Befreiung von anorganischen Verunreinigungen und der Konzentrierung der DNA. Optimale Ausbeuten an DNA erhält man durch Zusatz von Natriumacetat-Lösung (pH 5,2). Bei diesem pH-Wert wird jedoch neben der DNA auch EDTA präzipitiert. Um diesen Effekt zu verhindern, wird die Fällung auch durch Natriumacetat-Lösung (pH 8) begünstigt.

- 
- zu 1 Volumen DNA-Lösung Addition von 2 Volumen Ethanol (96 % ; -20°C)
  - bei niedrigem Salzgehalt 0,1 Volumen 1M Natriumacetat-Lösung zugeben
  - gut mischen (schütteln)
  - 15 min bei -20°C inkubieren (DNA-Fällung)
  - 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren
  - Überstand verwerfen und Pellet mit 100 µl Ethanol (70 % ; -20°C) waschen
  - 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
  - Überstand verwerfen und Pellet ca. 10 min unter Clean-bench trocknen lassen
  - Pellet in entsprechendem Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufnehmen

### 6.5.3. Isopropanolfällung

Die Isopropanolfällung dient ebenfalls zum Abtrennen von anorganischen Verunreinigungen von der DNA-Lösung. Das Isopropanol dehydratisiert das DNA-Molekül und bewirkt so eine Fällung der DNA bei tiefen Temperaturen.

- zu 1 Volumen DNA-Lösung Addition von 1 Volumen Isopropanol (-20°C)
- bei niedrigem Salzgehalt 0,1 Volumen 1M Natriumacetat-Lösung zugeben
- 20 min Inkubation bei -20°C (DNA-Fällung)
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 0,5 Vol. Ethanol (70 % ; -20°C) waschen
- 10 min bei 13000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet ca. 10 min unter Clean-bench trocknen lassen
- Pellet in entsprechendem Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufnehmen

## 6.6. Polymerase-Chain-Reaction (PCR) <sup>[60]</sup>

Mit Hilfe der *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR) ist es möglich auch sehr geringe Mengen an DNA zu amplifizieren. Voraussetzungen sind neben einer DNA-Polymerase zwei chemisch synthetisierte Oligonukleotidprimer. Ihre Sequenzen sind so gewählt, daß sie komplementär zu jeweils einem der Bereiche sind, die das anzureichernde DNA-Fragment (Template) begrenzen. Werden Primer eingesetzt, welche nicht in allen Basen komplementär zur eingesetzten DNA sind, so erfolgt eine *in-vitro-Mutagenese* im Randbereich der Originalsequenz. Dies ermöglicht die Einführung von Start- und Stopcodons sowie von Restriktionsstellen in die amplifizierte DNA.

Die verwendete hitzestabile *Vent-Polymerase* zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate bei der Replikation aus, da sie ein *proof-reading*-System besitzt, mit dem sie jede angefügte Base überprüft und bei einer Fehlpaarung durch ihre 3'→5'-Exonukleaseaktivität wieder entfernt. Da sie jedoch kein überstehendes Adenosin an das amplifizierte DNA-Fragment anhängt, welches zur Einklonierung in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor benötigt wird, muß eine Nachbehandlung des PCR-Ansatzes mit der Tth-Polymerase erfolgen.

- PCR-Reaktionsansatz : 2,0 µl Template-DNA  
0,5 µl forward-Primer  
0,5 µl reverse-Primer  
0,7 µl dNTPs  
5,0 µl 10× Vent-Puffer  
1,0 µl Vent-Polymerase (1U)  
40,3 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
→ mit 50 µl Paraffin überschichten
  
- PCR-Programm :

1.	60 s	95°C	(vorhergehende Denaturierung)
2.	45 s	95°C	(Denaturierung)
	60 s	46°C + 0,2°C / cycl.	(Annealing)
	60 s	72°C + 1 s / cycl.	(Extension)
3.	39 × zu Schritt 2		
4.	4°C		(Abbruch)
  
- Tth-Nachbehandlung : 1,0 µl Tth-Polymerase zufügen und 10 min bei 72°C inkubieren

→ DNA-Gelelektrophorese in Agarosegelen (6.2.)

→ DNA-Isolierung aus Agarosegelen (6.4.)

## **6.7. Klonierung mittels *TA Cloning Kit*** <sup>[61]</sup>

Der *TA Cloning Kit* wurde von der Firma Invitrogen zur direkten Klonierung von PCR-Produkten in Plasmid-Vektoren entwickelt. Die Methode beruht darauf, daß die für die PCR-Reaktion verwendeten Polymerasen, wie *Taq*- oder *Tth*-Polymerase, am 3'-Ende des Amplifikates ein überstehendes Adenosin anhängen. Dieser 3'-A-Überhang dient zur Einführung des DNA-Fragmentes in einen linearisierten Vektor mit 3'-T-Überhang. Unter Verwendung der T4-Ligase werden die komplementären Enden miteinander verknüpft. Nach der Ligation kann sofort eine Transformation von *E. coli*-Bakterien mit der Plasmid-DNA erfolgen.

Mit Hilfe dieser Technik ist also eine direkte Insertion von PCR-Amplifikaten in bestimmte Vektorsysteme möglich ohne die DNA-Fragmente enzymatisch zu modifizieren.

### **6.7.1. Ligation**

Die Ligation mittels *TA Cloning Kit* bewirkt die Verknüpfung des PCR-Produktes mit dem pCR<sup>TM</sup>II-Vektor. Durch die Ligase des *Phagen T4* werden Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatgruppen des spontan über AT-Basenpaarung an den Vektor angelagerten PCR-Produktes gebildet.

- Ligationsansatz : 6 µl PCR-Produkt  
2 µl pCR<sup>TM</sup>II-Vektor (25 ng/µl)  
1 µl T4-Ligase (1U)  
1 µl T4-Ligase-Puffer

- über Nacht bei 14°C inkubieren

→ Transformation mittels *TA Cloning Kit* (6.7.2.)

### 6.7.2. Transformation mittels TA Cloning Kit

Transformationskompetente Zellen besitzen die Fähigkeit Plasmide an ihrer Oberfläche zu adsorbieren. Die *E. coli*-Bakterien werden bei 0°C mit der Plasmid-DNA inkubiert, wobei sich die Plasmide an die Bakterienzellwand anlagern. Durch einen Hitzeimpuls bei 42°C wird die Zellmembran permeabel, so daß die Fremd-DNA in die Zellen eindringen kann. Nach der Transformation werden die *E. coli*-Zellen bei 37°C regeneriert und auf einem geeigneten Selektionsmedium ausgestrichen.

- Ligationsansätze kurz zentrifugieren und auf Eis stellen
- kompetente Zellen [INVαF] („One Shot™ Cells“) auf Eis auftauen
- Addition von 2µl β-Mercaptoethanol (0,5 M); vorsichtig mischen
- Addition eines Ligationsansatzes; vorsichtig mischen
- 30 min bei 0°C inkubieren (Adsorption)
- je 50 µl X-Gal-Lösung auf LB<sup>Amp</sup>-Platten auftragen
- 30 s bei 42°C inkubieren (Membran-Permeabilität)
- 2 min auf Eis abkühlen
- Addition von 250 µl SOC-Medium
- 1 h bei 37°C und 200 rpm inkubieren (Regeneration)
- je 200 µl Kultur auf LB<sup>Amp</sup>-X-Gal-Platten ausstreichen
- restliche Kultur 5 min bei 5000 rpm zentrifugieren; Überstand abgießen
- Pellet in Rücklauf resuspendieren und ausplattieren
- Platten bei 37°C über Nacht inkubieren

→ Screening nach positiven Klonen (6.7.3.)

#### Verwendete Lösungen :

SOC-Medium :                                 20 g Trypton  
  5 g Hefe-Extrakt  
  0,5 g NaCl  
  1,8 g KCl  
  → auf 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> pH 7,0

X-Gal-Lösung :                                 20 mg/ml X-Gal in 100%igem DMF

### 6.7.3. Screening nach positiven Klonen

Positive Klone besitzen eine Antibiotikaresistenz, welche durch ein Gen vermittelt wird, das auf dem einklonierten Vektor liegt. Daher wachsen auf Antibiotikum-haltigen Nährböden nur diejenigen Bakterien, welche entweder den Vektor mit einklonierter Fremd-DNA oder den rezyklierten Vektor aufgenommen haben.

Einige Vektoren ermöglichen über ein sogenanntes Kontrollgen eine weitere Selektionierung. Der pCR<sup>TM</sup>II-Vektor enthält ein Gen, welches für den N-Terminus der  $\beta$ -Galactosidase kodiert. Auf dem Chromosom des Rezipientenstammes [INV $\alpha$ F] liegt die für den C-Terminus kodierende Region. Durch  $\alpha$ -Komplementation der beiden Fragmente wird das Enzym aktiviert. Die aktive  $\beta$ -Galactosidase hydrolysiert das farblose Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), mit dem die LB<sup>Amp</sup>-Platten ausgestrichen werden, zu einem blauen Indigofarbstoff.

Bei denjenigen Klonen, die die Fremd-DNA im Vektor aufgenommen haben, wird die  $\alpha$ -Komplementation aufgehoben. Diese Kolonien bleiben daher auf der LB<sup>Amp</sup>-Platte farblos. Ob es sich bei der aufgenommenen Fremd-DNA um die zu klonierende cDNA handelt, muß durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung nachgewiesen werden.

### 6.8. Klonierung in Expressionsvektoren

Zur Expression muß das DNA-Insert in einen Expressionsvektor einkloniert werden. Die Vektoren besitzen eine *multiple cloning site*, d.h. eine Reihe verschiedener dicht beieinander liegender Schnittstellen, die es erlauben das Insert über eine „sticky end“-Ligation einzuklonieren. Sowohl DNA-Inserts als auch Vektoren werden dazu durch Hydrolyse mit Restriktionsendonuklasen „sticky end“ aufgeschnitten. Die linearisierten Vektoren werden einer 5'-Dephosphorylierung unterzogen um bei der nachfolgenden Ligation eine intramolekulare Religation zu verhindern.

Außerdem besitzen Expressionsvektoren *Promotoren*, die eine Kontrolle der Expression (Start durch Zugabe von Induktoren) ermöglichen. Diese Regulation ist notwendig um zunächst eine hohe Zelldichte in der Expressionskultur zu erhalten.



### 6.8.1. Restriktion von DNA <sup>[62]</sup>

Eine Reihe von Enzymen, die Restriktionsendonukleasen, sind in der Lage spezifische palindrome DNA-Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren zu erkennen und den DNA-Strang an dieser Stelle zu hydrolysieren. Mit Hilfe dieser Restriktionsenzyme werden Vektoren und DNA-Inserts entweder auf eine Ligation vorbereitet oder nach erfolgter Transformation eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

Für die hier beschriebenen Klonierungsexperimente werden die Restriktionsenzyme SalI, NdeI, EcoRI, BamHI und HindIII verwendet.

- Restriktionsansatz :            5,0 µl wäßr. DNA-Lösung  
   1,0 µl 10× Restriktionspuffer  
   0,2 µl Restriktionsenzym 1  
   0,2 µl Restriktionsenzym 2  
   3,6 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- Inkubation 90 min bei 37°C

→ DNA-Gelelektrophorese (6.2.)

### 6.8.2. 5'-Dephosphorylierung von Vektoren

Durch die 5'-Dephosphorylierung wird verhindert, daß die Vektoren spontan religieren, ohne die Insert-DNA aufgenommen zu haben. Das Enzym, welches zur Dephosphorylierung eingesetzt wird, ist die *Alkalische Phosphatase* (AP).

- Reaktionsansatz :            44 µl Vektor-DNA  
   5 µl AP-Puffer  
   1 µl Alkalische Phosphatase
- Inkubation 1 h bei 37°C

→ DNA-Gelelektrophorese (6.2.)

→ DNA-Isolierung aus Agarosegelen (6.4.)

#### Verwendete Lösungen :

AP-Puffer :	50 mM Tris/HCl	pH 8,5
	1 mM EDTA	

### 6.8.3. Ligation von DNA-Fragmenten <sup>[63]</sup>

Bei der Ligation werden Insert- und Vektor-DNA kovalent verknüpft. Die DNA-Ligase des *Phagen T4* katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen der benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatgruppen des mit dem Vektor zusammengelagerten Inserts.

Die Ausbeute der Ligrationsreaktion ist abhängig vom Verhältnis Insert zu Vektor. Die größte Effektivität wird bei äquimolarem Ansatz erreicht. Ein weiterer die Ausbeute der Ligation bestimmender Faktor ist die DNA-Gesamtkonzentration. Um ein optimales Ergebnis bei der Ligation zu erreichen, wird das Verhältnis Insert zu Vektor in verschiedenen Ligrationsansätzen variiert.

- Reaktionsansatz :
  - 1,0 µl T4-Ligase-Puffer
  - 0,5 µl T4-Ligase
  - x µl Insert-DNA
  - y µl linearisierter Vektor
  - (8,5-x-y) µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

- Inkubation über Nacht bei 14°C

→ Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA (6.8.5.)

### 6.8.4. Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen <sup>[64]</sup>

Die *E.coli*-Zellen werden durch Behandlung mit RbCl- und CaCl<sub>2</sub>-Lösungen in einen kompetenten Übergangszustand gebracht, welcher die Anlagerung von Plasmid-DNA ermöglicht. Die Zellen werden so auf eine Transformation vorbereitet.

- 200 ml LB-Medium mit 2 ml üN-Kultur eines Zellstammes animpfen
- Kultivierung bei 37°C bis eine OD<sub>578</sub> von 0,5 erreicht ist
- Kultur 10 min auf Eis abkühlen
- je 10 ml Kultur in vorgekühlte SM24-Zentrifugenröhrchen überführen
- Zellen 10 min bei 5000 rpm und 4°C pelletieren; Überstand verwerfen
- alle weiteren Schritte auf Eis !
- Pellet in 1 ml Transformationspuffer A (4°C) vorsichtig resuspendieren
- Lösung in gekühltes Eppendorfgefäß überführen
- Zellen 5 min bei 5000 rpm pelletieren; Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml Transformationspuffer B (4°C) resuspendieren

- Kultur 30 min auf Eis inkubieren (Aufbrechen der Zellverbände)
- Zellen 5 min bei 5000 rpm pelletieren; Überstand verwerfen
- Pellet in 200 µl Transformationspuffer B (4°C) resuspendieren
- 200 µl Glycerin zugeben; vorsichtig mischen

→ bei -78°C einfrieren (Lagerung)

→ Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA (6.8.5.)

#### Verwendete Lösungen :

Transformationspuffer A :	10 mM MOPS 10 mM RbCl steril filtrieren	pH 7,0
Transformationspuffer B :	10 mM MOPS 10 mM RbCl 50 mM CaCl <sub>2</sub>	pH 6,5

### **6.8.5. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA <sup>[57]</sup>**

Die Zellmembran der kompetenten Zellen wird in Verbindung mit einem Hitzeschock für Plasmid-DNA permeabel. Die aufgenommene DNA wird im weiteren von der Bakterienzelle wie zelleigene DNA behandelt, bei der Zellteilung repliziert und an beide Tochterzellen weitergegeben.

- Ligationsansätze kurz anzentrifugieren und auf Eis stellen
- kompetente Zellen auf Eis auftauen; 3 µl DMSO zugeben
- Ligationsansätze zugeben und vorsichtig mischen
- Inkubation 30 min auf Eis
- 1 min bei 42°C inkubieren (Hitzeschock)
- Kultur 2 min auf Eis regenerieren
- Addition von 500 µl LB-Medium
- Inkubation 1 h bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator
- 200 µl Kultur auf LB<sup>Amp</sup>-Platten austreichen
- restliche Kultur 5 min bei 5000 rpm zentrifugieren; Überstand abgießen; Pellet im Rücklauf resuspendieren und ebenfalls ausplattieren
- Inkubation üN bei 37°C

## **II. Proteinchemischer Methoden**

Der proteinchemische Teil beschreibt die Methoden zur Expression der rekombinant in *E. coli* hergestellten Proteine. Desweiteren wird ihre Aufreinigung, ihre Isolierung und ihre Charakterisierung erläutert.

### **6.9. Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*** <sup>[71]</sup>

Viele eukaryotische Proteine von industriellem und pharmazeutischem Interesse lassen sich durch ihre geringe natürliche Verfügbarkeit nicht in ausreichenden Mengen gewinnen. Mit Hilfe der Genklonierung und Expression in Gastorganismen läßt sich das gewünschte rekombinante Protein jedoch in ausreichender Menge rekombinant herstellen.

Expressionen in *E. coli*-Zellen sind möglich, solange das Protein für seine biologische Aktivität keine Glycosylierung benötigt. Auf diese Weise entsteht eine äußerst kostengünstige Methode zur Herstellung rekombinanter Proteine, welche jedoch in großen Mengen nur in denaturierter, also biologisch inaktiver Form isoliert werden. Es sind daher noch Aufarbeitungsschritte zur Faltung des Proteins in seine aktive Konformation erforderlich. Kleinere Mengen sind über das Periplasma auch in nativer Form erhältlich.

#### **6.9.1. Anwachsen der Expressionskultur**

Vor der Induktion der Expression wird die Expressionskultur bis zu einem exponentiellen Wachstum kultiviert. In dieser Phase liegt zum einen eine ausreichend große Anzahl an *E. coli*-Zellen vor, zum anderen finden die Zellen optimale Bedingungen zur Expression vor.

- 750 ml LB-Medium werden in einem Fernbachkolben autoklaviert und anschließend mit 750 µl Amp<sup>200</sup> versetzt
- je Fernbachkolben wird mit 7,5 ml einer üN-Kultur der Expressionskultur angeimpft
- bei 37°C im Schüttelinkubator inkubieren, bis eine OD<sub>578</sub> von ca. 0,6 erreicht ist  
→ Induktion der Expression (6.9.2.)

### 6.9.2. Induktion der Expression

Die Expressionsvektoren sind mit Promotoren ausgestattet, die eine Kontrolle der Expression, also ihren Start durch Induktoren, ermöglichen. Dieser Kunstgriff ist notwendig, weil Bakterien, die mit der Expression von Proteinen beschäftigt sind, deutlich längere Generationszeiten haben. Mit Hilfe der Promotoren besteht die Möglichkeit vor der Expression eine ausreichend große Anzahl an Zellen zu erhalten, außerdem wird ein Überwachsen der Kultur mit Mutanten, die die Fähigkeit zur Proteinexpression verloren haben, vermieden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren (pET-Vektoren) besitzen ein induzierbares lacZ-Gen, welches durch den Induktor Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) angeschaltet werden kann. Das IPTG bindet dabei an den lac-Repressor und ermöglicht die Anlagerung der T7-Polymerase an den T7-lac-Promotor, wodurch die Transkription gestartet wird.

- 750 ml einer Expressionskultur ( $OD_{578} \approx 0,6$ ) werden mit 300  $\mu$ l IPTG induziert
  - 4 h bei 37°C und 225 rpm im Schüttelinkubator inkubieren
- Zellyse, Reinigung und Aufschluß der „inclusion bodies“ (6.9.4.)

#### Verwendete Lösungen :

IPTG-Lösung : 1 M IPTG in H<sub>2</sub>O

### 6.9.3. Expressionskontrolle

Zur Kontrolle wird der Expressionskultur vor und in stündlichen Abständen nach der Induktion eine Probe entnommen. Die Proben werden denaturiert und einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen. Eine erst nach der Induktion auftretende Proteinbande, die mit der Zeit stärker wird, deutet auf die Expression eines rekombinanten Proteins hin. Die aus der Basensequenz der klonierten cDNA berechnete Größe des Proteins kann als erster Hinweis auf dessen Expression hinweisen.

- vor und stündlich nach der Induktion entnimmt man der Expressionskultur eine Probe von 1,5 ml
- Proben 5 min bei 5000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Pellet in 300  $\mu$ l Laemmli-Puffer resuspendieren und 10 min auf 100°C erhitzen

→ SDS-Gelelektrophorese (6.10.)

#### 6.9.4. Zellyse, Reinigung und Aufschluß der „inclusion bodies“

Bei der Expression eines Proteins werden häufig „inclusion bodies“ (ib) gebildet, welche zum Großteil aus Oligomeren des rekombinanten Proteins bestehen. Die Disulfidbrücken in den Oligomeren werden durch Waschen mit dem Aufschlußpuffer aufgebrochen, so daß das Protein in Lösung gelangt.

- 4 h nach der Induktion wird die Bakteriensuspension in 1l-Tubes überführt
- 20 min bei 5000 rpm zentrifugieren; Überstand vorsichtig abdekantieren
- Pellet in 70 ml Aufschlußpuffer pro g Pellet suspendieren und im Ultraturax homogenisieren
- pro ml Aufschlußpuffer 0,3 mg Lysozym zugeben
- 30 min bei 37°C im Schüttelinkubator inkubieren
- 15 min bei 0°C inkubieren und im Ultraturax homogenisieren
- Homogenisat in 250 ml-Tubes überführen; 30 min bei 10000 rpm zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- Pellet in 20 ml Waschpuffer pro g Pellet im Ultraturax resuspendieren
- 30 min bei 10000 rpm zentrifugieren; Überstand verwerfen
- Waschvorgang zweimal wiederholen
- Pellet in 50 ml i.b.-Puffer aufnehmen und im Ultraturax homogenisieren
- über Nacht bei Raumtemperatur rühren
- 30 min bei 10000 rpm zentrifugieren; evtl. entstandenes Pellet verwerfen
- Überstand (i.b.-Lösung) bei 4°C lagern

##### Verwendete Lösungen :

Aufschluß-Puffer :	100 mM Tris/HCl	pH 8,5
	5 mM Benzamidin	
	5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol	
Waschpuffer :	100 mM Tris/HCl	pH 8,5
	5 mM Benzamidin	
	5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol	
	1 M Harnstoff	
i.b.-Puffer :	20 mM Tris/HCl	pH 8,5
	100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol	
	8 M Harnstoff	

## **6.10. SDS-Gelelektrophorese** <sup>[65],[66]</sup>

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese lassen sich Proteingemische entsprechend der Größe der Proteine auftrennen. Das Prinzip ist, wie bei der DNA-Gelelektrophorese, die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld.

Die zu untersuchende Probe wird vor der Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt. Zum einen wird so die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgebrochen, zum anderen lagern sich die SDS-Moleküle an die Aminosäuren an. Die Proteine erhalten auf diese Weise eine negative Ladung, die proportional ihrer molaren Masse ist. Die Auftrennung der Proteine erfolgt somit ausschließlich nach ihrer Größe, wobei große Moleküle aufgrund der Hinderung durch die Gelporen langsamer wandern als kleine.

Die Sichtbarmachung der Proteinbanden erfolgt bei geringerer Empfindlichkeit (ab 2 µg) durch Coomassie-Blue-Färbung und bei hoher Empfindlichkeit (ab 0,02 µg) durch Silberfärbung. Die Größen der aufgespaltenen Proteine werden durch Vergleich mit einem Proteinstandard, der Proteine bekannter Größe enthält, bestimmt. Eine Konzentrationsbestimmung kann nur bei der Coomassie-Blue-Färbung erfolgen, da sich bei der Silberfärbung die Silberionen nur an Asp-, Glu- und Cys-Reste anlagern und diese in verschiedenen Proteinen in unterschiedlicher Anzahl vorliegen.

### **6.10.1. Durchführung der SDS-Gelelektrophorese**

Als Gelmatrix wird ein Polyacrylamid(PAA)-Gel mit N,N'-Methylenbisacrylamid als Vernetzungsreagenz verwendet. Durch Variation der Acrylamidkonzentration läßt sich die Porengröße des Gels festlegen. Die Polymerisation des Acrylamids wird radikalisch mit Ammoniumperoxid (APS) gestartet.

#### Vorschrift für ein 10%iges PAA-Gel :

- 6 ml Gelpuffer, 3ml Acrylamidlösung und eine Spatelspitze APS mischen
- Gel-Lösung zwischen zwei durch Spacer getrennte und mit einer Silikondichtung versehenen Glasplatten gießen
- Teflonkamm zur Taschenbildung einsetzen
- Polymerisation ca. 30 min
- Teflonkamm und Silikondichtung entfernen und Gel in eine Elektrophoresekammer einspannen
- Kammer mit Elektrodenpuffer befüllen
- Proben in Geltaschen einpipettieren

Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Front die untere Gelkante erreicht. Bei Coomassie-Blue-Färbung verwendet man 8 µl eines Molekulargewichtstandards (LMW-Marker), bei Silberfärbung 2 µl.

Verwendete Lösungen :

Gelpuffer :	1,5 M Tris/HCl	pH 9,4
	4 % (w/v) SDS	
	0,23 % (v/v) TEMED	
Acrylamidlösung :	30 % (v/v) Acrylamid/H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
	0,9 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid/H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
Elektrodenpuffer :	25 mM Tris/Glycin	pH 8,6
	0,1 % (w/w) SDS	
LMW-Marker :	Phosphorylase B	94.000 Da
	Albumin	67.000 Da
	Ovalbumin	43.000 Da
	C-Anhydrase	30.000 Da
	Trypsininhibitor	20.100 Da
	α-Lactalbumin	14.400 Da
	in	
	200 µl 1M Tris/HCl	pH 7,3
	250 µl 10%ige SDS-Lsg.	
	400 µl Glycerin (87%)	
	50 µl gesättigte BPB-Lösung	
	50 µl H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
	50 µl β-Mercaptoethanol	

### 6.10.2. Vorbereitung der Proben <sup>[67]</sup>

Soll die Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt werden, wird den Proben Laemmli-Puffer zugegeben. Die Disulfidbrücken der Proteine werden dann durch das enthaltene β-Mercaptoethanol aufgebrochen und globuläre Proteine werden in ihre Untereinheiten getrennt. Unter nichtreduzierenden Bedingungen wird dem Laemmli-Puffer kein β-Mercaptoethanol zugesetzt.



Zur Vorbereitung zur Elektrophorese werden die Proben im Verhältnis 10:1 mit Laemmli-Puffer gemischt und 10 min auf 100°C erhitzt (Denaturierung).

Verwendete Lösungen :

Laemmli-Puffer :                    1,25 ml 1M Tris/HCl            pH 6,8  
    3 ml 10%ige (w/v) SDS-Lösung  
    4,8 g Harnstoff  
    0,5 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol  
    0,5 ml 10%ige Bromphenolblau-Lsg.  
    → mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 10 ml auffüllen

### 6.10.3. Coomassie-Blue-Färbung

*Coomassie Blue* lagert sich an denaturierte Proteine an und wird sichtbar nach Auswaschen von überschüssigem Farbstoff. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit lässt sich zu der Färbelösung Natriumpikrat zusetzen.

- Gel in einer Coomassie-Blue-Lösung ca. 30 min färben
- Gel solange in H<sub>2</sub>O waschen, bis der Hintergrund entfärbt ist und die Banden gut sichtbar sind

Verwendete Lösungen :

Coomassie-Blue-Lösung :            0,1% (v/v) Coomassie-Blue in Fixierlösung  
    0,1 M Natriumpikrat

### 6.10.4. Silberfärbung <sup>[68]</sup>

Bei der Silberfärbung bilden Ag<sup>+</sup>-Ionen Komplexe mit Asp-, Glu- und Cys-Resten der Proteine. Durch Formaldehyd im alkalischen Milieu wird das Ag<sup>+</sup>-Ion der Komplexe zu elementarem Silber, welches im Gel sichtbar wird, reduziert.

- Gel 30 min in Fixierlösung schütteln
- Gel 10 min in H<sub>2</sub>O waschen
- Gel 1 min in wäßriger Lösung von Farmers Reducer inkubieren
- Gel bis zur vollständigen Entfärbung in H<sub>2</sub>O waschen
- Gel 30 min in 0,1 %iger Silbernitrat-Lösung inkubieren
- Gel zweimal 1 min in H<sub>2</sub>O waschen
- Gel in 2,5 %ige Natriumcarbonat-Lösung geben
- 150 µl 35 %ige Formaldehydlösung zugeben
- bei gewünschter Farbintensität Färbung mit 10 %iger Essigsäure stoppen

#### Verwendete Lösungen :

Fixierlösung : 5:5:1 (v/v/v) Ethanol/Wasser/Essigsäure

Farmers Reducer : 16 g/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O  
10 g/l K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]

### **6.11. Sequenzierung**

Das Sequenzblotting dient zum Nachweis bekannter Proteine sowie zur Aufklärung der Aminosäuresequenz unbekannter Proteine. Zunächst wird die zu bestimmende Probe einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen, wobei Geltaschen mit hoher Aufnahmekapazität gewählt werden. Das PAA-Gel wird dann auf eine PVDF-Membran geblottet und mit *Coomassie Blue* gefärbt. Die zu untersuchende Proteinbande wird ausgeschnitten und kann sequenziert werden.

#### **6.11.1. Sequenzblotting** <sup>[69]</sup>

- SDS-Gelelektrophorese der Proteinprobe
- 2 Blot-Filterpapiere für 10 min in Blot-Puffer inkubieren
- Blot-Membran für 10 min in Ethanol, dann für 10 min in Borat-Puffer inkubieren
- Blotsandwich blasenfrei zusammenlegen :
  1. Filterpapier
  2. PAA-Gel
  3. PVDF-Membran
  4. Filterpapier

- Blotsandwich mit PAA-Gel zur Kathode orientiert in Blotapparatur legen
  - bei 150 mA blotten; Dauer richtet sich nach Proteingröße : 1 min pro kDa MW
  - Membran mit *Coomassie Blue* für 30 min färben
  - Hintergrund der Membran mit Fixier-Lösung entfärben
  - zu sequenzierende Proteinbanden ausschneiden
- Mikrosequenzierung nach Edman (6.11.2.)

#### Verwendete Lösungen :

Blot-Puffer :	25 mM Tris/HCl	pH 8,7
	190 mM Glycin	
	10% Ethanol	

### **6.11.2. Mikrosequenzierung nach Edman <sup>[70]</sup>**

Für die Mikrosequenzierung nach Edman genügen ca. 10 µg Protein, um Sequenzen von 20 bis 30 Aminosäuren des Proteins zu ermitteln. Diese Anzahl an Aminosäuren reicht in der Regel aus, um die Identität eines Proteins zweifelsfrei zu ermitteln. Für den automatisierten Edman-Abbau sind Sequenziermaschinen entwickelt worden, die die Proteine vom N-Terminus sukzessive abbauen und die Aminosäurederivate mittels einer angeschlossenen HPLC-Anlage identifizieren.

## **6.12. Proteinaufreinigung durch Säulenchromatographie**

Für die Proteinaufreinigung existiert eine Reihe von Methoden der Säulenchromatographie. Die Trennung der Proteine beruht dabei auf Eigenschaften wie Größe, Ladung oder Bindungsaffinitäten.

### **6.12.1. Ionenaustauschchromatographie**

Die Ionenaustauschchromatographie wird bevorzugt zur ersten Reinigung des „*ib*-Aufschlusses“ verwendet, da ein - im Vergleich zu anderen Chromatographien - relativ großes Probenvolumen eingesetzt werden kann.

Bei diesem Verfahren wird ausgenutzt, daß Proteine aufgrund ihrer Nettoladung an eine geladene Säulenmatrix binden. Je nach Stärke der Wechselwirkungen, die von pH-Wert und Ionenstärke des Puffers und dem isoelektrischen Punkt des Proteins abhängen, können die Proteine dann mit einem ansteigenden Salzgradienten oder pH-Gradienten eluiert werden. In dieser Arbeit wurde als Ionenaustauschmaterial DEAE-Sepharose, ein Anionenaustauscher, eingesetzt.

- Säule mit DEAE-Puffer äquilibrieren
- 5 ml *ib*-Aufschluß auftragen
- Säule mit DEAE-Puffer spülen, bis der Detektor eine lineare Grundlinie aufzeichnet
- mittels eines Gradientenmischers wird ein linearer Salzgradient (DEAE-Puffer gegen DEAE-Elutionspuffer) angelegt, in dessen Verlauf das Zielprotein eluiert wird

#### Verwendete Lösungen :

DEAE-Puffer :                      50 mM Tris/HCl      pH 8,5  
   4 M Harnstoff  
   40 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

DEAE-Elutionspuffer :            50 mM Tris/HCl      pH 8,5  
   4 M Harnstoff  
   40 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
   2 M NaCl

#### **6.12.2. Gelfiltration**

Bei der Gelfiltration wird eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe erreicht. Die stationäre Phase der Säule besteht aus Kügelchen eines gelartigen, hydratisierten, quervernetzten Polymers mit definierter Porengröße wie Dextran, Agarose oder Polyacrylamid.

Die Trennung beruht darauf, daß größere Proteine die Säule schneller durchlaufen als kleinere, da kleinere Proteine in die Gelkügelchen hineindiffundieren können und somit verzögert eluiert werden.

Für die Durchführung wurde eine Sephacryl S-100-Säule ( $l=85$  cm,  $\varnothing=3$  cm,  $V=600$  ml) mit maximal 5 ml Probe beladen.

- Durchflußgeschwindigkeit auf 12 ml/h einstellen
- Eluat fraktioniert sammeln

Verwendete Lösungen :

Gelfiltrationspuffer :	50 mM Tris/HCl	pH 8,5
	4 M Harnstoff	
	200 mM NaCl	
	40 mM $\beta$ -Mercaptoethanol	

**6.12.3. Affinitätschromatographie an der Ni-NTA-Säule**

Voraussetzung für den Einsatz dieser Chromatographieart ist die Klonierung des zu exprimierenden cDNA-Fragmentes in den pET-15b-Vektor.

Dieser fügt eine Sequenz von 20 Aminosäuren, der sogenannten *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz, an den N- oder C-Terminus des rekombinanten Proteins an. Die *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz enthält sechs aufeinanderfolgende Histidin-Reste, die spezifisch an zweistellige Metallionen binden. Außerdem enthält sie eine Spaltsequenz, die von der Protease Thrombin erkannt wird und die Abspaltung der zusätzlichen Aminosäuresequenz ermöglicht. Bei der Ni-NTA-Säulenchromatographie ist der vierzählige chelatisierende Ligand NTA (nitrilo-tri-acetic acid) an das Säulenmaterial gekoppelt. Das zweiwertige Metallion nimmt mit dem NTA-Liganden eine oktaedrische Konformation ein, wobei die zwei freien Koordinationsstellen des Metalls von den Histidin-Resten der *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz besetzt werden können.

Die Bindung der *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz an das Ni-NTA-Säulenmaterial erfolgt sehr spezifisch, so daß die Abtrennung des rekombinanten Proteins von den kontaminierenden *E. coli*-Proteinen einfach über Waschvorgänge, die die spezifische Bindung des Zielproteins nicht beeinflussen, erfolgen kann. Eluiert wird das Zielprotein schließlich mit einem Imidazolpuffer, wobei die Imidazolmoleküle die Histidinreste aus der Koordinationssphäre des Metallions verdrängen.

- Säule mit Puffer B äquilibrieren
- Säulenmaterial unter Schütteln mit 4ml ib-Aufschluß über Nacht inkubieren
- Säule mit zehnfachem Säulenvolumen Puffer B waschen
- Säule mit zehnfachem Säulenvolumen Puffer C waschen
- Zielprotein mit Elutionspuffer eluieren
- Eluat fraktioniert sammeln

Verwendete Lösungen :

Puffer B :	10 mM Tris/HCl	pH 8,0
	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	8 M Harnstoff	
	10 mM β-Mercaptoethanol	
Puffer C :	wie Puffer B	pH 6,3
Elutionspuffer :	wie Puffer C	
	0,5 M NaCl	
	0,5 M Imidazol	

**6.12.4. Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose 4B** <sup>[59]</sup>

Gelatin-Sepharose 4B wurde zur Aufreinigung von Fibronectin entwickelt. Das an die Sepharose gekoppelte Gelatin bindet spezifisch an Fibronectin oder andere Proteine mit Gelatin-Bindungsdomäne. Auf diese Weise lassen sich große Proteinmengen von Verunreinigungen befreien. Mit Hilfe eines Harnstoffgradienten (0-6 M) werden die zu isolierenden Proteine eluiert. Voraussetzung ist eine vorherige Naturierung der Proteine, da diese nur in ihrer nativen Form an das Säulenmaterial binden. Die Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose gilt somit gleichzeitig als Aktivitätstest.

- Säulenmaterial unter Schütteln mit 5ml Proteinlösung über Nacht inkubieren
- Säule mit 50 ml Tris-Puffer waschen
- Säule mit zehnfachem Säulenvolumen Puffer C waschen
- Zielprotein mit Harnstoffgradienten eluieren
- Eluat fraktioniert sammeln

Verwendete Lösung :

Tris-Puffer :	50 mM Tris/HCl	pH 7,0
	0,5 M NaCl	
	0,01 % (w/v) NaN <sub>3</sub>	

## **6.13. Faltungs- und Aktivitätsexperimente**

### **6.13.1. Faltung durch Dialyse**

Diese Methode der Faltung beruht darauf, daß der Proteinlösung stufenweise das denaturierende Reagenz Harnstoff entzogen wird. Dabei werden 10 ml ib-Aufschluß-Lösung in einen Dialyseschlauch gefüllt und gegen ein großes Volumen eines nativen Puffers dialysiert. Dem Puffer wird dabei schrittweise der Harnstoff entzogen, so daß sich die Proteine langsam zurückfalten können.

- 10 ml ib-Aufschluß in Dialyseschlauch füllen
  - Dialyse bei jeder Harnstoffkonzentration 2h bei 4°C gegen 2 l Dialysepuffer durchführen
- SDS-Gelelektrophorese (6.10.)

#### Verwendete Lösungen :

Dialysepuffer :	5 mM Tris/HCl	pH 7,0
	0,2 M NaCl	
	5 mM CaCl <sub>2</sub>	
	100 mM ZnCl <sub>2</sub>	
	0,005 % (w/v) NaN <sub>3</sub>	
	1. 3 M Harnstoff	
	2. 2 M Harnstoff	
	3. 1 M Harnstoff	
	4. 0,5 M Arginin (2×)	

### **6.13.2. Faltung durch Verdünnung**

Denaturierte Proteine besitzen die Fähigkeit, sich bei sehr geringer Konzentration selbständig in ihre native Konformation zurückzufalten. Man gibt dazu 10 ml einer denaturierten Protein-Lösung in 500 ml Faltungspuffer und inkubiert vier Tage bei 4°C. Als Katalysator der Faltung dient ein Redox-System bestehend aus oxidiertem Glutathion (GSSG) und Dithiothreitol (DTT). Dieses sogenannte *oxido-shuffling-System* ermöglicht die Knüpfung und auch das Aufbrechen von Disulfidbindungen.

Verwendete Lösungen :

Faltungspuffer :	50 mM Tris/HCl	pH 7,5
	0,2 M NaCl	
	0,1 mM ZnCl <sub>2</sub>	
	5 mM CaCl <sub>2</sub>	
	0,005 % (w/v) NaN <sub>3</sub>	
	100 mM Arginin	
	10 mM GSSG	
	3 mM DTT	

**6.13.3. Faltung an Ni-NTA-Agarose**

Bei dieser Methode wird das denaturierte Zielprotein zunächst über die *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz an die Gelmatrix gebunden. Nach zwei Waschschrritten werden dem Puffer schrittweise die denaturierenden Reagenzien Harnstoff,  $\beta$ -Mercaptoethanol und Glycerin entzogen. Auf diese Weise wird dem Protein die langsame Faltung an der Matrix und die anschließende Elution ermöglicht.

- Säule mit Puffer B äquilibrieren
  - Säulenmaterial unter Schütteln mit 4ml ib-Aufschluß über Nacht inkubieren
  - Säule mit 200 ml Puffer B waschen
  - Säule mit 200 ml Puffer C waschen
  - Säule mit 150 ml Faltungspuffer I waschen
  - Säule mit 150 ml Faltungspuffer II waschen
  - Säule mit 150 ml Faltungspuffer III waschen
  - Säule mit 150 ml Faltungspuffer IV waschen
  - Säule mit 150 ml Faltungspuffer V waschen
  - Zielprotein mit Elutionspuffer I oder II eluieren
  - Eluat fraktioniert sammeln
- SDS-Gelelektrophorese (6.10.)



Verwendete Lösungen :

Puffer B :	10 mM Tris/HCl	pH 8,0
	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	8 M Harnstoff	
	10 mM β-Mercaptoethanol	
Puffer C :	10 mM Tris/HCl	pH 6,3
	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	8 M Harnstoff	
	10 mM β-Mercaptoethanol	
Faltungspuffer I :	10 mM Tris/HCl	pH 7,3
	0,5 M NaCl	
	20 % (w/v) Glycerin	
	8 M Harnstoff	
	10 mM β-Mercaptoethanol	
Faltungspuffer II :	10 mM Tris/HCl	pH 7,3
	0,5 M NaCl	
	5 mM CaCl <sub>2</sub>	
	10 μM ZnCl <sub>2</sub>	
	20 % (w/v) Glycerin	
	8 M Harnstoff	
	10 mM β-Mercaptoethanol	
Faltungspuffer III :	10 mM Tris/HCl	pH 7,3
	0,5 M NaCl	
	5 mM CaCl <sub>2</sub>	
	10 μM ZnCl <sub>2</sub>	
	20 % (w/v) Glycerin	
	10 mM β-Mercaptoethanol	
Faltungspuffer IV :	10 mM Tris/HCl	pH 7,3
	0,5 M NaCl	
	5 mM CaCl <sub>2</sub>	
	10 μM ZnCl <sub>2</sub>	
	20 % (w/v) Glycerin	

---

Faltungspuffer V :	10 mM Tris/HCl 0,5 M NaCl 5 mM CaCl <sub>2</sub> 10 µM ZnCl <sub>2</sub>	pH 7,3
Elutionspuffer I :	10 mM Tris/HCl 0,5 M NaCl 1 M Imidazol	pH 7,3
Elutionspuffer II :	0,1 M NaAc 0,1 M NaCl 5 mM CaCl <sub>2</sub> 10 µM ZnCl <sub>2</sub>	pH 4,5

#### 6.13.4. Gelatin-Substratgel

Das Gelatin-Substratgel dient als Aktivitätsnachweis für Proteine die Gelatin spezifisch spalten. Die Durchführung eines Gellaufes entspricht größtenteils der SDS-Gelelektrophorese. Der Unterschied liegt in der Gelmatrix. Dem PAA-Gel ist das Substrat Gelatin zugesetzt. Nach erfolgter Elektrophorese wird das Gel über Nacht in einem nativen Waschpuffer inkubiert und anschließend mit Coomassie-Blue gefärbt. Dabei sollte das gesamte Gel aufgrund des Gelatins blau gefärbt sein und nur die Stellen, an denen das Gelatin gespalten wurde, also die diskreten Proteinbanden, bleiben farblos.

- 12 mg Gelatin in 7,5 ml Gelpuffer unter Aufkochen lösen und abkühlen lassen
- 1,25 ml H<sub>2</sub>O, 3,75 ml Acrylamidlösung (30 %) und eine Spatelspitze APS zugeben
- Gel gießen
- Proben mit Substratgel-Laemmli-Puffer mischen und auf Gel auftragen
- Gelelektrophorese bei 20 mA durchführen
- Gel 2× 30 min mit 2,5 % (w/v) Triton X 100 in Substratgel-Waschpuffer waschen
- Gel über Nacht bei 37°C in Substratgel-Waschpuffer inkubieren
- Gel 30 min in 0,5 %iger Coomassie-Blue-Lösung färben
- Gel solange in H<sub>2</sub>O waschen, bis Banden sichtbar werden

---

Verwendete Lösungen :

Substratgel-Laemmli-Puffer :	1,25 ml 1M Tris/HCl      pH 6,8 3 ml 10%ige (w/v) SDS-Lösung 0,5 ml 10%ige Bromphenolblau-Lsg. → mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> auf 10 ml auffüllen
Substratgel-Waschpuffer :	20 mM Tris/HCl      pH 7,5 10 mM CaCl <sub>2</sub> 0,2 M NaCl 0,005 % Triton X 100
Coomassie-Blue-Lösung :	0,1% (v/v) Coomassie-Blue in Fixierlösung 0,1 M Natriumpikrat

## 7. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die cDNAs der zwei Typ IV-Kollagenase-Domänen aus dem Fibronectin (FnColA, FnColB) und die cDNAs der zwei Fragmente aus der fibronectinähnlichen Domäne der Gelatinase A (FnGel72, FnKat72) in Expressionsvektoren kloniert. Für die cDNA-Fragmente der Domänen FnColA, FnGel72 und FnKat72 konnten Expressionssysteme etabliert werden. Die einzelnen Domänen wurden aufgereinigt und für Naturierungsexperimente eingesetzt.

Die cDNA-Fragmente, kodierend für die vier Domänen, wurden dabei zuerst aus der Gesamt-cDNA des Fibronectins bzw. der Gelatinase A mittels PCR amplifiziert. Hierbei wurden die Amplifikate an den Enden durch *in-vitro-Mutagenese* mit Start- und Stop-Codons sowie mit Restriktionsstellen versehen.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch *TA-Klonierung* in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor kloniert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung wurde eine Restriktionsanalyse und eine DNA-Sequenzierung durchgeführt.

Die nach der Restriktion isolierten cDNA-Fragmente wurden in die Expressionsvektoren pET-11a, pET-12b und pET-15b einkloniert und mit den so entstandenen Plasmiden der „*high-copy*“-*E. coli*-Stamm [JM83] transformiert. Nach erneuter Plasmidisolierung erfolgte die Transformation der *E. coli*-Expressionssysteme [HMS174(DE3)] und [BL21(DE3)], so daß insgesamt 16 potentielle Expressionssysteme erhalten wurden (siehe Tab.2). Die korrekten Klonierungen wurden durch Restriktionsanalysen bestätigt.

Domäne	Vektor	E. coli-Stamm	Expression
FnColA	pET-11a	HMS174(DE3)	----
		BL21(DE3)	----
	pET-12b	HMS174(DE3)	----
		BL21(DE3)	----
	pET-15b	HMS174(DE3)	----
		BL21(DE3)	exprimiert
FnColB	pET-11a	HMS174(DE3)	----
		BL21(DE3)	----
	pET-12b	HMS174(DE3)	----
		BL21(DE3)	----
	pET-15b	HMS174(DE3)	----
		BL21(DE3)	----
FnGel72	pET-12b	HMS174(DE3)	exprimiert
		BL21(DE3)	----
FnKat72	pET-12b	HMS174(DE3)	exprimiert
		BL21(DE3)	----

Tab.2 : Expressionssysteme

Die Domänen FnColA, FnGel72 und FnKat72 wurden in großer Menge erfolgreich exprimiert. Durch automatisierten Edman-Abbau konnten die korrekten Aminosäuresequenzen der Expressionsprodukte bestätigt werden. Versuche zur Proteinaufreinigung und Aktivierung wurden durchgeführt.

## **7.1. Klonierung der cDNA der Domänen FnColA, FnColB, FnGel72 und FnKat72**

### **7.1.1. PCR-Amplifizierung der cDNA-Fragmente**

Zu Beginn der Arbeit standen die cDNA-Fragmente pFH134<sup>[55]</sup> aus Fibronectin und K-121<sup>[56]</sup> aus der Gelatinase A zur Verfügung. Sie dienten als Ausgangsmaterial um die cDNA der gewünschten Gelatin-Bindungsdomänen mittels PCR zu amplifizieren.

Voraussetzung für die gezielte Synthese der Gelatin-Bindungsdomänen war die Entwicklung spezifischer *Oligonukleotidprimer*. Ihre Sequenzen wurden so ausgewählt, daß die eingeführten Start- und Stop-Codons die zu exprimierenden Domänen eingrenzen. Abb.10 zeigt die zu klonierenden Domänen und die zu ihrer Amplifizierung verwendeten *Oligonukleotidprimer*.

Außerdem wurden die PCR-Fragmente bei diesem Schritt mit Restriktionsstellen außerhalb der proteincodierenden Bereiche versehen, die eine spätere Klonierung in Expressionsvektoren ermöglichen sollen.

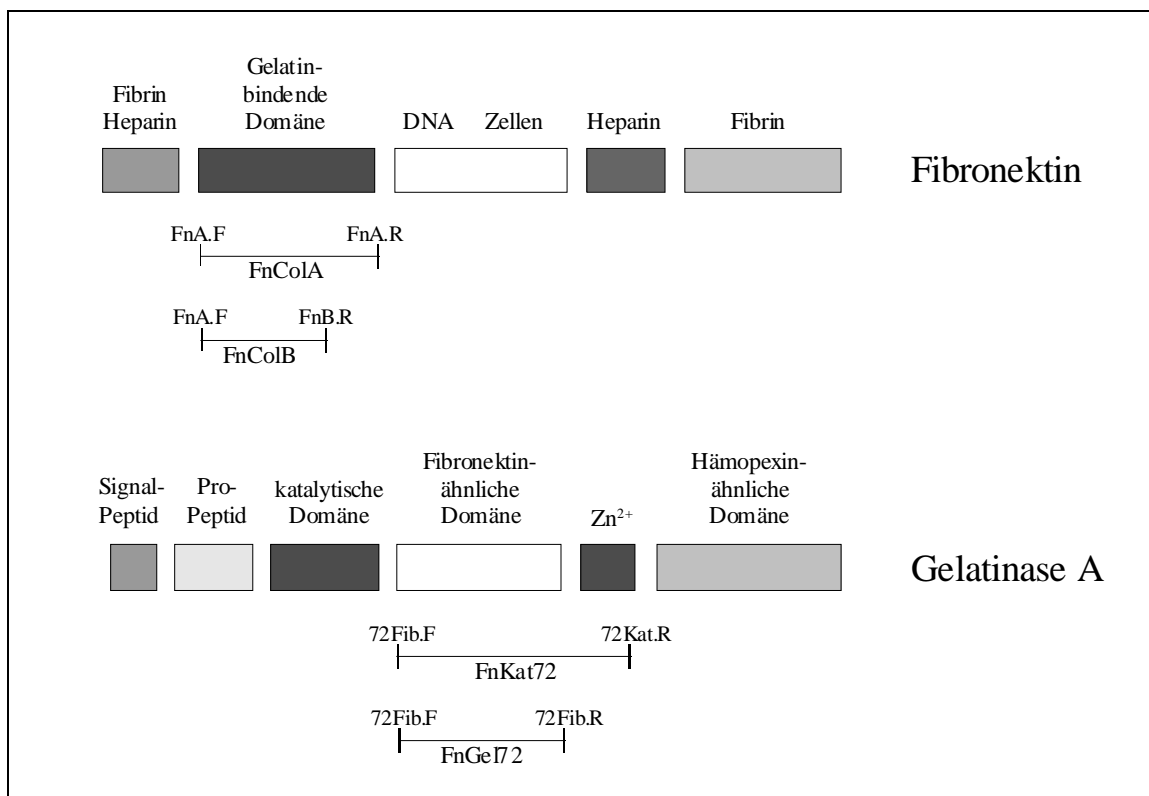


Abb.10 : Darstellung der klonierten cDNA-Fragmente und Positionen der verwendeten Primer

Für die beiden Domänen aus dem Fibronectin wurde der Forward-Primer FnA.F eingesetzt. Er fügt eine NdeI-Schnittstelle mit einem Startcodon in die amplifizierte cDNA ein. Die verwendeten Reverse-Primer FnA.R bzw. FnB.R verfügen über eine BamHI- bzw. SalI-Schnittstelle sowie über ein Stopcodon.

FnA.F :	5'-T CCC TAT <u>CAT ATG</u>   TGT GTC ACA GAC-3'	25 bp T <sub>m</sub> =56°C
	NdeI, Start	
FnA.R :	5'-TTC GAC <u>GGA TCC TCA</u>   TGA GCT TG-3'	23 bp T <sub>m</sub> =58°C
	BamHI      Stop	
FnB.R :	5'-GTC ATC <u>GTC GAC TCA</u>   CTG ATC TCG-3'	24 bp T <sub>m</sub> =58°C
	SalI      Stop	

Die für die Varianten der fibronectinähnlichen Domäne der Gelatinase A kodierenden cDNAs wurden unter Verwendung der Primer 72Fib.F, 72Fib.R und 72Kat.R amplifiziert. Der Forward-Primer fügt wiederum eine NdeI-Schnittstelle mit Startcodon ein, die Reverse-Primer eine SalI-Schnittstelle und ein Stopcodon.

72Fib.F :	5'-A GGC CAA <u>CAT ATG</u>   CGT GTG AAG-3'	22 bp T <sub>m</sub> =52°C
	NdeI, Start	
72Fib.R :	5'-CAC GAG <u>GTC GAC TCA</u>   GTA CCC TTG-3'	24 bp T <sub>m</sub> =54°C
	SalI      Stop	
72Kat.R :	5'- <u>GTC GAC</u> AGA <u>TTA</u>   CCC ATA GAG CTC CTG-3'	28 bp T <sub>m</sub> =68°C
	SalI      Stop	

Die Schnittstellen NdeI und BamHI bzw. SalI ermöglichen das Klonieren der cDNA-Fragmente in die Expressionsvektoren pET-11a, pET-12b und pET-15b.

Für die zu klonierenden cDNA-Fragmente konnte jeweils das gleiche PCR-Programm (vgl. 6.6.) zur erfolgreichen Amplifizierung eingesetzt werden. Die Fragmente FnColA und FnColB aus dem Fibronectin lieferten im Agarosegel die zu erwartenden 900 bp und 630 bp große Banden (Abb.11 + Abb.12). Auch bei den Fragmenten FnGel72 und FnKat72 aus der

Gelatinase A wurden die berechneten Banden von 522 bp und 675 bp erhalten (Abb.13 + Abb.14).

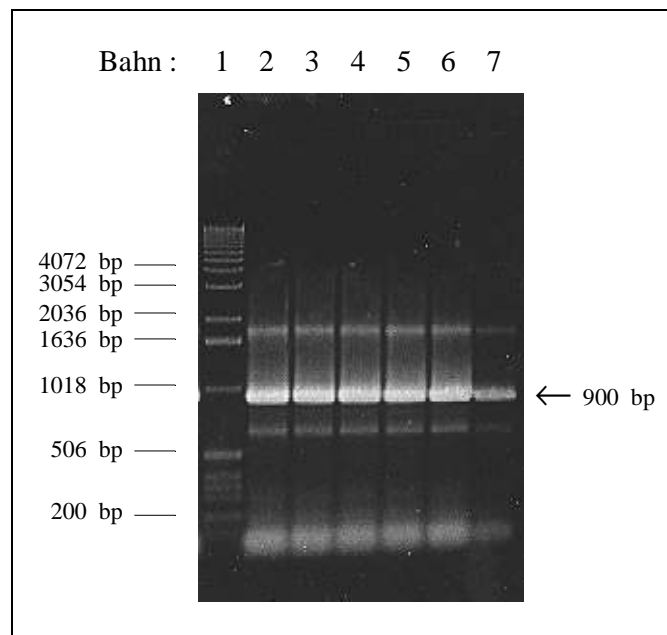


Abb.11 : 1%iges Agarosegel zum Nachweis des PCR-Produktes FncolA (EtBr gefärbt)  
 Bahn 1 : 1kb-Leiter  
 Bahn 2-7 : FncolA PCR-Amplifikat

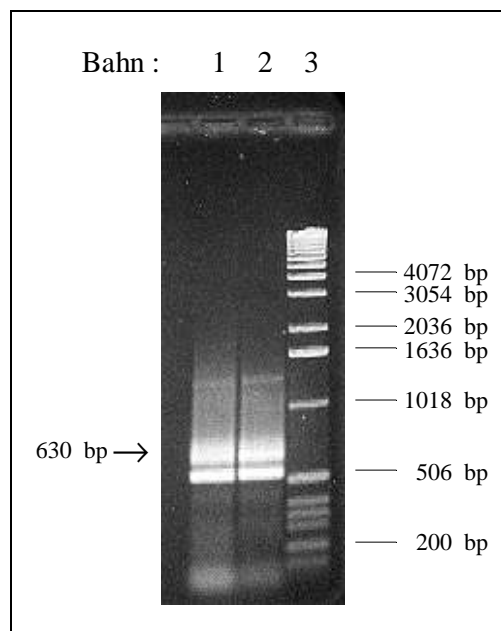


Abb.12 : 1%iges Agarosegel zum Nachweis des PCR-Produktes FncolB (EtBr gefärbt)  
 Bahn 1+2 : FncolB PCR-Amplifikat

## Bahn 3 : 1kb-Leiter

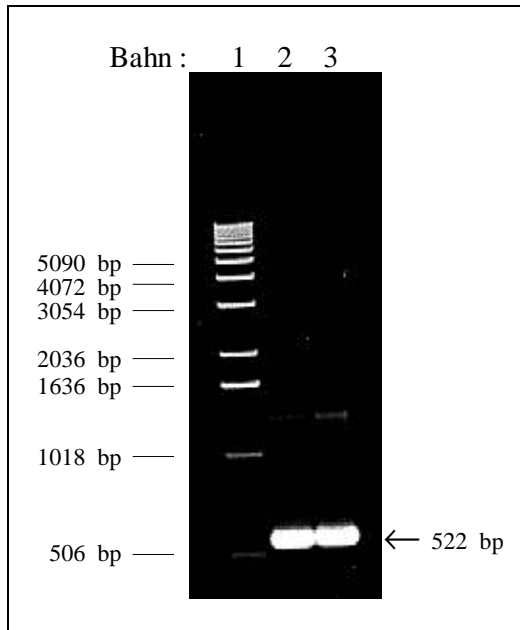


Abb.13 : 1%iges Agarosegel zum Nachweis des PCR-Produktes Fngel72 (EtBr gefärbt)

Bahn 1 : 1kb-Leiter  
 Bahn 2+3 : Fngel72 PCR-Amplifikat

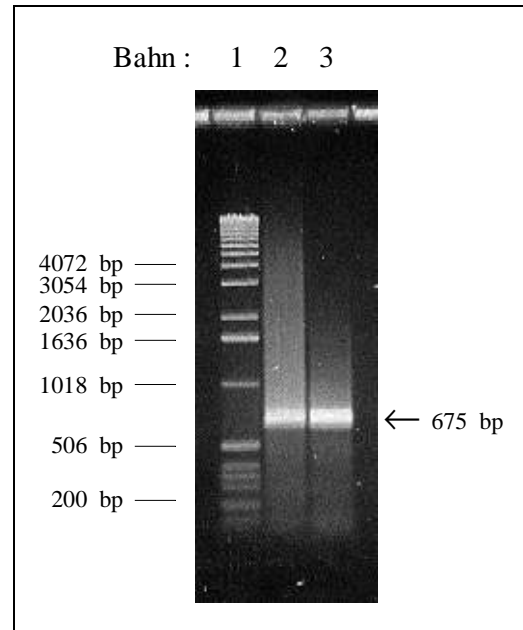


Abb.14 : 1%iges Agarosegel zum Nachweis des PCR-Produktes Fnkat72 (EtBr gefärbt)

Bahn 1 : 1kb-Leiter  
 Bahn 2+3 : Fnkat72 PCR-Amplifikat

Durch die erfolgreich durchgeführten Polymerase-Ketten-Reaktionen standen nun die entsprechenden PCR-Produkte in genügender Menge für die Klonierungen in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor zur Verfügung.

### 7.1.2. Klonierung der PCR-Produkte in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor

Die PCR-Produkte wurden mittels „RF<sup>TM</sup>-Purification“ (6.4.2.) aus den Agarosegelen isoliert und dann durch TA-Klonierung (6.7.) mit dem pCR<sup>TM</sup>II-Vektor ligiert. Mit den so erhaltenen Plasmiden FnColA-pCR<sup>TM</sup>II, FnColB-pCR<sup>TM</sup>II, Fngel72-pCR<sup>TM</sup>II und Fnkat72-pCR<sup>TM</sup>II wurde der E. coli-Stamm [INV $\alpha$ F'] transformiert.

Über den X-Gal-Test ließen sich weiße, potentiell positive Klone selektionieren. Von diesen wurden üN-Kulturen kultiviert und eine Plasmidisolierung nach „QIaprep<sup>TM</sup>-Spin“



durchgeführt. Anschließend wurde die isolierte Plasmid-DNA einer Restriktion mit den Enzymen unterzogen, mit deren Schnittstellen die PCR-Produkte in der PCR ausgestattet wurden.

Die Restriktionsansätze wurden zur Analyse der Transformation im Agarosegel aufgetrennt (Abb.15). Die Ansätze zeigten den linearisierten pCR<sup>TM</sup>II-Vektor bei 3932 bp, die Fragmente FnColA und FnColB (Bahn 2+3) bei 900 bp bzw. 630 bp und die Fragmente FnGel72 und FnKat72 (Bahn 7+8) bei 522 bp bzw. 675 bp.

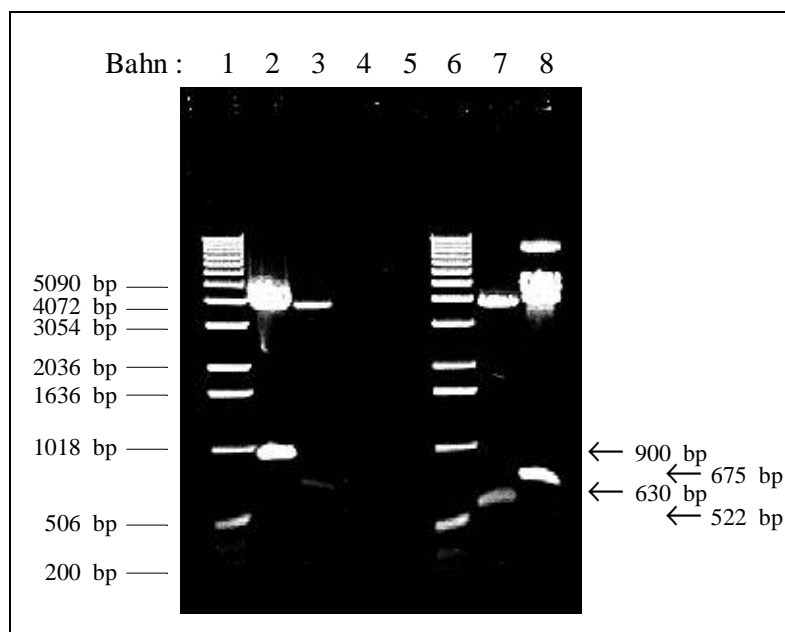


Abb.15 : 1%iges Agarosegel zur Restriktionsanalyse der Transformation (EtBr gefärbt)  
 Bahn 1+6 : 1kb-Leiter  
 Bahn 2 : FnColA-pCR<sup>TM</sup>II, NdeI/BamHI geschnitten  
 Bahn 3 : FnColB-pCR<sup>TM</sup>II, NdeI/SalI geschnitten  
 Bahn 7 : FnGel72-pCR<sup>TM</sup>II, NdeI/SalI geschnitten  
 Bahn 8 : FnKat72-pCR<sup>TM</sup>II, NdeI/SalI geschnitten

Die erfolgreich durchgeführten Klonierungen der PCR-Produkte in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor gestatteten nun die Kontrolle der Basensequenzen der klonierten cDNA-Fragmente und die Umklonierung in Expressionsvektoren.

### 7.1.3. DNA-Sequenzierung der klonierten PCR-Amplifikate

Um die erhaltene Insert-DNA auf die korrekte Abfolge der Basensequenz zu überprüfen, wurde eine DNA-Sequenzierung der mit dem pCR<sup>TM</sup>II-Vektor ligierten PCR-Produkte durchgeführt. Die Insert-DNA konnte so auf eventuelle Mutationen, Deletionen oder Insertionen überprüft werden. Nicht zuletzt sollte die erfolgreiche Einführung der Schnittstellen, Start- und Stopcodons bestätigt werden.

Die durchgeführten Sequenzierungen bewiesen die korrekte Klonierung der DNA-Fragmente in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor mit den entsprechenden Schnittstellen, Start- und Stopcodons. Ein Sequenzvergleich mit den bekannten Sequenzen des Fibronektins sowie der Gelatinase A ergab eine vollständige Übereinstimmung in allen Basen.

#### **7.1.4. Umklonieren der DNA-Fragmente in Expressionsvektoren**

Als Voraussetzung für die Expression der Gelatin-Bindungsdomänen war es notwendig, die entsprechenden cDNA-Fragmente in Expressionsvektoren umzuklonieren.

Zu diesem Zweck wurden die für die Domänen FnColA und FnColB aus dem Fibronektin codierenden Fragmente zum einen mit den Restriktionsenzymen NdeI/BamHI, zum anderen mit NdeI/SalI aus dem pCR<sup>TM</sup>II-Vektor geschnitten. Die isolierte cDNA wurde dann zur Ligation mit dem NdeI/BamHI linearisierten Vektor pET-15b und den NdeI/SalI linearisierten Vektoren pET-11a und pET-12b eingesetzt.

Mit den so erhaltenen Plasmiden erfolgte die Transformation des *E. coli*-Stammes [JM83], ein „high copy“-Stamm, der eine große Anzahl an Plasmiden bereitstellt und so die Kontrolle der Transformation erleichtert.

Die Plasmide wurden dann isoliert, gereinigt und durch Restriktionsanalyse mit den entsprechenden Restriktionsenzymen die erfolgreiche Transformation nachgewiesen. Danach erfolgte die Transformation der Expressionsstämme [HMS174(DE3)] und [BL21(DE3)] mit den gewonnenen Plasmiden.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation wurden aus den erhaltenen Klonen die Plasmide isoliert, diese einer Restriktion mit den Enzymen NdeI und BamHI bzw. SalI unterzogen und eine Agarosegelelektrophorese der Restriktionsansätze durchgeführt.

Die Abbildungen 16a bzw. 16b und 17 beweisen die erfolgreiche Klonierung der Fragmente FnColA und FnColB in die Expressionssysteme.

Abb. 16a zeigt das Plasmid FnColA-pET-12b nach Restriktion mit den Enzymen NdeI und SalI. Man erhielt wie erwartet zwei DNA-Banden: den linearisierten Vektor pET-12b bei 4673 bp und das Fragment FnColA bei 900 bp.

In Abb. 16b sind die Restriktionsansätze der Plasmide FnColA-pET-11a und FnColA-pET-15b nach der Restriktion mit den Enzymen NdeI und SalI bzw. BamHI zu sehen. Bahn 1 und 2 zeigt den linearisierten pET-11a-Vektor bei 5677 bp, Bahn 3 und 4 den linearisierten pET-15b-Vektor bei 5708 bp. Alle Bahnen enthalten das FnColA-Fragment bei 900 bp.

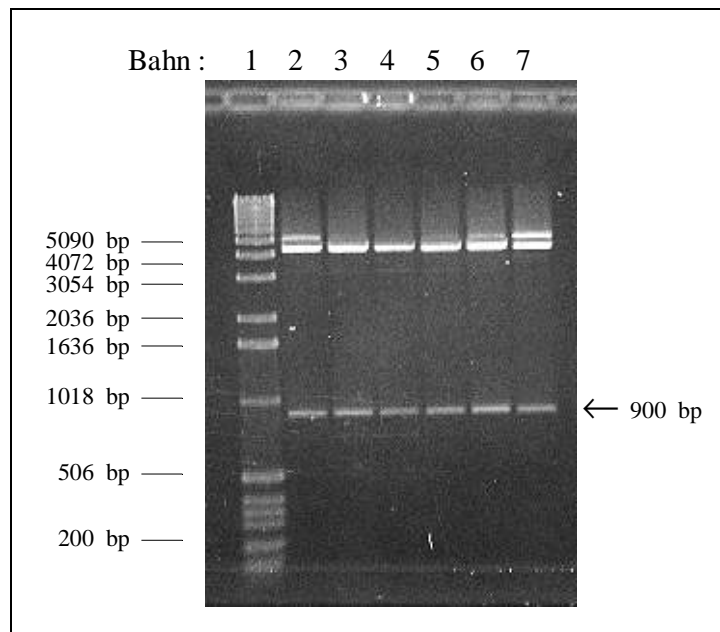


Abb.16a : 1%iges Agarosegel zur Restriktionsanalyse von FnColA-pET-12b (EtBr gefärbt)  
Bahn 1 : 1kb-Leiter  
Bahn 2-4 : FnColA-pET-12b[HMS174(DE3)], NdeI/SalI geschnitten  
Bahn 5-7 : FnColA-pET-12b[BL21(DE3)], NdeI/SalI geschnitten

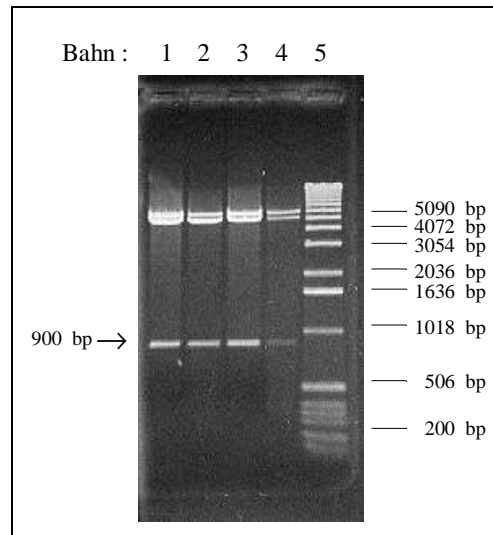


Abb.16b : 1%iges Agarosegel zur Restriktionsanalyse von FnColA-pET-11a und FnColA-pET-15b (EtBr gefärbt)

Bahn 1 : FnColA-pET-11a[HMS174(DE3)], NdeI/SalI geschnitten

Bahn 2 : FnColA-pET-11a[BL21(DE3)], NdeI/SalI geschnitten

Bahn 3 : FnColA-pET-15b[HMS174(DE3)], NdeI/BamHI geschnitten

Bahn 4 : FnColA-pET-15b[BL21(DE3)], NdeI/BamHI geschnitten

Bahn 5 : 1kb-Leiter

Abb.17 weist die korrekte Restriktion der Domäne FnColB aus den Vektoren pET-11a, pET-12b und pET-15b nach. In den Bahnen 2-7 ist die FnColB-Bande bei 630 bp zu sehen. Bahn 2 und 3 zeigt den linearisierten Vektor pET-11a bei 5677 bp, Bahn 4 und 5 den linearisierten Vektor pET-12b bei 4673 bp und Bahn 6 und 7 den linearisierten Vektor pET-15b bei 5708 bp.

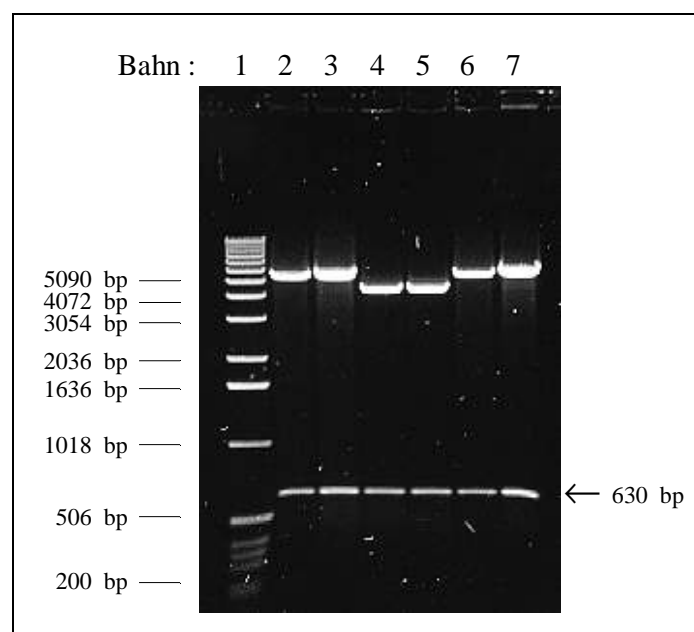


Abb.17 : 1%iges Agarosegel zur Restriktionsanalyse von FnColB-pET-11a, FnColB-pET-12b und FnColB-pET-15b (EtBr gefärbt)  
 Bahn 1 : 1kb-Leiter  
 Bahn 2 : FnColB-pET-11a[HMS174(DE3)], NdeI/SalI geschnitten  
 Bahn 3 : FnColB-pET-11a[BL21(DE3)], NdeI/SalI geschnitten  
 Bahn 4 : FnColB-pET-12b[HMS174(DE3)], NdeI/SalI geschnitten  
 Bahn 5 : FnColB-pET-12b[BL21(DE3)], NdeI/SalI geschnitten  
 Bahn 6 : FnColB-pET-15b[HMS174(DE3)], NdeI/BamHI geschnitten  
 Bahn 7 : FnColB-pET-15b[BL21(DE3)], NdeI/BamHI geschnitten

Die cDNA-Fragmente FnGel72 und FnKat72 aus der Gelatinase A wurden ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und SalI aus dem pCR<sup>TM</sup>II-Vektor geschnitten, isoliert und zur Ligation mit dem NdeI/SalI-linearisierten Vektor pET-12b eingesetzt.

Nach erfolgreicher Transformation des „high copy“-Stammes [JM83] wurden die Plasmide isoliert, gereinigt und mit ihnen die Expressionsstämme [HMS174(DE3)] und [BL21(DE3)] transformiert.

Das Agarosegel der Restriktionsanalyse in Abb.18 zeigt die erfolgreiche Klonierung der Domänen FnGel72 und FnKat72 :

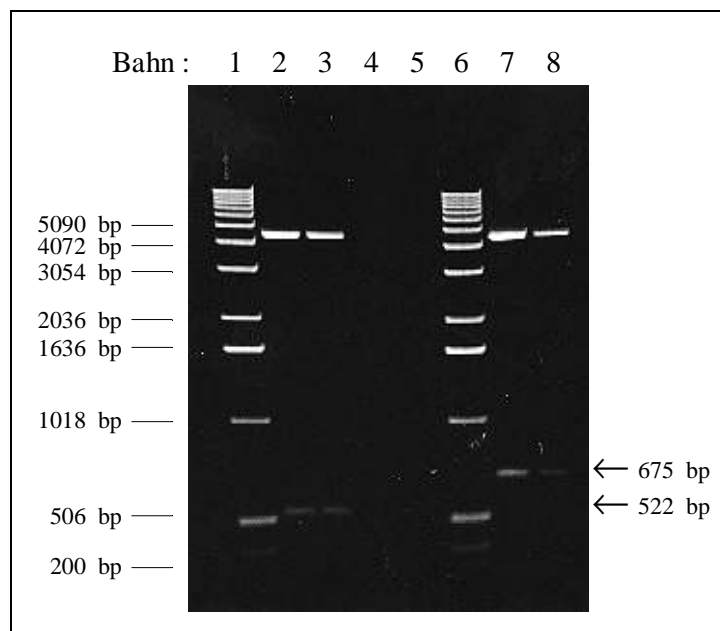


Abb.18 : 1%iges Agarosegel zur Restriktionsanalyse von FnGel72-pET-12b und FnKat72-pET-12b (EtBr gefärbt)  
 Bahn 1+6 : 1kb-Leiter  
 Bahn 2 : FnGel72-pET-12b[HMS174(DE3)], NdeI/SalI geschnitten  
 Bahn 3 : FnGel72-pET-12b[BL21(DE3)], NdeI/SalI geschnitten  
 Bahn 4+5 : frei  
 Bahn 7 : FnKat72-pET-12b[HMS174(DE3)], NdeI/SalI geschnitten  
 Bahn 8 : FnKat72-pET-12b[BL21(DE3)], NdeI/SalI geschnitten

In den Bahnen 2,3,7 und 8 ist der linearisierte Vektor pET-12b bei 4673 bp zu sehen. Die erwartete Bande der FnGel72-Domäne liegt bei 522 bp (Bahn 2+3), die Banden der Domäne FnKat72 bei 675 bp (Bahn7+8).

Aus den Klonierungsexperimenten wurden die in Tab.2 gezeigten 16 potentiellen Expressionssysteme erhalten. Die Expressionsversuche der einzelnen Domänen sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

## **7.2. Expression der Typ IV-Kollagenase FnColA**

### **7.2.1. Testexpression des FnColA-Proteins**

Für das FnColA-Protein wurden folgende sechs Expressionssysteme erhalten :

FnColA-pET-11a [HMS174(DE3)]	FnColA-pET-11a [BL21(DE3)]
FnColA-pET-12b [HMS174(DE3)]	FnColA-pET-12b [BL21(DE3)]
FnColA-pET-15b [HMS174(DE3)]	FnColA-pET-15b [BL21(DE3)]

Diese Expressionssysteme wurden zunächst in kleinem Maßstab auf die korrekte Expression des rekombinanten Proteins überprüft. Zu diesem Zweck wurde eine Kultur mit dem entsprechenden Klon angeimpft und nach Erreichen optimaler Zelldichte die Expression mit IPTG gestartet. Es wurden Proben vor der Induktion und in stündlichen Abständen nach der Induktion entnommen und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

Das Expressionssystem FnColA-pET-15b [BL21(DE3)] zeigte bereits nach einer Stunde eine deutliche Überexpression des gewünschten Proteins. Nach ca. drei Stunden war das Maximum der Expression erreicht (Abb.19). Alle anderen Systeme erwiesen sich als nicht geeignet, da keine signifikante Expression nachgewiesen werden konnte.

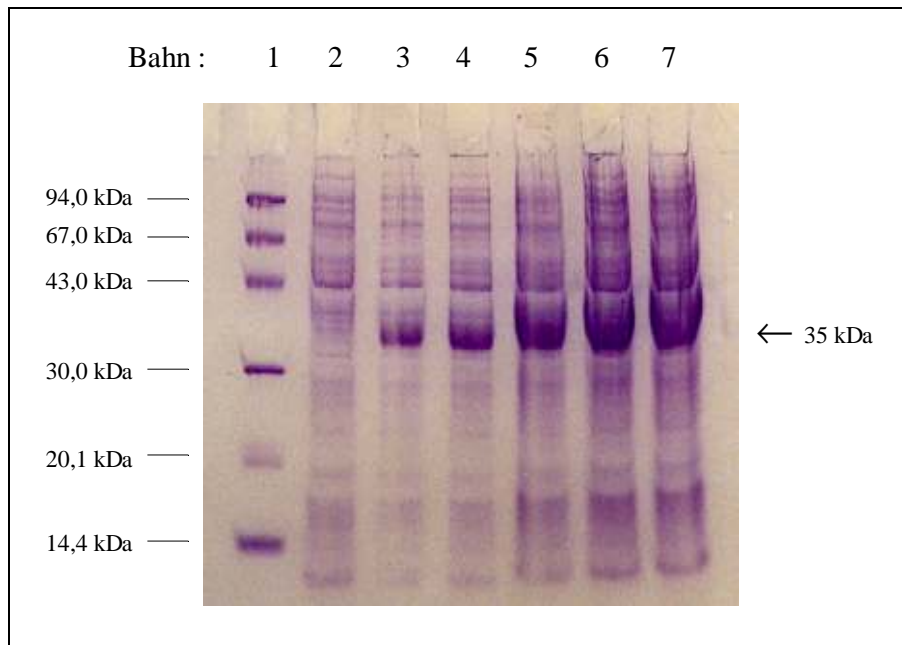


Abb.19 : PAA-Gel zur Expressionskontrolle des FnColA-Proteins (Coomassie-Färbung)

Bahn 1 : LMW-Marker

Bahn 2 : Bakterienkultur vor der Induktion

Bahn 3-7 : Bakterienkultur ☉, 1, 2, 3, und 4 h nach der Induktion

Für die Expressionskontrolle wurden die aus dem Expressionsansatz entnommenen Proben 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, das entstandene Pellet in 300 µl Laemmli-Puffer aufgenommen und zur Analyse auf das PAA-Gel aufgetragen (Abb.19).

Das PAA-Gel der Expressionskontrolle zeigt eine deutliche Bande des exprimierten Proteins bei dem berechneten Molekulargewicht von ca. 35 kDa. Nach drei bis vier Stunden erreicht diese Bande ein Intensitätsmaximum.

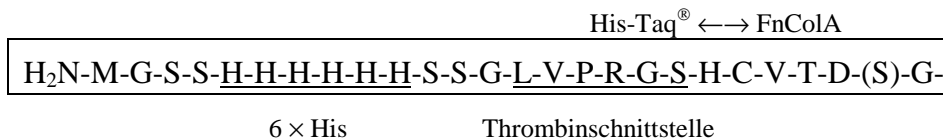
Das Expressionssystem FnColA-pET-15b [BL21(DE3)] erwies sich also als sehr ergiebig und wurde nachfolgend für die Großexpression eingesetzt.

### 7.2.2. Identitätsnachweis von FnColA durch N-terminale Sequenzierung

Für den Identitätsnachweis des exprimierten 35 kDa-Proteins wurde eine Probe von ca. 50 µl aus der FnColA-Testexpression zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese wurde mit Coomassie-Blue gefärbt, die entsprechende

Bande des zu sequenzierenden Proteins ausgeschnitten und der N-Terminus durch automatisierten Edman-Abbau ansequenziert.

Es wurde folgende N-terminale Aminosäuresequenz für das 35 kDa-Protein bestimmt :



Diese Sequenz identifizierte zum einen das exprimierte 35 kDa-Protein als die Typ IV-Kollagenase FnColA. Zum anderen wurde nachgewiesen, daß die His-Taq<sup>®</sup>-Sequenz korrekt an den N-Terminus des Proteins angehängt wurde. Hiermit stand nun also ein Expressionssystem für die Produktion der Typ IV-Kollagenase FnColA zur Verfügung.

### 7.2.3. Großexpression des FnColA-Proteins

Nach der erfolgreich durchgeführten Testexpression und Identifizierung des rekombinanten Proteins wurde die FnColA-Domäne zur Isolierung größerer Mengen in Großkulturen exprimiert.

Zur Durchführung der Großexpression (6.9.) wurden zweimal 750 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium mit dem Klon des Expressionssystems FnColA-pET-15b [BL21(DE3)] angeimpft und bis zum Erreichen optimaler Zelldichte kultiviert. Die Produktion des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Nach vier Stunden wurde die Expression durch Abzentrifugieren der Zellkultur beendet. Auch hier zeigte das PAA-Gel der Expressionskontrolle eine deutliche Überexpression des 35 kDa-Proteins an.

Die Isolierung des Proteins erfolgt über Zellyse und den anschließenden Aufschluß der „inclusion bodies“ (7.6.).

## 7.3. Expressionsversuche der Typ IV-Kollagenase FnColB



Für die Domäne FnColB wurden ebenfalls sechs verschiedene Expressionssysteme erhalten :

FnColB-pET-11a [HMS174(DE3)]	FnColB-pET-11a [BL21(DE3)]
FnColB-pET-12b [HMS174(DE3)]	FnColB-pET-12b [BL21(DE3)]
FnColB-pET-15b [HMS174(DE3)]	FnColB-pET-15b [BL21(DE3)]

Nach erfolgreicher Klonierung und Sequenzierung der für die FnColB-Domäne kodierenden cDNA wurden die erhaltenen Expressionssysteme in Testexpressionen auf die Produktion des gewünschten Proteins überprüft.

Die Typ IV-Kollagenase FnColB konnte jedoch in keinem der sechs Systeme als exprimiertes Protein nachgewiesen werden, obwohl laut cDNA-Sequenzierung die für die FnColB-Domäne kodierende cDNA in vollständiger und korrekter Form vorlag. Dies galt insbesondere für die Start- und Stopcodons, welche eindeutig vorhanden waren und weder Mutationen noch Deletionen aufwiesen.

## **7.4. Expression der fibronectinähnlichen Domäne FnGel72**

### **7.4.1. Testexpression des FnGel72-Proteins**

Für die fibronectinähnliche Domäne der Gelatinase A wurden zwei potentielle Expressionssysteme erhalten :

FnGel72-pET-12b [HMS174(DE3)]	FnGel72-pET-12b [BL21(DE3)]
-------------------------------	-----------------------------

Die beiden Expressionssysteme wurden zunächst in Testexpressionen auf die korrekte Expression des rekombinanten Proteins überprüft. Zu diesem Zweck wurden wiederum Proben vor der Induktion und in stündlichen Abständen nach der Induktion entnommen und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

Das Expressionssystem FnGel72-pET-12b [HMS174(DE3)] zeigte bereits nach einer halben Stunde eine deutliche Überexpression eines 19 kDa-Proteins. Nach vier Stunden war das Maximum der Expression erreicht (Abb.20). Das zweite System erwies sich als nicht geeignet, da keine signifikante Expression des Proteins nachgewiesen werden konnte.

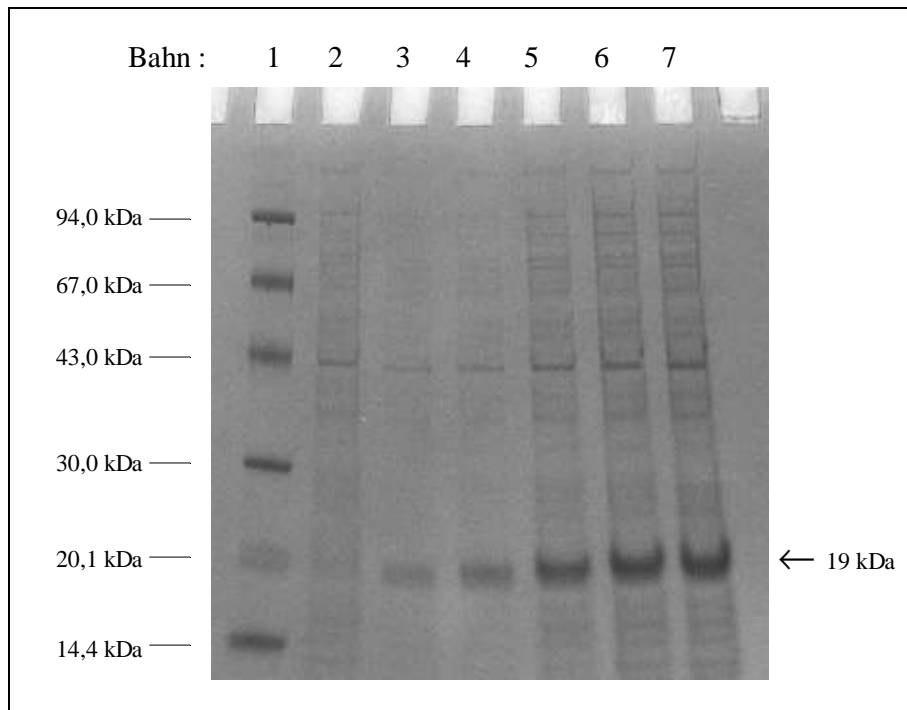


Abb.20 : PAA-Gel zur Expressionskontrolle des FnGel72-Proteins (Coomassie-Färbung)

Bahn 1 : LMW-Marker

Bahn 2 : Bakterienkultur vor der Induktion

Bahn 3-7 : Bakterienkultur ☉, 1, 2, 3, und 4 h nach der Induktion

Die aus dem Expressionsansatz entnommenen Kulturproben wurden abzentrifugiert, das entstandene Pellet in 300 µl Laemmli-Puffer aufgenommen und zur Analyse auf das PAA-Gel aufgetragen (Abb.20).

Das PAA-Gel der Expressionskontrolle zeigt eine deutliche Bande des exprimierten Proteins bei dem berechneten Molekulargewicht von ca. 19 kDa. Nach drei bis vier Stunden erreicht diese Bande ein Intensitätsmaximum.

Das Expressionssystem FnGel72-pET-12b [HMS174(DE3)] erwies sich also als sehr tauglich und wurde nachfolgend für die Großexpression eingesetzt.

#### 7.4.2 Identitätsnachweis von FnGel72 durch N-terminale Sequenzierung

Zur Identifizierung des exprimierten 19 kDa-Proteins wurde eine Probe von ca. 50 µl aus der FnGel72-Testexpression zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine

PVDF-Membran geblottet. Diese wurde mit Coomassie-Blue gefärbt, die entsprechende Bande des zu sequenzierenden Proteins ausgeschnitten und der N-Terminus durch automatisierten Edman-Abbau ansequenziert.

Es wurde folgende N-terminale Aminosäuresequenz für das 19 kDa-Protein bestimmt :

H<sub>2</sub>N-M-R-V-K-Y-G-N-A-

Diese Sequenz identifizierte das exprimierte 19 kDa-Protein eindeutig als die fibronectinähnliche Domäne der Gelatinase A. Hiermit stand nun also ein Expressionssystem für die Produktion des FnGel72-Proteins zur Verfügung.

### **7.4.3. Großexpression des FnGel72-Proteins**

Nach der erfolgreich durchgeführten Testexpression und Identifizierung des rekombinanten Proteins wurde die FnGel72-Domäne zur Isolierung größerer Mengen in Großkulturen exprimiert.

Zur Durchführung der Großexpression (6.9.) wurden, wie unter 7.2.3 beschrieben, zweimal 750 ml LB<sup>Amp</sup>-Medium mit dem Klon des Expressionssystems FnGel72-pET-12b [HMS174(DE3)] angeimpft und bis zum Erreichen optimaler Zelldichte kultiviert. Die Produktion des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Nach vier Stunden wurde die Expression durch Abzentrifugieren der Zellkultur beendet. Auch hier zeigte das PAA-Gel der Expressionskontrolle eine deutliche Überexpression des 19 kDa-Proteins an.

Die Isolierung des Proteins erfolgte ebenfalls über Zellyse und den Aufschluß der „*inclusion bodies*“ (7.6.).

## **7.5. Expression der fibronectinähnlichen Domäne mit katalytischem Zentrum FnKat72**

### 7.5.1. Testexpression des FnKat72-Proteins

Für die fibronectinähnliche Domäne der Gelatinase A, die zusätzlich die Metallbindungstelle des katalytischen Zentrums enthält, wurden ebenfalls zwei potentielle Expressionssysteme erhalten :

FnKat72-pET-12b [HMS174(DE3)]

FnKat72-pET-12b [BL21(DE3)]

Die beiden Expressionssysteme wurden zunächst in kleinem Maßstab auf die korrekte Expression des rekombinanten Proteins überprüft. Zu diesem Zweck wurden wiederum Kulturen mit den entsprechenden Klonen angeimpft und nach Erreichen optimaler Zelldichte die Expressionen mit IPTG induziert. Es wurden Proben vor der Induktion und in stündlichen Abständen nach der Induktion entnommen und mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert.

Wie beim FnGel72-Protein stellte sich auch hier das Expressionssystem des Vektors pET-12b mit dem *E. coli*-Stamm [HMS174(DE3)] als das produktivste heraus. Dieses zeigte nach ca. zwei Stunden eine deutliche Überexpression eines 24 kDa-Proteins. Nach vier Stunden war das Maximum der Expression erreicht (Abb.21). Das zweite System erwies sich als nicht produktiv, da keine sichtbare Expression des Proteins beobachtet wurde.

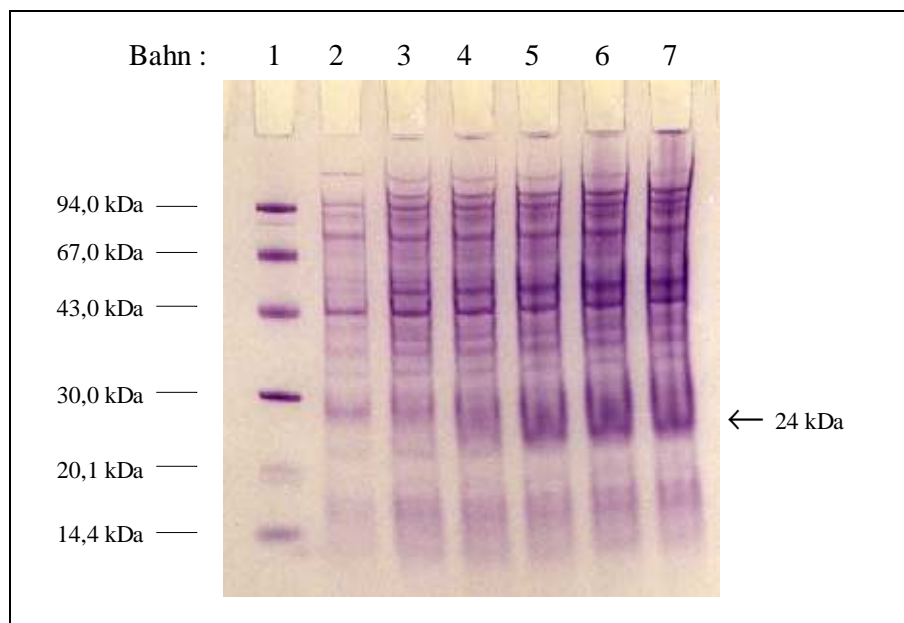


Abb.21 : PAA-Gel zur Expressionskontrolle des FnKat72-Proteins (Coomassie-Färbung)

Bahn 1 : LMW-Marker

Bahn 2 : Bakterienkultur vor der Induktion

Bahn 3-7 : Bakterienkultur ☉, 1, 2, 3, und 4 h nach der Induktion

Aus den Expressionskulturen wurden wiederum Proben entnommen und in einer SDS-Gelelektrophorese untersucht (Abb.21).

Das PAA-Gel der Expressionskontrolle zeigte in Bahn 5, nach zweistündiger Expression, erstmals eine deutliche Bande des exprimierten Proteins bei dem berechneten Molekulargewicht von ca. 24 kDa. Nach vier Stunden erreichte diese Bande ein Intensitätsmaximum (Bahn 7).

Das Expressionssystem FnKat72-pET-12b [HMS174(DE3)] stellte sich also auch als sehr produktiv heraus und wurde nachfolgend für die Großexpression eingesetzt.

### 7.5.2 Identitätsnachweis von FnKat72 durch N-terminale Sequenzierung

Zur Sequenzierung des exprimierten 24 kDa-Proteins wurde eine Probe von ca. 50 µl aus der FnKat72-Testexpression zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese wurde mit Coomassie-Blue gefärbt, die entsprechende Bande des zu sequenzierenden Proteins ausgeschnitten und der N-Terminus durch automatisierten Edman-Abbau bestimmt.

Es wurde folgende N-terminale Aminosäuresequenz für das 24 kDa-Protein bestimmt :

H<sub>2</sub>N-M-R-V-K-Y-G-N-A-

Diese Sequenz identifizierte das exprimierte 24 kDa-Protein als FnKat72-Domäne der Gelatinase A. Hiermit stand nun ebenfalls ein produktives Expressionssystem für die Synthese des FnKat72-Proteins zur Verfügung.

### 7.5.3. Großexpression des FnColA-Proteins

Nach der erfolgreich durchgeführten Testexpression und Identifizierung des rekombinanten Proteins wurde die FnColA-Domäne zur Isolierung größerer Mengen in Großkulturen exprimiert.

Die Großexpression wurde wie unter 6.9. beschrieben mit zweimal 750 ml Kultur durchgeführt und mit dem Klon des Expressionssystems FnKat72-pET-12b [HMS174(DE3)] angeimpft. Vier Stunden nach der Induktion mit IPTG wurde die Expression durch Abzentrifugieren der Zellkultur abgebrochen.

Die Isolierung des Proteins erfolgt zunächst über Zellyse und den abschließenden Aufschluß der „*inclusion bodies*“ (7.6.).

### 7.6. Zellyse und Aufschluß der „*inclusion bodies*“

Die gewählten Expressionssysteme bedingen die Expression der Proteine in „*inclusion bodies*“ (ib) gebildet, welche zum Großteil aus Oligomeren des rekombinanten Proteins bestehen. Beim sogenannten ib-Aufschluß (6.9.4.) werden die Disulfidbrücken in den Oligomeren durch Waschen mit einem Aufschlußpuffer aufgebrochen, so daß das Protein in Lösung gelangt. Ein Vorteil der „*inclusion bodies*“ ist die große Ausbeute an rekombinantem Protein. Der ib-Aufschluß erfordert allerdings denaturierende Bedingungen.

Die rekombinanten Proteine FnColA, FnGel72 und FnKat72 wurden mittels ib-Aufschluß aus den Expressionskulturen isoliert. Abb.22 zeigt das Foto der im PAA-Gel aufgetrennten Proben. In den Bahnen 4, 7 und 10 sind die isolierten Proteine bei 35 kDa, 19 kDa und 24 kDa zu sehen.

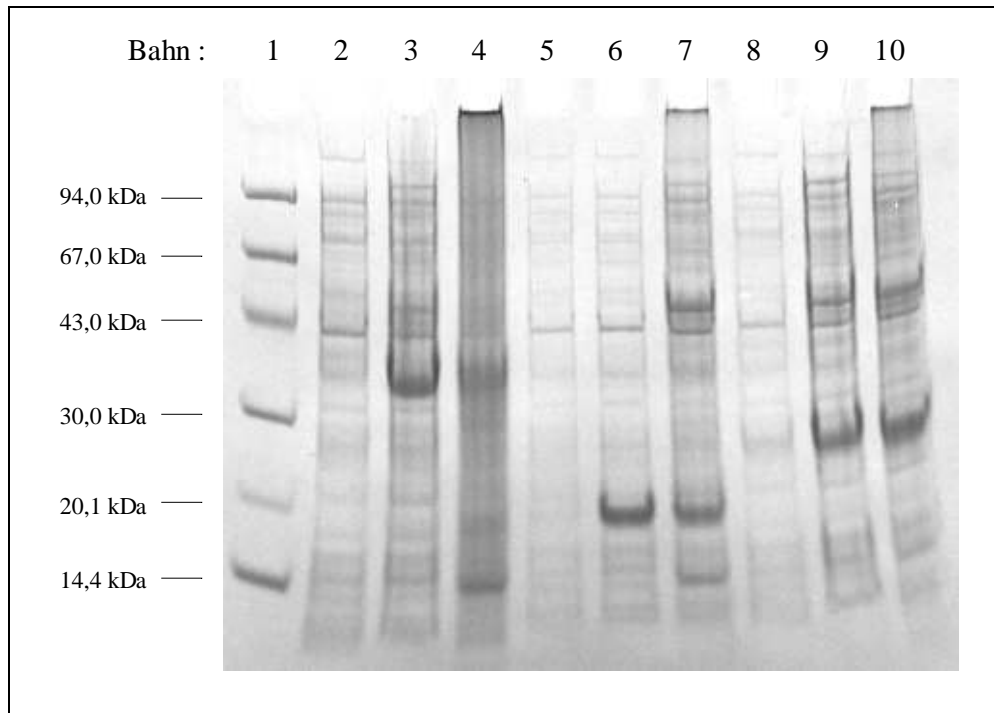


Abb.22 : PAA-Gel zur Kontrolle der ib-Aufschlüsse (Coomassie-Färbung)

- Bahn 1 : LMW-Marker  
 Bahn 2+3 : Bakterienkultur FnColA-pET-15b [BL21(DE3)] vor und nach der Induktion  
 Bahn 4 : ib-Aufschluß FnColA  
 Bahn 5+6 : Bakterienkultur FnGel72-pET-12b [HMS174(DE3)] vor und nach der Induktion  
 Bahn 7 : ib-Aufschluß FnGel72  
 Bahn 8+9 : Bakterienkultur FnKat72-pET-12b [HMS174(DE3)] vor und nach der Induktion  
 Bahn 10 : ib-Aufschluß FnKat72

Zur Kontrolle wurden in den Bahnen 2+3, 5+6 und 8+9 Proben der Expressionskulturen vor und nach der Induktion mit auf das Gel aufgetragen. Die Proteine FnColA, FnGel72 und FnKat72 standen somit in großen Mengen für weitere Aufarbeitungsschritte zur Verfügung.

## **7.7. Aufreinigung der Typ IV-Kollagenase FnColA**

### **7.7.1. Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose**

Zur ersten Aufreinigung des FnColA-Proteins wurde eine Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose (6.12.3) mit dem aus der Großexpression erhaltenen ib-Aufschluß durchgeführt. Diese Methode bietet den Vorteil, daß große Mengen an Protein gereinigt werden können. Hierzu wurde zunächst die Protein-Lösung über Nacht mit der Ni-NTA-Agarose unter Schütteln inkubiert. Das rekombinante Protein mit der *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz wird so an das Säulenmaterial gebunden. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit einem basischen Puffer B (Abb.23, Bahn 2) und einem sauren Puffer C (Abb.23, Bahn 3) gewaschen um nicht gebundene Verunreinigungen zu entfernen. Zur Elution des FnColA-Proteins wurde dann ein linearer Imidazol-Gradient von 0-1,0 M angelegt (Abb.23, Bahnen 4-14).

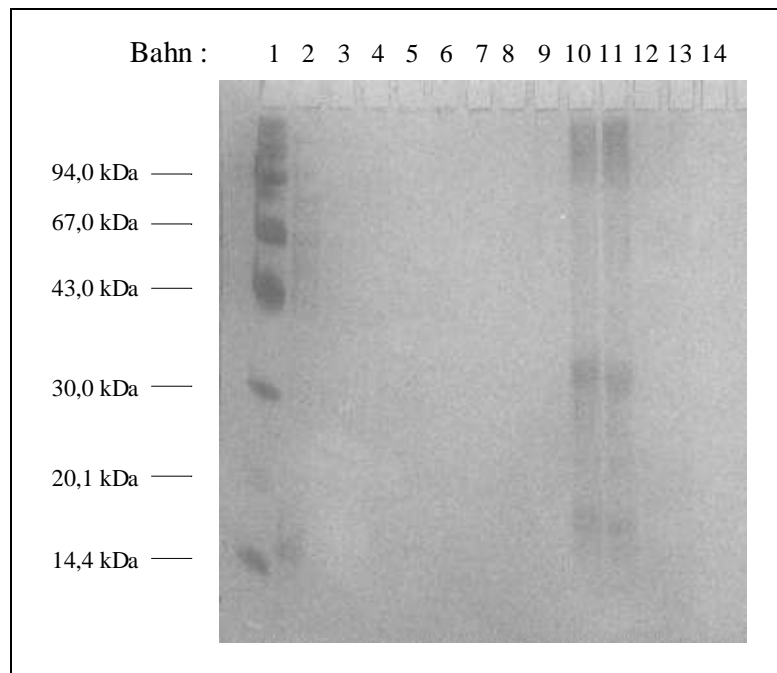


Abb.23 : PAA-Gel zur Ni-NTA-Affinitätschromatographie des FnColA-Proteins  
(Silbernitrat-Färbung)

Bahn 1 : LMW-Marker  
 Bahn 2 : Puffer B-Waschfraktion  
 Bahn 3 : Puffer C-Waschfraktion  
 Bahn 4-14 : Elution mit linearem Imidazol-Gradienten (0-1 M)

In der ersten Waschfraktion (Bahn 2) wird der Großteil der *E. coli*-Proteinverunreinigungen eluiert. Bei der zweiten, Puffer C-Waschfraktion (Bahn 3) sind dagegen nur noch sehr schwache Banden von Verunreinigungen zu erkennen.

Die folgenden Bahnen zeigen die Elutionsfraktionen des Imidazol-Gradienten. Bahn 10 und 11 zeigt die Elution des 35 kDa großen FnColA-Proteins ab einer Imidazol-Konzentration von etwa 0,65 M. Das rekombinante Protein wird allerdings nicht sauber erhalten.

Die Affinitätschromatographie bietet also eine Möglichkeit zur Vorreinigung des FnColA-Proteins. Eine vollständige Aufreinigung ist jedoch nicht möglich. Zu diesem Zweck wurden die Elutionsfraktionen (Bahnen 10 und 11) vereinigt und einer Gelfiltration unterworfen.

### 7.7.2. Gelfiltration an einer Sephacryl S-100-Säule

Die Methode der Gelfiltration stellt ein effektives Verfahren zur Proteinaufreinigung dar. Zum einen ist der Proteinverlust gering und zum anderen ist durch die Wahl der optimalen



Säulenmaterialien, welche sich aus den Molekulargewichten der zu trennenden Proteine ergeben, eine einfache Trennung der Proteine nach ihrer Größe möglich.

Es wurde eine Gelfiltration an einer Sephacryl S-100-Säule unter Verwendung eines denaturierenden Puffers (4 M Harnstoff, 40 mM  $\beta$ -ME) durchgeführt (6.12.2.).

Abb.24 zeigt das PAA-Gel der eluierten Fraktionen aus der Gelfiltration des FnColA-Proteins, welches an der Ni-NTA-Säule vorgereinigt wurde.

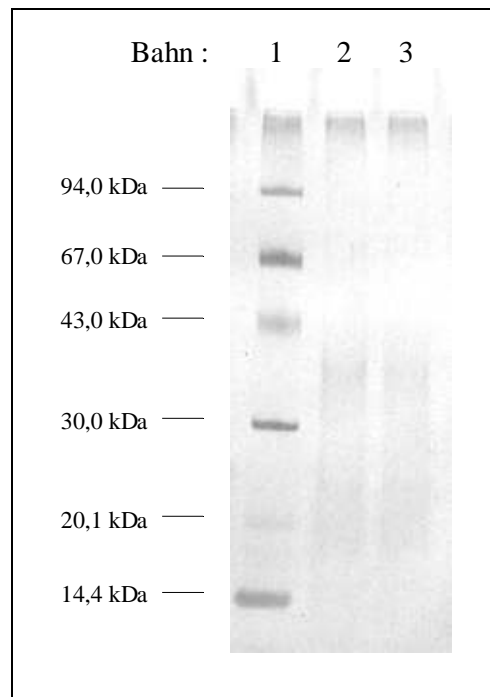


Abb.24 : PAA-Gel zur Gelfiltration des FnColA-Proteins (Silbernitrat-Färbung)  
 Bahn 1 : LMW-Marker  
 Bahn 2+3 : FnColA-Eluate

In Abb.24 (Bahn 2 und 3) sind die FnColA-Eluate bei 35 kDa zu erkennen. Es ist deutlich zu sehen, daß die höhermolekularen Verunreinigungen abgetrennt werden konnten. Lediglich bei 13 kDa ist noch eine sehr schwache Bande zu erkennen.

Das Protein FnColA konnte demnach in relativ reiner Form gewonnen werden und stand somit für weitere Faltungsexperimente zur Verfügung.

## **7.8. Aufreinigung des FnKat72-Proteins**

### **7.8.1. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose**

Für die erste Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* ib-Aufschlüssen ist eine Ionenaustauschchromatographie die Methode der Wahl. Die Kapazität dieser Chromatographie ist relativ groß und hängt nur von der aufgetragenen Proteinmenge und nicht vom Probenvolumen ab.

Für das rekombinante FnKat72-Protein wurde als Säulenmaterial der Anionenaustauscher DEAE-Sepharose ausgewählt. Abb.25 zeigt die eluierten Fraktionen, die das zu reinigende Protein enthalten (Bahnen 2 und 3).

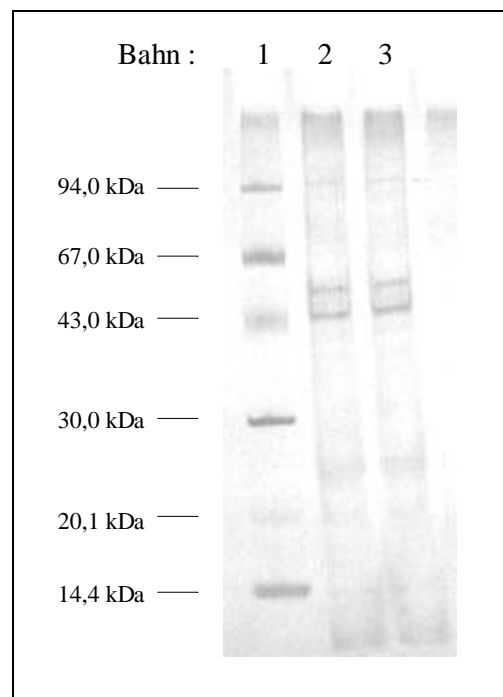


Abb.25 : PAA-Gel zur DEAE-Säule des FnKat72-Proteins (Silbernitrat-Färbung)

Bahn 1 : LMW-Marker

Bahn 2+3 : FnKat72-Eluate

In Abb.25 ist deutlich zu erkennen, daß das FnKat72-Protein (24 kDa) nicht vollständig von den Verunreinigungen abgetrennt werden konnte. FnKat72 wurde zwar an das Säulenmaterial gebunden, eluierte jedoch mit mehreren Proteinen unterschiedlicher Größe gleichzeitig. Trotzdem ist ein geringfügiger Reinigungseffekt erreicht worden. Die Methode der Ionenaustauschchromatographie an der DEAE-Sepharose kann deshalb zur Vorreinigung des FnKat72-Proteins eingesetzt werden. Zur vollständigen Aufreinigung sind jedoch noch andere Verfahren zu wählen.

In diesem Fall wurde eine Gelfiltration an einer Sephacryl S-100-Säule durchgeführt.

### 7.8.2. Gelfiltration an einer Sephacryl S-100-Säule

Es wurde eine Gelfiltration an einer Sephacryl S-100-Säule unter Verwendung eines denaturierenden Puffers (4 M Harnstoff, 40 mM  $\beta$ -ME) durchgeführt (6.12.2.).

Abb.26 zeigt das PAA-Gel der eluierten Fraktionen 71-78 aus der Gelfiltration des FnKat72-Proteins, welches an der DEAE-Säule vorgereinigt wurde.

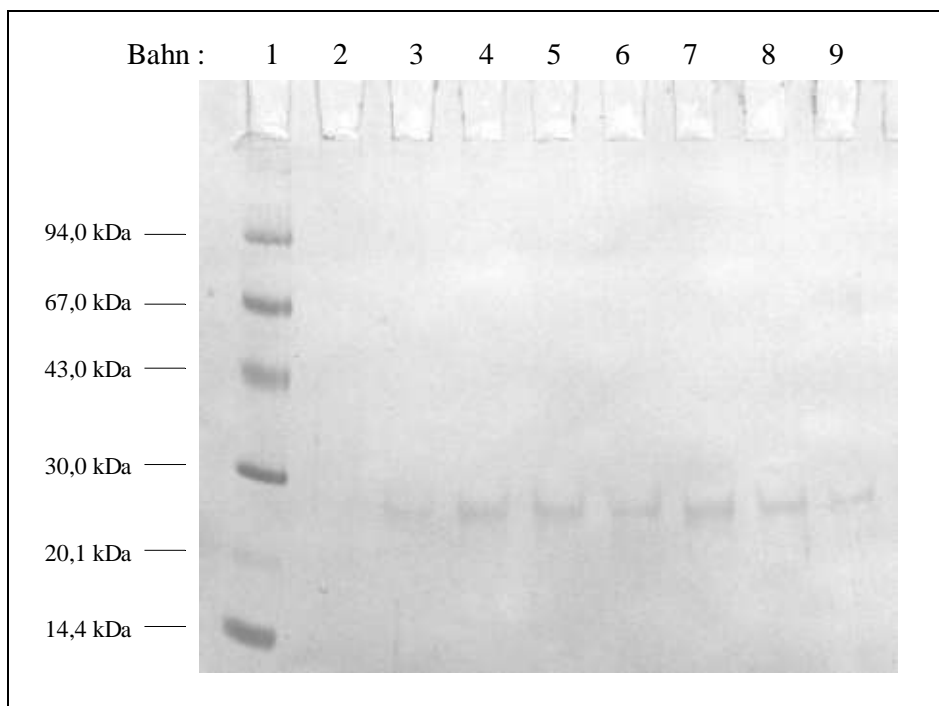


Abb.26 : PAA-Gel zur Gelfiltration des FnKat72-Proteins (Silbernitrat-Färbung)

Bahn 1 : LMW-Marker

Bahn 2-9 : Gelfiltrationsfraktionen 71-78

Die Bahnen 2-9 in Abb.26 zeigen die Fraktionen 71-78 der Gelfiltration. In den Fraktionen 72-78 konnte das FnKat72-Protein (24 kDa) in absolut reiner Form gewonnen werden. Die nach der Ionenaustauschchromatographie an der DEAE-Sepharose verbliebenen Verunreinigungen konnten an der Sephacryl S-100-Säule vollständig abgetrennt werden.

Die Fraktionen 72-78 wurden vereinigt. Somit stand das Protein FnKat72 in ausreichender Menge für Faltungsexperimente zur Verfügung.

## **7.9. Faltungsexperimente**

### **7.9.1. Faltung im Verdünnungsansatz**

Um die Naturierung der exprimierten Proteine FnColA, FnGel72 und FnKat72 zu erreichen, wurden von ihnen Verdünnungsansätze gemacht. Diese Methode (6.13.2.) beruht darauf, daß sich die Proteine bei sehr geringer Konzentration selbständig in die native Konformation zurückfalten. Katalytisches Reagenz ist oxidiertes Glutathion (GSSG) und Dithiothreitol (DTT). Dieses Redox-System (*oxido-shuffling-System*) ermöglicht sowohl das Knüpfen als auch das Aufbrechen von Disulfidbindungen. Zu diesem Zweck wurden jeweils 10 ml der aufgereinigten Proben der Proteine FnColA und FnKat72 und des FnGel72-ib-Aufschlusses in 0,5 l Faltungspuffer gegeben und dieser Ansatz für vier Tage bei 4°C stengelassen. Anschließend wurde die Lösung in einer UF-Kammer auf ca. 10 ml eingengt und Aktivitätstests durchgeführt.

Die erste Überprüfung der Aktivität erfolgte in einem Gelatin-Substratgel (6.13.4). Keines der drei Proteine war jedoch in der Lage Gelatin zu spalten. Es wurden keine entsprechenden Banden erhalten.

Als zweiter Aktivitätstest wurde eine Affinitätschromatographie an Gelatin-Sepharose (6.12.4.) durchgeführt. Doch auch in diesem Fall konnte bei keinem der drei Proteine eine spezifische Bindung an das Säulenmaterial festgestellt werden. Sie eluierten alle schon während der Waschschrte zusammen mit den Proteinverunreinigungen.

Mit dem Scheitern der Aktivitätsüberprüfungen konnte festgestellt werden, daß die Faltung im Verdünnungsansatz für die Proteine FnColA, FnGel72 und FnKat72 keine Methode zur Naturierung darstellt.

### **7.9.2. Faltung durch Dialyse**

Die Faltung durch Dialyse beruht darauf, daß der Protein-Lösung stufenweise das denaturierende Reagenz Harnstoff entzogen wird (6.13.1.). Jeweils 10 ml von den ib-Aufschlüssen der Proteine FnColA, FnGel72 und FnKat72 wurden dazu in Dialyseschläuche gefüllt und dann gegen einer Puffer dialysiert, dessen Harnstoffkonzentration schrittweise bis auf null gesenkt wurde.

Zur Überprüfung der Aktivität wurden wiederum zwei Aktivitätstests durchgeführt. Wie schon bei der Faltung im Verdünnungsansatz (7.9.2.) konnte jedoch weder im Gelatin-

---

Substratgel (6.13.4) noch an der Gelatin-Sepharose (6.12.4.) die Aktivierung der Proteine nachgewiesen werden.

Auch die Faltung durch Dialyse war also nicht die Methode der Wahl zu Naturierung der Proteine FnColA, FnGel72 und FnKat72.

### 7.9.3. Faltung von FnColA an Ni-NTA-Agarose

Für die Typ IV-Kollagenase FnColA ergibt sich durch ihre *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz eine weitere Methode zur Naturierung : die Faltung an Ni-NTA-Agarose (6.13.3.). Hierbei wurden zunächst 5 ml des ib-Aufschlusses über die *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz an die Ni-NTA-Agarose gebunden und die normalen Waschschrte mit Puffer B und Puffer C durchgeführt (6.12.3.). Anschließend werden dem Puffer schrittweise alle denaturierenden Reagenzien, wie Harnstoff,  $\beta$ -Mercaptoethanol und Glycerin entzogen, um eine langsame Faltung des Proteins zu erreichen.

Die abschließende Elution des *His-Taq*<sup>®</sup>-Proteins erfolgte zum einen durch einen pH-Shift (pH 4,5), zum anderen durch Imidazol. In beiden Fällen konnte das Protein jedoch nicht mehr eluiert werden. Vermutungen, das Protein sei in einer der Waschfraktionen vorzeitig eluiert, bestätigten sich nach Überprüfung der Fraktionen durch SDS-Gelelektrophorese jedoch nicht. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß das Protein auf der Säule ausgefallen ist. Versuche zur Optimierung stehen deshalb noch aus.

## 8. Diskussion

Für die Typ IV-Kollagenasen, die eine entscheidene Rolle für die Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen spielen<sup>[34], [35], [48]</sup>, ist es wichtig Expressionssysteme zu etablieren, welche eine Produktion der Proteine in großer Ausbeute ermöglichen.

Auf diese Weise ist eine nähere Untersuchung dieser Enzyme möglich. Für ihre Detektion ist die Entwicklung von Antikörpern notwendig, dazu müssen größere Mengen der Antigene bereitgestellt werden. Dies gilt insbesondere in Hinblick auf die Entwicklung von ELISA-Verfahren zur Konzentrationsbestimmung in der klinischen Diagnostik. Aber auch für die Strukturaufklärung sind größere aufgereinigte Mengen der entsprechenden Proteine notwendig.

Das Hauptziel der vorliegende Arbeit bestand daher in der Klonierung, Expression und Aufreinigung verschiedener Typ IV-Kollagenasen, um Verfahren zu etablieren, größere Mengen dieser rekombinanten Proteinvarianten zu erhalten.

### **8.1. Klonierung und Expression**

Zur Darstellung der rekombinanten Domänen FnColA, FnColB, FnGel72 und FnKat72 war es zunächst notwendig die entsprechenden cDNA-Fragmente mit Hilfe der PCR zu amplifizieren. Hierbei konnte ein PCR-Programm optimiert werden, das zur Anreicherung der vier cDNA-Fragmente geeignet war.

Die hohe Ausbeute an PCR-Produkten erleichterte die TA-Klonierung der einzelnen Fragmente in den pCR<sup>TM</sup>II-Vektor, so daß dieser Schritt der Klonierung keine Probleme bereitete. Mit Hilfe dieses Systems konnte eine DNA-Sequenzierung durchgeführt werden, welche eine vollständige Übereinstimmung der Basensequenzen mit den entsprechenden Vergleichssequenzen des Fibronektins und der Gelatinase A ergab.

Für die Klonierung der cDNA-Fragmente in die Expressionsvektoren konnte ebenfalls auf gängige Methoden zurückgegriffen werden, so daß auch diese Klonierungen problemlos durchgeführt werden konnten.

---

Die Transformation der *E. coli*-Expressionsstämme [HMS174(DE3)] und [BL21(DE3)] erwies sich zunächst als schwierig. Nach Anreicherung der Plasmide im „*high-copy*“-Stamm [JM83] konnten jedoch die potentiellen Expressionssysteme erhalten werden.

Für die Proteine FnColA, FnGel72 und FnKat72 konnten Expressionssysteme etabliert werden, welche eine große Überexpression der entsprechenden Proteine aufweisen. Alle drei Proteine wurden in großen Ausbeuten erhalten. Für die Typ IV-Kollagenase FnColB wurde dagegen kein System etabliert. Obwohl die DNA-Sequenzierung die korrekte Klonierung mit Start- und Stopcodons bewies, konnte keine signifikante Expression nachgewiesen werden. Ein Grund dafür könnte sein, daß nur wenige Zellen der Expressionskultur das gewünschte Protein produzieren. Es müßte daher ein Einzelkolonieausstrich der Kultur angefertigt werden und die wachsenden Kolonien wiederum in Testexpressionen auf ihre Produktivität untersucht werden. Ein weiterer Grund für die Nichtexpression könnte in den Expressionsbedingungen liegen, die variiert werden könnten. Nicht zuletzt könnte eine erneute Transformation mit dem korrekten Plasmid zur erfolgreichen Expression führen.

Die etablierten Expressionssysteme implizieren jedoch auch Nachteile. Durch den Aufschluß der *inclusion bodies*, der unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden muß, liegen die isolierten Proteine nicht mehr in korrekt gefalteter, nativer Form vor. Es ist daher eine Faltung der rekombinanten Proteine erforderlich, die in einigen Fällen sehr schwierig sein kann.

Eine Alternative zur Expression in *ibs* wäre die Verwendung von *E. coli*-Expressionssystemen, die mit einem sogenannten „*leader*“ ausgestattet sind. Dieser „*leader*“ bewirkt die Ausschleusung der exprimierten Proteine ins Periplasma, wobei sie ihre native Konformation beibehalten. Da die Ausbeuten bei diesem Verfahren allerdings sehr gering sind, werden Methoden zur Gewinnung von „*inclusion bodies*“ zumeist bevorzugt.

Eine weitere Möglichkeit die Denaturierung der Expressionsprodukte zu vermeiden, ist der Einsatz von Hefe-Expressionssystemen. Die Proteine werden dann von vornherein in nativer Form ins Medium exprimiert, so daß langwierige Naturierungsversuche entfallen.

## **8.2. Aufreinigung**

Bei der Typ IV-Kollagenase FnColA bestand aufgrund der angefügten *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz die Möglichkeit einer Aufreinigung an Ni-NTA-Agarose. Diese Methode sollte eigentlich eine vollständige Abtrennung der kontaminierenden *E. coli*-Proteine ermöglichen. In diesem Fall konnte jedoch nur teilweise eine Reinigung des Proteins erzielt werden. Hier sind also noch Optimierungsversuche erforderlich. Es besteht z.B. die Möglichkeit das Probenvolumen zu verringern oder durch andere Pufferwahl den Reinigungseffekt zu vergrößern.

Trotzdem bietet die Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule die Möglichkeit große Proteinmengen vorzureinigen. Bei der nachfolgenden Gelfiltration an einer Sephacryl S-100-Säule konnte das FnColA-Protein bis auf Spuren von niedermolekularen Verunreinigungen homogen isoliert werden, so daß es für Naturierungsversuche zur Verfügung stand.

Bei der fibronectinähnlichen Domäne mit Metallbindungszentrum der Gelatinase A, FnKat72, erfolgte ebenfalls zunächst eine Vorreinigung. Eine Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose führte zur Abtrennung eines Großteils der kontaminierenden *E. coli*-Proteine. Auch hier wurde die Bindungsspezifität zur Reinigung großer Proteinmengen ausgenutzt. Durch eine anschließende Gelfiltration an einer Sephacryl S-100-Säule konnte das Protein absolut homogen erhalten werden.

Eine weitere Methode zur Isolierung der Proteine FnColA und FnKat72 und der fibronectinähnlichen Domäne der Gelatinase A FnGel72 bestand in der Affinitätschromatographie mit Gelatin-Sepharose. Dazu mußten die Proteine zunächst renaturiert werden. Keines der drei Proteine zeigte jedoch ein spezifisches Bindungsverhalten, so daß keine Isolierung renaturierter Proben erzielt wurde. Der Grund dafür waren wahrscheinlich ergebnislose Naturierungsversuche (8.3.). Eine weitere Aufreinigung des FnGel72-Proteins war somit im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

## **8.3. Faltungsexperimente**

Auch bei den Faltungsexperimenten kann auf die *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz der Typ IV-Kollagenase FnColA zurückgegriffen werden. Die Bindungsaffinität zu Ni-NTA-Agarose ermöglicht in einigen Fällen die Faltung der Proteine auf der Ni-NTA-Säule. Im Falle des FnColA wurde das Protein über die *His-Taq*<sup>®</sup>-Sequenz an das Säulenmaterial gebunden und durch schrittweise Entfernung von denaturierenden Reagenzien eine Naturierung versucht.



---

Ein Problem ergab sich bei der Elution. Das Protein konnte weder durch Erniedrigung des pH-Wertes noch durch Zugabe von Imidazol von der Säule eluiert werden.

Eine erste Vermutung, das Protein habe gar nicht gebunden, konnte durch Analyse der Durchlauf- und Waschfraktionen widerlegt werden. Es muß also durch die Veränderung des Puffers so fest an das Säulenmaterial binden, daß eine Elution unter nativen Bedingungen nicht mehr erfolgen kann. Eine weitere Möglichkeit ist, daß das Protein Aggregate bildet und auf der Säule ausfällt.

Es wurden weitere Naturierungsexperimente mit den Proteinen FnColA, FnGel72 und FnKat72 durchgeführt. Zum einen wurden Proben der ib-Aufschlüsse stufenweise gegen einen nativen Puffer dialysiert. Zum anderen wurden die aufgereinigten Proben zur Verdünnung in ein großes Volumen eines nativen Faltungspuffers gegeben, um dort durch Diffusion und in Gegenwart des *oxido-shuffling-Systems* zu renaturieren.

In beiden Fällen wurde versucht die Aktivität mit Hilfe eines Gelatin-Substratgels nachzuweisen. Es wurden jedoch keine entsprechenden Lyse-Banden erhalten.

Ein anderer Aktivitätstest war die in 8.2. beschriebene Affinitätschromatographie mit Gelatin-Sepharose. Doch auch in diesem Fall wurde keine spezifische Bindungsaffinität beobachtet.

Da mit Hilfe dieser Methoden keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, muß nach alternativen Vorgehensweisen gesucht werden. Die kann z.B. durch die Faltung mit Chaperonen, einer Enzymklasse, die die Faltung unterstützen, erfolgen. Eine andere Alternative ist die Verwendung anderer Expressionssysteme, die eine Isolierung des nativen Proteins zulassen (8.1.).

#### **8.4. Ausblick**

In experimentellen Tumorsystemen konnte eine Korrelation zwischen der Fähigkeit von Zellen einerseits MMPs zu sezernieren und andererseits zu metastasieren beobachtet werden.<sup>[48],[49]</sup> Dabei spielen vor allem die Typ IV-Kollagenasen eine bedeutende Rolle, da die Basalmembranen zu einem großen Teil aus Typ IV-Kollagen bestehen.

Um nähere Erkenntnisse über diese Kollagenasen zu erhalten, ist es wichtig, Expressionssysteme zu etablieren, die eine Produktion großer Proteinmengen ermöglichen. Außerdem muß es gelingen, die Enzyme in ihre native Konformation zurückzufalten.

Vor allem die Gelatinasen A und B und die Kollagenase 3, also die Typ IV-Kollagenasen, gelten wegen ihrer Überexpression in Tumorzellen schon jetzt als prognostische Faktoren in klinischen Proben bestimmter menschlicher Tumore.<sup>[44-47]</sup> Durch die rekombinant dargestellten Proteine können Methoden zur Diagnostik oder Konzentrationsbestimmung weiter verbessert und somit eventuell ein Fortschritt in der Krebsforschung erzielt werden. Nicht zuletzt sollte die Beteiligung der Fn Typ IV-Kollagenasen am Krebsgeschehen näher untersucht werden. Aufgrund ihrer hohen Aktivität gegenüber Typ IV-Kollagen könnten sie eine große Rolle spielen. Ihre physiologische Relevanz ist bisher jedoch noch nicht aufgeklärt.

Desweiteren können die rekombinanten Domänen des Fibronektins und der Gelatinase A zur Strukturaufklärung beitragen. Von den Kollagenasen und den Stromelysinen existieren bereits Röntgenstrukturen. Von den Gelatinasen konnten bisher noch keine Kristalle zur Strukturaufklärung erhalten werden, obwohl diese von großem Interesse sind. Vor allem die fibronektinähnlichen Domänen dieser Enzyme sind bisher nicht modellierbar, da die Gelatinasen als einzige über diese Domänen verfügen. Die Fn TypIV-Kollagenasen, welche eine Art Minimal-Enzym darstellen, könnten eine Strukturaufklärung erleichtern.

Gleiches gilt auch für das Fibronektin. Auch hier sind die Strukturen der Gelatin-Bindungsdomäne noch weitgehend unbekannt. Große Mengen an renaturierten Proteinen könnten die Kristallisation ermöglichen und somit zur Strukturaufklärung beitragen.

---

## 9. Literatur

- [1] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. : Molecular biology of the cell (1989), Garland Publishing Inc., New York & London, 802-824.
- [2] Hynes, R.O. : Fibronectins (1990), New York, Springer Verlag.
- [3] Vuorio, E., de Crombrughe, B., The family of collagen genes (1990), *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 837-872.
- [4] Bornstein P., Devarayalu, S., Li, P., Disteché, C.M., Framson, P., A second thrombospondin gene in the mouse is similar in organization to thrombospondin 1 but does not respond to serum (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **88**, 8636-8640.
- [5] Shi, Y.E., Torri, J., Yieh, L., Wellenstein, A., Lippman, M., Dickson, R.B., Identification and characterisation of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells (1993), *Cancer Res.* **53**, 1409-1415.
- [6] Docherty, A.J.P., O'Connell, J., Crabbe, T., Angal, S., Murphy, G., The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors : prospects for treating degenerative tissue diseases (1992), *TIBTECH* **10**, 200-207.
- [7] Woessner, J.F., Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling (1991), *FASEB J.* **5**, 2145-2154.
- [8] Mosher, D.F. : Fibronectin (1989), Academic Press, New York.
- [9] Kornblihtt, A.R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K., Baralle, F.E., Primary structure of human fibronectin : differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene (1985), *EMBO J.* **4**, 1755-1759.
- [10] Hynes, R.O., Fibronectin (1986), *Spektrum der Wissenschaft* **8**, 80-90.
- [11] Mosher, D.F., Fibronectins (1989), Academic Press, San Diego, California.
- [12] Reddi, A.H., Extracellular Matrix : Structure and Function (1985), Alan R. Liss Inc., New York.

- 
- [13] Hynes, R.O., Cells surface proteins and malignant transformation (1976), *Biochim. Biophys. Acta* **458**, 73-80.
- [14] Vaheri, A., Mosher, D.F., High molecular weight, cell surface-associated glycoprotein (Fibronectin) lost in malignant transformation (1978), *Biochim. Biophys. Acta* **516**, 1-25.
- [15] Grinnell, F., Fibronectin and woundhealing (1984), *J. Cell. Biochem.* **26**, 107-116.
- [16] Leibovic, S.J., Ross, R., Role of macrophages in wound repair - study with hydrocortisone and antimacrophage serum (1975), *Am. J. Pathol.* **78**, 71-100.
- [17] Proctor, R.A., Prendergast, E., Mosher D.F., Fibronectin mediates attachment of staphylococcus to human neutrophils (1982), *Blood* **59**, 681-687.
- [18] Norris, D.A., Clark, R.A.F., Swigart, L.M., Huff, J.C., Weston, W.L., Howell, S.E., Fibronectin fragments are chemotactic for human peripheral blood monocytes (1982), *J. Immunol.* **129**, 1612-1613.
- [19] Sanchez-Lopez, R., Nicholson, R., Gesner, M.-C., Matrisian, L.M., Breathnach, R., Structure-function relationships in the collagenasefamily member transin (1988), *J. Biol. Chem.* **263**, 11892-11899.
- [20] van Wart; H.E., Birkendal-Hansen, H., The cystein switch : a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5578-5582.
- [21] Park, A.J., Matrisian, L.M., Kells, A.F., Pearson, R., Yuan, Z.O., Navre, M., Mutational analysis of the transin (rat stromelysine) autoinhibitor region demonstrates a role for residues surrounding the „cystein switch“ (1991), *J. Biol. Chem.* **266**, 1584-90.
- [22] Cawston, T.E., Metalloproteinase Inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown (1996), *Pharmacol. Ther.* **70**, No.3, 163-182.
- [23] Corcoran, M.L., Hewitt, R.E., Kleiner, D.E., Stetler-Stevenson, W.G., MMP-2 : Expression, Activation and Inhibition (1996), *Enzym Protein* **49**, 7-19.

- 
- [24] Springmann, E.B., Angleton, E.J., Birkendal-Hansen, H., van Wart, H.E., Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase : Evidence for the role of aCys<sup>73</sup> active-site zinc complex in latency and a „cysteine switch“ mechanism for activation (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 364-368.
- [25] Collier, I.E., Wilhelm, S.M., Eisen, A.Z., Marmer, B.L., Grand, G.A., Seltzer, J.L., Kronberger, A., Hauer, E.H., Goldberg, G.I., H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloproteinase capable of degrading basement membrane collagen (1988), *J. Biol. Chem.* **263**, 6579-6587.
- [26] Goldberg, G.I., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z., Wilhelm, S.M., He, C., Human 72-kDa type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metallo-proteases designated TIMP-2 (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8207-8211.
- [27] Faber, H.R., Groom, C.R., Baker, H.M., Morgan, W.T., Smith, A., Baker, E.N., 1,8  $\alpha$  crystal structure of the C-terminal domain of rabbit serum haemopexin (1995), *Struktur* **3**, 551-559.
- [28] Knäuper, V., Will, H., Lopez-Otin, C., Smith, B., Atkinson, S.J., Stanton, H., Hembry, R.M., Murphy, G., Cellular mechanism for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase A (MMP-2) are able to generate active enzyme (1996), *J. Biol. Chem.* **271**, 17124-17131.
- [29] Jenne, D., Homology of placental protein 11 and pea seed albumin 2 with vitronectin (1991), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 1000-1006.
- [30] Murphy, G., Docherty, A.J., Matrix metalloproteinases and their inhibitors (1992), *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **7**, 120-125.
- [31] Sato, H., Takino, T., Okada, Y., Cao, J., Shinagawa, A., Yamamoto, E., Seiki, M., A Matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells (1994), *Nature* **370**, 61-65.
- [32] Weinberg, R.A., Wie Krebs entsteht (1996), *Spektrum der Wissenschaft Spezial : Krebsmedizin* **5**, 7-17.

- 
- [33] Crawford, H.C., Matrisian, L.M., Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression (1994), *Invasion Metastasis* **14**, 234-245.
- [34] MacDougall, J.R., Matrisian, L.M., Contributions of tumor and stromal matrix metallo-proteinases to tumor progression, invasion and metastasis (1995), *Cancer and Metastasis Reviews* **14**, 351-362.
- [35] Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., Kleiner, D.E., Extracellular matrix 6: Role of the matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis (1993), *FASEB J.* **7**, 1434-1441.
- [36] Rich, A., Crick, F.H.C., The molecular structure of collagens (1961), *J. Mol. Biol.* **3**, 483-506.
- [37] Ninomiya, Y., Showalter, A.M., Olsen, B.R., In the role of extracellular matrix development, Alan R. Liss Inc, 255-275.
- [38] Jacenko, O., Olsen, B.R., LuValle, P., Organization and regulation of collagen genes (1991), *Crit. Rev. Eukar. Gene Expression*, CRC Press, 327-353.
- [39] Glanville, R.W., In : Structure and function of collagen types (1987), Academic Press Inc., 43-79.
- [40] Timpl, R., Structure and biological activity of basement-membran proteins (1989), *Eur. J. Biochem.* **180**, 487-502.
- [41] Butkowski, R.J., Langeveld, J.P.M., Wieslander, J., Hamilton, J., Hudson, B.G., Localization of the goodpasture epitope to a novel chain of basement-membrane collagen (1987), *J. Biol. Chem.* **262**, 7874-7877.
- [42] Brown, P.D., Levy, A.T., Marguleis, J.M., Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, W.G., Independent expression and cellular processing of Mr. 72000 type IV collagenase in human tumorigenic cell lines (1990), *Cancer Res.* **50**, 6184-6191.
- [43] Vidmar, S.L., Lottspeich, F., Emod, I., Imhoff, J.-M., Keil-Dlouha, V., Collagen-binding domain of human plasma fibronectin contains a latent type IV-collagenase (1991), *Eur. J. Biochem.* **201**, 79-84.

- 
- [44] Wolf, C., Chenard, M., Durand de Grossouvre, P., Bellocq, J., Chambon, P., Basset, B., Breast cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing (1992), *J. Invest. Dermatol* **99**, 870-872.
- [45] Polette, M., Clavel, C., Cockett, M., Girod de Bentzmann, S., Murphy, G., Birembaut, P., Detection and localisation of mRNA encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology (1993), *Invasion metastasis* **13**, 31-37.
- [46] Stearns, M.E., Wang, M., Type IV collagenase (Mr 72000) expression in human prostate : benign and malignant tissue (1993), *Cancer Res.* **53**, 878-883.
- [47] Liotta, L.A., Tumor invasion and metastasis-role of the extracellular matrix (1986), *Cancer Res.* **46**, 1-7.
- [48] Bernhard, E.J., Muschel, R.J., Hughes, E.N., Mr 92000 Gelatinase releases correlates with the metastatic phenotyp in transformed rat embryo cells (1990), *Cancer Res.* **50**, 3872-3877.
- [49] Sreenath, t., Matrisian, L.M., Stetler-Stevenson, W., Gattoni-Celli, S., Pozzatti, R.O., Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential (1990), *Cancer Res.* **52**, 4942-4947.
- [50] Alvarez, O.A., Carmichael, D.F., DeClerck, Y.A., Inhibition of collagenolytic activity and metastasis of tumor cells by a recombinant TIMP (1990), *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 589-595.
- [51] Albini, A., Melchiori, A., Santi, L., Liotta, L.A., Brown, P.D., Stetler-Stevenson, W.G., Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2 (1991), *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 775-779.
- [52] Schultz, R.M., The role of metalloproteinases in tumor cell metastasis (1991), *Cancer Treat Res.* **54**, 119-133.
- [53] DeClerck, Y.A., Yean, T.D., Chen, D., Shimada, H., Langley, K.E., Inhibition of tumor invasion of smooth muscle cell layers by recombinant human metalloproteinase inhibitor (1991), *Cancer Res.* **51**, 2151-2157.

- 
- [54] DeClerck, Y.A., Perez, N., Shimada, H., Boone, T.C., Landley, K.E., Taylor, S.M., Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases (1992), *Cancer Res.* **52**, 701-707.
- [55] Baralle, F.E., I.C.G.E.B., Padriciano 99, 34012 Trieste, Italy.
- [56] American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852.
- [57] Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., *Molecular Cloning* (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [58] Bertram, S., Gassen, H.G., *Gentechnologische Methoden* (1991), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- [59] QIAgen Manual, Qiaprep<sup>TM</sup>-Spin Plasmid Handbook (1993), QIAgen GmbH, Hilden.
- [60] Saiki, K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a Thermostable DNA-polymerase (1988), *Science* **239**, 487-491.
- [61] Invitrogen, TA-Cloning Handbook, 1993.
- [62] Gray, G.C., Baldrige, J.S., McKeown, K.S., Heyneker, H.C., Chang, C.N., Periplasmatic production of correctly processed human growth hormone in E. coli : Natural and bacterial signal sequences are interchangeable (1985), *Gene* **39**, 247-254.
- [63] Promega, Technical Bulletin (1985), Madison USA.
- [64] Tang, X., Nakata, Y., Li, H.O., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Otha, T., Yokoyama, K., The optimization of preparation of competent cells for transformation of E. coli (1994), *Nucleic Acids Research* **22**, 2857-2858.
- [65] Weber, K., Osborne, M., The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamid gelelectrophoresis (1969), *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
- [66] Stephano, J., Gould, M., Rojas-Galicia, L., Advantages of picrate fixation for staining polypeptides in polyacrylamid gels (1986), *Anal. Biochem.* **152**, 308-313.



- 
- [67] Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (1970), *Nature* **227**, 680-685.
- [68] Heukeshoven, J.R., Dernick, D.R., Simplified method for silverstaining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silverstaining (1985), *Electrophoresis* **6**, 103-112.
- [69] Xu, Q., Shively, J., Microsequence analysis of peptides and proteins (1988), *Anal. Biochem.* **170**, 19-30.
- [70] Reinke, H., Fischer, S., Reimann, F., Tschesche, H., *Methods in Protein Sequence Analysis* (1991), (Jörnvall, Höög, Gustavsson), Birkenhäuser Verlag, Basel, 55-66.
- [71] Rehm, H., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P., *Biotechnology* (1993), Verlag Chemie.