Rekombinante Expression, Reinigung und Charakterisierung der neuralen Zellerkennungsmoleküle P0 und L1

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von

Isabel Köhlitz

geboren am 27.05.1979

in Hamburg

Greifswald, 8.Dezember 2008

Dekan: Prof. Dr. Klaus Fesser

1. Gutachter : Prof. Dr. Reinhard Walther

2. Gutachter: Prof. Dr. Georg Reiser

Tag der Promotion: 8. April 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Bildung und Struktur des Myelins im PNS 1
1.2 Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie 4
1.3 Myelin Protein Zero (P0) 5
1.3.1 Molekulare Struktur und Expressionsmuster von P0 5
1.3.2 Funktionen von P0 7
1.3.3 Mutationen im P0-Gen führen zur Charcot-Marie-Tooth´schen Erkrankung 8
1.4 Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 10
1.4.1 Molekulare Struktur und Genetik von L1 11
1.4.2 Expressionsmuster und Funktionen des L1 13
1.4.3 Mutationen im L1 führen zu neurologischen Syndromen des L1-Spektrums 14
1.4.4 Heterologe Expression und Kristallisation von L1 15
1.5 Eukaryotische Expressionssysteme 16
1.5.1 CHO-Zellen als Expressionssystem 18
1.5.2 *Pichia pastoris* als Expressionssystem 20
2. Zielsetzung der Arbeit 22
3. Materialien und Methoden 23
3.1 Materialien 23
3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 23
3.1.2 Enzyme und Reaktionskits 23
3.1.3 Verwendete Proteaseinhibitoren 24
3.1.4 Verwendete Antikörper 25
3.1.4.1 Primäre Antiköper 25
3.1.4.2 Sekundäre Antikörper 26
3.1.5 Verwendete Zelllinien und Hefestämme 26
3.1.6 Verwendete *E. coli*-Stämme 27
3.1.7 Verwendete Plasmide 27
3.1.8 Verwendete Antibiotika 27
3.1.9 Verwendete Oligonukleotide 28
3.1.10 Häufig verwendete Lösungen und Puffer 29
3.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden 31
3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in großem Maßstab 31

3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab 32
3.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA 32
3.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration 32
3.2.5 Restriktionsanalyse 33
3.2.6 Ligation 33
3.2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA 34
3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion 34
3.2.9 Anhängen von 3´-Poly-A-Überhängen 35
3.2.10 Gerichtete Mutagenese 35
3.2.11 DNA-Sequenzanalyse 36
3.2.12 Vermehrung von *E. coli*-Zellen 36
3.2.13 Transformation von *E. coli*-Zellen 37
3.2.14 Kultivierung von *Pichia pastoris* 37
3.2.15 Transformation von *Pichia pastoris* durch Elektroporation 38
3.2.16 Kultivierung transformierter *Pichia pastoris*-Klone für die rekombinante Proteinexpression 38
3.3 Zellbiologische Methoden 39
3.3.1 Kultivierung von CHO-Zellen 39
3.3.2 Langzeitlagerung der Zelllinien 40
3.3.3 Transfektion von CHO-Zellen 41
3.3.4 Lyse von CHO-Zellen 42
3.3.5 Oberflächenbiotinylierung transient transfizierter CHO-Zellen 43
3.3.6 Zell-Aggregations-Assay mit transient transfizierten CHO-Zellen 43
3.3.7 Produktion von mL1-Fc und mL1-TEV-Fc 44
3.3.8 Primärzellkultur 45
3.3.8.1 Beschichtung von 96-Well-Platten mit poly-L-Lysin 45
3.3.8.2 Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen 45
3.4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden 47
3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 47
3.4.2 Coomassie-Färbung 48
3.4.3 Immunoblot (*Western Blot*) 49
3.4.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen 49
3.4.5 Immunologischer Nachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz 50

3.4.6 Dialyse 50
3.4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration 51
3.4.8 Deglykosylierung mit N-Glycosidase F 51
3.5 Aufreinigung von Proteinen 52
3.5.1 Reinigung von Fc-Fusionsproteinen mit der Protein A-Affinitätschromatographie 52
3.5.2 Reinigung His-*getaggter* Proteine mit Hilfe der Ni-NTA-Technologie 53
3.5.3 Spaltung von Fc-Fusionsproteinen mit der *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease 54
3.6 Kristallisation von Proteinen 56
3.6.1 Dynamische Laserlichtstreuung 56
3.6.2 Kristallisation nach der Dampfdiffusionsmethode 56
4. Ergebnisse 58
4.1 Klonierung und Expression der extrazellulären Domäne des *myelin protein zero* (P0) in *Pichia pastoris* 58
4.1.1 Klonierung der cDNA für die extrazelluläre Domäne des murinen P0-Proteins 58
4.1.2 Transformation und Expression der extrazellulären Domäne des murinen P0-Proteins in *Pichia pastoris* 61
4.1.3 Bestimmung des Phänotyps verschiedener transformierter *Pichia pastoris*-Klone 64
4.2 Aufreinigung der extrazellulären Domäne des murinen P0-Proteins aus *Pichia pastoris* 65
4.3. Charakterisierung der in *Pichia pastoris* exprimierten extrazellulären Domäne des P0-Proteins 66
4.3.1 Deglykosylierung mit N-Glycosidase F 66
4.3.2 Analyse der in *Pichia pastoris* exprimierten extrazellulären Domäne des P0-Proteins mit 1D NMR-Spektroskopie 67
4.3.3 Charakterisierung der aufgereinigten extrazellulären Domäne des P0-Proteins mittels Dynamischer Laserlichtstreuung 68
4.4 Kristallisation der extrazellulären Domäne des P0-Proteins 69
4.5 Expression der extrazellulären Domäne der Ile106Leu-Mutante des P0-Proteins in *Pichia pastoris* 71

4.5.1 In-vitro-Mutagenese und Klonierung der cDNA für die extrazelluläre Domäne des murinen P0-Ile106Leu-Proteins 71
4.5.2 Transformation und Expression der extrazellulären Domäne des murinen P0-Ile106Leu-Proteins in *Pichia pastoris* 72
4.6 Aufreinigung der in *Pichia pastoris* exprimierten extrazellulären Domäne des murinen P0-Ile106Leu-Proteins 72
4.7 Kristallisation der extrazellulären Domäne des murinen P0-Ile106Leu-Proteins 74
4.8 Rekombinante Expression von P0 voller Länge in *Chinese hamster ovary* (CHO)-Zellen 75
4.8.1 Klonierung und In-vitro-Mutagenese des murinen P0-Proteins voller Länge 75
4.8.2 Transfektion und Expression des wildtypischen P0-Proteins und der Ile106Leu-Mutante von P0 in CHO-Zellen 77
4.8.3 Untersuchung der Oberfächenexpression des wildtypischen P0-Proteins und der Ile106Leu-Mutante von P0 in CHO-Zellen 77
4.9 Untersuchung des Einflusses der P0-Ile106Leu-Mutation auf die homophile Interaktion des P0-Proteins 80
4.10 Expression der extrazellulären Domäne von murinem L1 (mL1) in CHO-Zellen 83
4.10.1 Klonierung der cDNA für die extrazelluläre Domäne des mL1 83
4.10.2 Transiente Transfektion und Expression des mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins in CHO-Zellen 86
4.10.3 Stabile Transfektion und Expression des mL1-TEV-Fc in CHO-Zellen 87
4.10.4 Produktion und Reinigung des mL1-TEV-Fc aus CHO-Zellkulturüberstand 89
4.11 Untersuchung der biologische Aktivität des mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins 89
4.12 Etablierung der Spaltung des mL1-TEV-Fc mit der TEV-Protease 91
5. Diskussion 98
5.1. Rekombinante Expression, Reinigung und Charakterisierung des neuralen Zellerkennungsmoleküls P0 98

5.1.1 Expression der extrazellulären Domäne des wildtypischen murinen P0 in *Pichia pastoris* 98
5.1.2 Charakterisierung der in *Pichia pastoris* exprimierten extrazellulären Domäne des P0-Proteins 101
5.1.3 Kristallisation der extrazellulären Domäne des P0-Proteins 102
5.1.4 Expression und Kristallisation der extrazellulären Domäne des P0-Ile106Leu-Proteins in *Pichia pastoris* 105
5.1.5 Untersuchung des Einflusses der Ile106Leu-Mutation auf die Zelloberflächenexpression und die homophile Adhäsion des P0-Proteins 107
5.2. Rekombinante Expression, Reinigung und Charakterisierung des neuralen Zellerkennungsmoleküls L1 109
5.2.1 Expression der extrazellulären Domäne des murinen L1-Proteins (mL1) in CHO-Zellen 110
6. Zusammenfassung 114
7. Summary 116
8. Literaturverzeichnis 118
10 Anhang 142
10.1 Abkürzungsverzeichnis 142
10.2 Abbildungsverzeichnis 144
10.3 Tabellenverzeichnis 147
Lebenslauf 149
Danksagung 151

1. Einleitung

Das Nervensystem des Menschen besteht aus Milliarden von Nervenzellen. Jede dieser Nervenzellen steht mit tausenden anderen Nervenzellen in Verbindung und tauscht Informationen aus. Manche dieser Verbindungen werden über Distanzen von bis zu einem Meter geknüpft (Brodman, 1908; Amaral, 2000). Viele Axone im Nervensystem der Vertebraten sind mit einer Isolierschicht umgeben, um eine schnelle Reizweiterleitung auch über diese großen Distanzen zu ermöglichen. Diese Isolierschicht nennt man Myelinscheide. Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird das Myelin von Oligodendrozyten gebildet, im peripheren Nervensystem (PNS) von Schwann-Zellen. Schwann-Zellen und Oligodendrozyten unterscheiden sich sowohl biochemisch als auch im Hinblick auf ihre Entwicklung. Das Myelin ist in konzentrischen Lagen angeordnet und besteht zu 30 % aus Membranproteinen und zu 70 % aus Phospholipiden, Glykolipiden und Cholesterin. Die Schwann-Zellen sind entlang des Axons in einer Linie aufgereiht, die von Intervallen, den Ranvier-Schnürringen, unterbrochen werden. Das Isolieren der Axone mit der Myelinscheide ist essentiell für eine schnelle Reizweiterleitung. Die Reizweiterleitung springt dabei über das Internodium (den myelinisierten Teil des Axons) hinweg von einem Ranvier-Schnürring zum nächsten (saltatorische Erregungsleitung), wodurch die Geschwindigkeit der Reizleitung erheblich schneller ist als bei unmyelinisierten Axonen (eine Übersichtsdarstellung findet sich bei Ritchie, 1984).

1.1 Bildung und Struktur des Myelins im PNS

Die Bildung des Myelins beginnt damit, dass sich die Schwann-Zelle mit ihrer äußeren Zellmembran um das Axon legt (Abb. 1-1A). Sie bildet dabei eine aus einer Doppelmembran bestehenden Struktur, das Mesaxon. Das Mesaxon windet sich spiralförmig in mehreren Schichten um das Axon, wobei das Zytoplasma förmlich aus der Schwann-Zelle herausgepresst wird (Mugnaini et al., 1977). Der Prozess der Myelinisierung endet mit dem Verdichten der spiralförmigen Auswüchse der Schwann-Zelle, die so das kompakte vollständig entwickelte Myelin bildet. In der

elektronenmikroskopischen Vergrößerung des kompakten Myelin-Querschnitts wird die charakteristische Ultrastruktur sichtbar. Das Myelin erscheint als eine mehrlagige elektronendichte Membran. Die sich abwechselnden Schichten werden als *major dense line* und *intraperiod line* bezeichnet und stellen die Adhäsionszonen der intrazellulären bzw. der extrazellulären Schwann-Zellmembran dar (vergleiche Abb. 1-1).

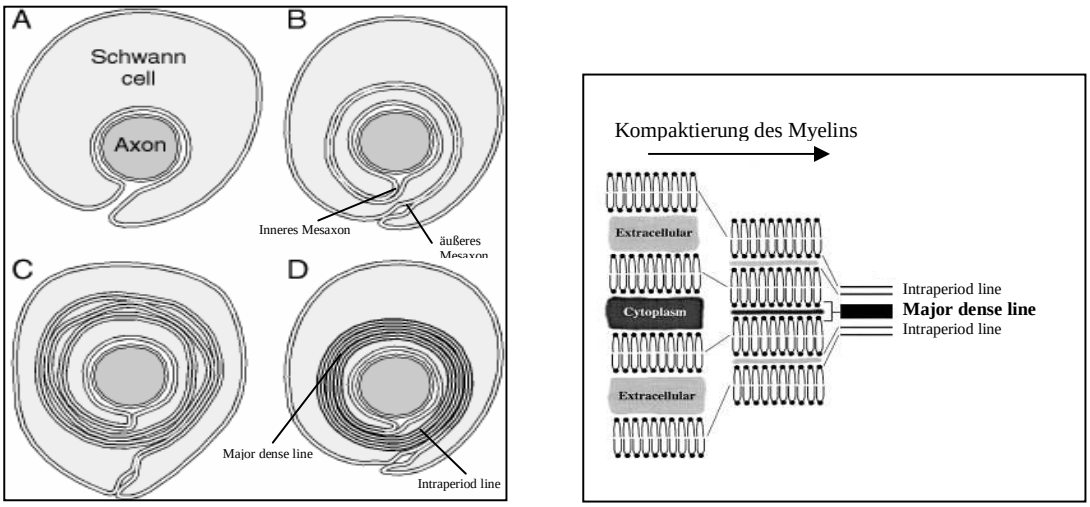


Abbildung 1-1. Bildung des kompakten Myelins im PNS

A: Die äußere Schwann-Zellmembran legt sich um das Axon.

B: Das Mesaxon hat sich gebildet und ist zu einer fünfschichtigen Struktur verschmolzen, die sich einmal um das Axon gewunden hat.

C: Mehrere Schichten Myelin haben sich gebildet. Noch ist das Myelin nicht vollständig verdichtet, wie an dem eingeschlossenen Zytoplasma zu erkennen ist.

D: Das kompakte vollständig entwickelte Myelin hat sich ausgebildet, und die *major dense line* und die *intraperiod line* sind zu erkennen

(modifiziert nach Colman und Filbin, 1999).

Die Ultrastruktur des Myelins lässt erkennen, dass es neben dem kompakten Teil des Myelins noch andere spezialisierte Bereiche innerhalb des Myelins gibt, die sich in ihrer Struktur, ihrer Funktion und ihrer biochemischen Zusammensetzung unterscheiden. Die Schmidt-Lanterman´schen Spalten (Abb. 1-2) gehören, wie die Ranvier-Schnürringe und die paranodale Region, zum nicht-kompakten Myelin. Durch die Schmidt-Lanterman´schen Spalten entstehen kurze Diffusionswege zwischen der inneren und äußeren Plasmamembran, die z. B. eine schnelle Nährstoffdiffusion ermöglichen (Balice-Gordon et al., 1998).

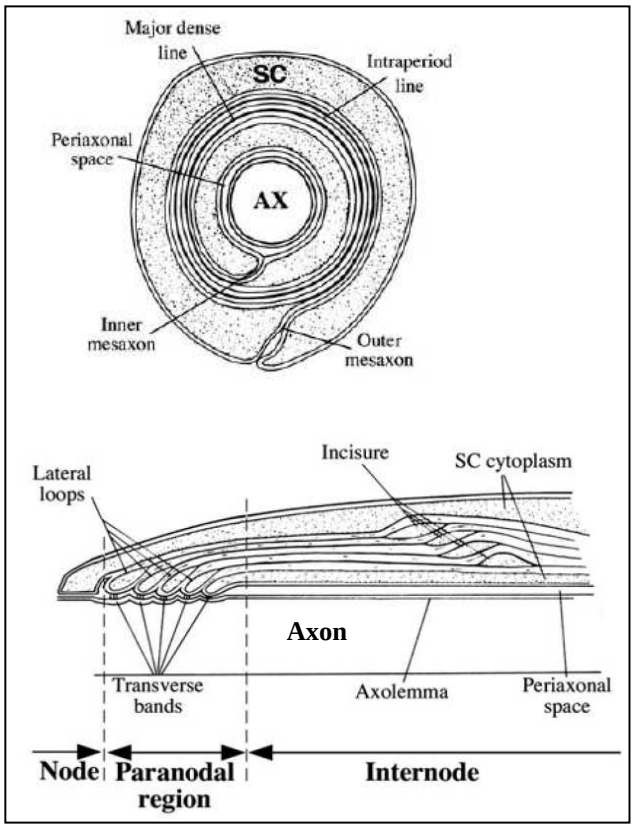


Abbildung 1-2. Längsschnitt durch ein myelinisiertes Axon im PNS

Am Ende jedes Internodiums (*Internode*) befindet sich ein Ranvier-Schnürring (*Node*). In diesem Teil ist das Axon nicht myelinisiert. Zwischen dem Internodium und dem Ranvier-Schnürring befindet sich die paranodale Region (*Paranodal region*). In ihr laufen die zytoplasmatischen Fortsätze der Schwann-Zellmembran aus, die *tight junctions* (*Transverse band*) mit dem Axon ausbilden. Die zytoplasmatischen Fortsätze der Schwann-Zellmembran und die Schmidt-Lanterman´schen Spalten (*Incisure*) enthalten Zytoplasma der Schwann-Zelle; in diesen Bereichen sind die Membranen nicht kompaktiert. SC: Schwann-Zelle; AX: Axon (modifiziert nach Morell und Quarles, 1999)

Zelladhäsionsmoleküle spielen eine große Rolle in der Bildung und Erhaltung des kompakten Myelins. Ihnen werden wichtige Funktionen in der Initiierung der Myelinbildung und der späteren Ausbildung des kompakten Myelins zugeschrieben. Überdies sind sie in die Stabilisierung der nicht-kompakten und der kompakten Regionen des Myelins sowie der Axon-Myelin-Grenzfläche an den Ranvier-Schnürringen involviert (Colman und Filbin, 1999). Dazu gehören unter anderem Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, wie das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM, L1 (Seilheimer et al., 1989; Wood et al., 1990), das *myelin-associated glycoprotein* MAG (Owens und Bunge, 1991; Poltorak et al., 1987; Johnson et al.,

1989; Sadoul et al., 1990) und das *myelin protein zero* P0 (D´Urso et al., 1990; Filbin et al., 1990; Schneider-Schaulies et al., 1990).

1.2 Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie

Schon während der Entwicklung des zentralen und des peripheren Nervensystems nehmen Zelladhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle ein. Zu diesem Zeitpunkt beginnen Prozesse, wie Zellmigration, Axonwachstum und -faszikulierung, Myelinisierung und Synapsenbildung, bei denen Zelladhäsionsmoleküle wichtige Funktionen übernehmen. Später sind sie beispielsweise in synaptische Plastizität und Regeneration involviert. All diese Vorgänge beruhen auf den Interaktionen von Nachbarzellen (Zell-Zell-Interaktionen) oder von Zellen mit der extrazellulären Matrix (Zell-Matrix-Interaktionen) (Williams und Barclay, 1988; Brümmendorf und Rathjen, 1995; Crossin und Krushel, 2000).

Zelladhäsionsmoleküle werden in vier Gruppen eingeteilt: Integrine (Reichardt und Tomaselli, 1991), kalziumabhängige Cadherine (Hynes, 1992; Kemler und Ozawa, 1989; Takeichi, 1991), Moleküle der extrazellulären Matrix (Sanes, 1989; Reichardt und Tomaselli, 1991) und Zelloberflächen-Glykoproteine der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie (Williams und Barclay, 1988; Brümmendorf und Rathjen, 1995). Innerhalb der Ig-Superfamilie (vgl. Abb. 1-3) gibt es folgende drei Untergruppen:
(i) Moleküle, die nur Ig-artige Domänen besitzen.
(ii) Moleküle, die Ig- und Fibronektin Typ III (FN III)-artige Domänen besitzen.
(iii) Moleküle, die eine Mischung aus Ig-artigen und anderen Domänen besitzen.

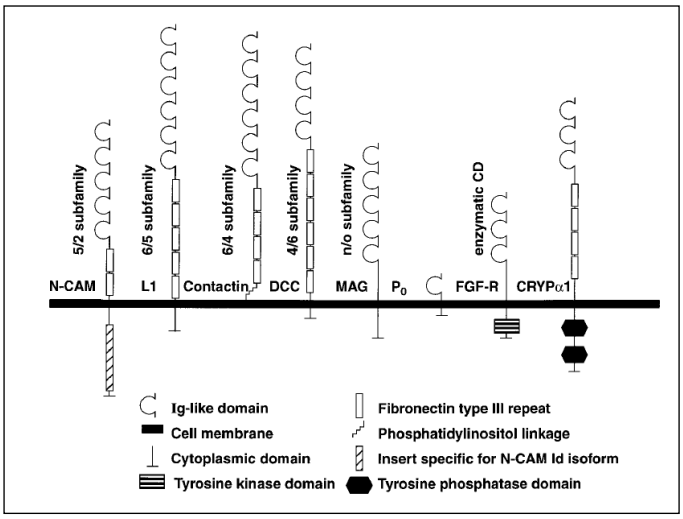


Abbildung 1-3. Schematische Übersicht über die Subfamilien der neuralen Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie.

Die neuralen Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie werden anhand ihrer Anzahl an Ig- und FN III-artigen Domänen in Klassen eingeteilt.

DCC: *deleted in colorectal carcinoma*

FGF-R: *Fibronectin growthfactor-receptor*

(Crossin und Krushel, 2000)

1.3 Myelin Protein Zero (P0)

1.3.1 Molekulare Struktur und Expressionsmuster von P0

P0 ist ein 30 kDa großes Glykoprotein und ist das vorrangige Protein im kompakten Myelin des PNS. Es besteht aus 219 Aminosäuren und lässt sich in drei strukturelle Domänen unterteilen (Abb. 1-4): Eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Domäne (Eichberg, 2002).

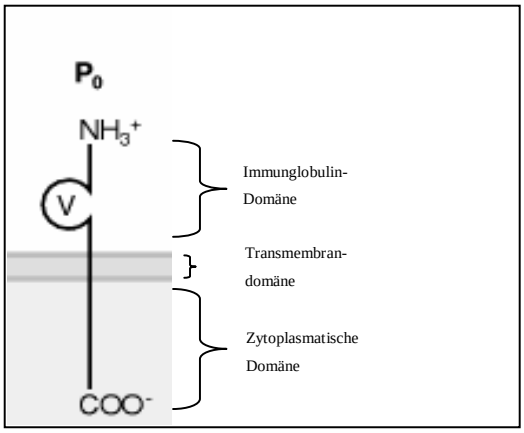


Abbildung 1-4. Schematische Darstellung des P0-Proteins

Das P0 Molekül besteht aus einer (extrazellulären) Ig-Domäne am N-Terminus, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne. V: Ig-Domäne (modifiziert nach Colman und Filbin, 1999)

P0 ist ein Typ 1-Transmembranprotein mit einer einzelnen extrazellulären Ig-Domäne des C2-Typs und gehört zur Ig-Superfamilie (Lemke und Axel, 1985; Lemke et al., 1988; Sakamoto et al., 1987). Innerhalb der extrazellulären Domäne befindet sich eine Stelle für eine Asparagin (N)-ständige Glykosylierung (Ishaque et al., 1980). Untersuchungen mit Hilfe der Massenspektrometrie und Kernresonanzspektroskopie (NMR, *nuclear magnetic resonance*) konnten zeigen, dass die Zuckerzusammensetzung sehr heterogen ist (Sakamoto et al., 1987; Uyemura und Kitamura, 1991; Field et al., 1992; Burger et al., 1992 a, b). P0 trägt unter anderem das HNK-1-Kohlenhydratepitop und das oligomannosidische L3-Kohlenhydrat (Griffith et al., 1992). Das HNK-1-Kohlenhydratepitop spielt eine Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion (Keilhauer et al., 1985; Hall et al., 1997) sowie bei der Migration von Zellen der Neuralleiste (Bronner-Fraser, 1987) und fördert das Neuritenwachstum (Riopelle et al., 1986; Dow et al., 1988). Das L3-Kohlenhydrat vermittelt neurale Zelladhäsion und fördert ebenfalls das Neuritenwachstum (Kücherer et al., 1987; Fahrig et al., 1990). Neben der Glykosylierung durchläuft P0 weitere posttranslationale Modifikationen, dazu zählen Phosphorylierung (Singh und Spritz, 1976), Sulfatierung (meist an die Zuckerkette) (Matthieu et al., 1975) und Acylierung (Agrawal et al., 1983; Bizzozero et al., 1989).

Die P0-mRNA kann schon ab Tag 14 der Embryonalentwicklung in Neuralleistenzellen, den Vorläufern Myelin-bildender Schwann-Zellen, detektiert

werden (Zhang et al., 1995). Eine massive Zunahme der P0-Expression kann postnatal am Tag 14 der Entwicklung detektiert werden, wenn die Myelinisierung und die Kompaktierung am ausgeprägtesten ist. Später fällt die Expression auf ein basales Level und bleibt dann stabil (Baron et al., 1994).

1.3.2 Funktionen von P0

Dem P0-Protein werden essentielle Funktionen in der Bildung und der Erhaltung des kompakten Myelins zugeschrieben. Durch homophile Interaktion der extrazellulären Domäne wird die *intraperiod line* des kompakten Myelins stabilisiert (Abb. 1-5). Die *major dense line* wird durch die intrazelluläre Domäne stabilisiert, wobei die positiv geladene intrazelluläre Domäne direkt mit den negativ geladenen Phospholipiden der gegenüberliegenden Schwann-Zellmembran interagiert (Ding und Brunden, 1994; Kirschner und Ganser, 1980; Lemke, 1993).

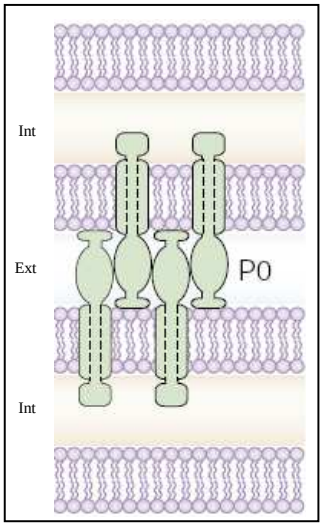


Abbildung 1-5. Schematische Darstellung des kompakten Myelins
Lokalisation der intra- und extrazellulären Domäne des P0 in der Schwann-Zellmembran. Int: intrazellulärer Raum; Ext: extrazellulärer Raum (modifiziert nach Suter und Scherer, 2003)

Eine homophile Interaktion von P0 konnte zum ersten Mal durch die verstärkte Aggregation von CHO-Zellen, die mit P0 transfiziert wurden, gezeigt werden (Filbin und Tenekoon, 1990). Sowohl die extrazelluläre Domäne als auch die intrazelluläre

Domäne (vor allem die Aminosäuren 191–206) spielen eine Rolle in der Vermittlung der homophilen Interaktion von P0. Denn eine Verkürzung oder ein Fehlen der intrazellulären Domäne kann die vermehrte Aggregation der Zellen blockieren (Wong und Filbin, 1996). Auch die Glykosylierung von P0 spielt dabei eine wichtige Rolle: Offenbar ist nicht nur die Protein-Protein-, sondern auch die Protein-Zucker-Bindung für eine homophile Interaktion von Bedeutung (Shy et al., 2004). Eine Analyse der Kristallstruktur der in *E. coli* exprimierten extrazellulären Domäne lässt vermuten, dass das P0 als Tetramer in der Membran vorliegt und mit dem Tetramer in der gegenüberliegenden Membran ein adhäsives Gitter bildet (Shapiro et al., 1996). Da die extrazelluläre Domäne des P0-Proteins für die Kristallisation in *E. coli* exprimiert wurde, war sie nicht glykosyliert. Es konnte also keine Aussage über den Einfluss der Zuckerkette auf die homophile Interaktion gemacht werden. Bisher gibt es keine Kristallstruktur des glykosylierten P0-Proteins.

1.3.3 Mutationen im P0-Gen führen zur Charcot-Marie-Tooth´schen Erkrankung

Mutationen im P0-Gen sind eine der möglichen genetischen Ursachen für die Charcot-Marie-Tooth´sche Erkrankung (CMT). Die Charcot-Marie-Tooth´sche Erkrankung ist die häufigste erbliche neurogene Muskelatrophie und wird auch als hereditäre motorische und sensorische Neuropathie (HMSN) bezeichnet. Bald nach der ersten Beschreibung der Krankheit im Jahr 1886 wurde klar, dass die Krankheit sowohl klinisch als auch genetisch sehr heterogen ist. Mutationen im P0-Gen führen zur HMSN Typ 1 und Typ 2, zum Dejerine-Sottas-Syndrom (DSS) oder HMSN Typ 3 und der kongenitalen Hypomyelinisationsneuropathie (*congenital hypomyelination*, CH). Die HMSN vom Typ 1 (hypertropische Form) ist durch eine Demyelinisierung der Axone charakterisiert, die sich in einer deutlich reduzierten motorischen und sensorischen Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) äußert. Ein weiteres wichtiges Symptom sind die Zeichen der De- und Remyelinisierung des *Nervus suralis* (Rautenstrauss et al., 2000). Die Krankheit wird meist autosomal dominant vererbt. Es werden aber auch X-gekoppelte, gonosomal rezessive und sporadische Fälle beschrieben. Der HMSN Typ 2 (neuronale Form) ist durch eine normal oder nur

leicht reduzierte NLG und ein Absterben der Axone charakterisiert. Auch dieser Typ wird autosomal dominant oder rezessiv vererbt (Rautenstrauss et al., 2000). Die hypertrophische Form des DSS zeichnet sich durch eine Manifestation in der Kindheit aus. Der Krankheitsverlauf ähnelt symptomatisch dem HMSN Typ 1, schreitet jedoch rascher fort. Bei der kongenitalen Hypomyelinisationsneuropathie sind motorische und sensorische NLGs sehr stark reduziert, außerdem treten Hypothonie und Areflexie auf (Mandich et al., 1999).

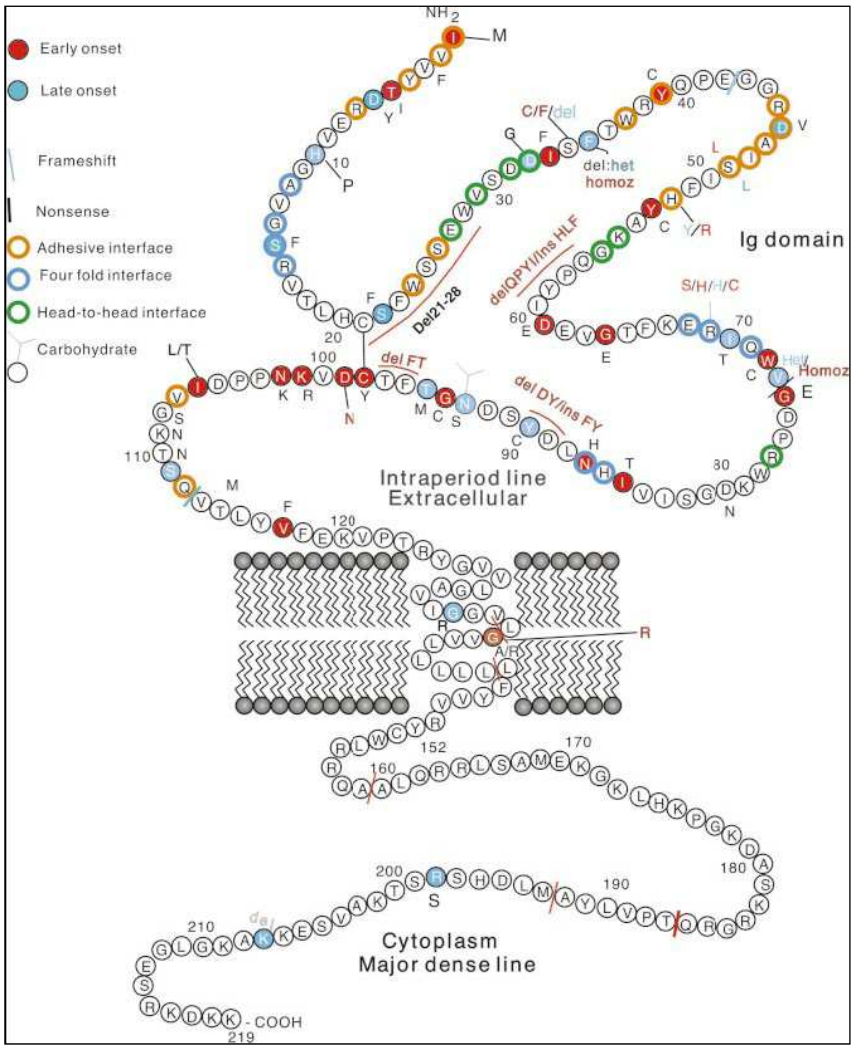


Abbildung 1-6. Mutationen im offenen Leseraster von P0

Die in der Abbildung markierten Mutationen führen zur hereditären motorischen und sensorischen Neuropathie (HMSN). *Adhesive Interface*, *four-fold interface* und *head-to-head interface* beziehen sich auf die Aminosäuren, die für eine Interaktion von P0 in *cis* und in *trans* essentiell sind. *Early onset*-Krankheitsfälle sind durch eine verspätete Entwicklung, wie z. B. ein verzögertes Erlernen des Laufens, definiert. Bei *late onset*-Krankheitsfällen treten die Symptome erst nach dem 21. Lebensjahr auf (modifiziert nach Shy et al., 2004).

Anhand der Korrelation verschiedener P0-Mutationen mit den dazugehörigen Phänotypen konnte gezeigt werden, dass ein schwerer Verlauf mit einer frühen Manifestation der Krankheit aus den Mutationen resultiert, die wahrscheinlich die tertiäre Struktur des Proteins so beeinflussen, dass dadurch die homophile Interaktion und folglich die Kompaktierung des Myelins beeinträchtigt wird. Im Gegensatz dazu resultiert eine späte Manifestation aus Mutationen, die die Struktur des Myelins vermutlich auf eine eher subtile Weise verändern. Als Folge davon ist wahrscheinlich die Interaktion der Schwann-Zelle mit dem Axon gestört (Shy et al., 2004).

Um den pathologischen Mechanismus einer bestimmten Mutation, dem Aminosäureaustausch an Postion 106 von Isoleucin zu Leucin (P0sub), zu untersuchen, wurden zwei transgene Mauslinien generiert. Beide Mauslinien exprimierten die *missense*-Mutation P0sub unter der Kontrolle des P0-Promotors auf einem Wildtyp-Hintergrund (Rünker et al., 2004). Die P0sub-Mutation ist im Menschen durch das Auftreten von *tomacula* sowie der Bildung von *onion bulbs* charakterisiert und entspricht damit der schweren und sich früh manifestierenden Form des HMSN Typ1, auch CMT1b genannt (Gabreëls-Festen et al., 1996). Die generierten transgenen Mauslinien, die diese Punktmutation zusammen mit den beiden wildtypischen Allelen exprimierten, zeigten einen der menschlichen Erkrankung sehr ähnlichen Phänotyp. Neben dem Auftreten von *tomacula* zeigten diese Mäuse reduzierte Nervenleitgeschwindigkeiten, eine schwere Muskelatrophie, Hypomyelinisierung sowie eine gestörte Entwicklung des Myelins. Die P0sub-transgene Maus stellt somit das erste authentische Modell für die schwere, sich früh manifestierende Form der CMT-Krankheit im Menschen dar (Rünker et al., 2004).

1.4 Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1

L1 ist ein neurales Zellerkennungsmolekül, das im zentralen Nervensystem der Maus entdeckt (Rathjen und Schachner, 1984) und als Mitglied der Ig-Superfamilie identifiziert wurde (Moos et al., 1988). Innerhalb der Ig-Superfamilie begründet es

eine kleine Unterfamilie, die sogenannte L1-Familie. Bei Wirbeltieren konnten bisher vier Mitglieder identifiziert werden: L1, CHL1 (*close homolog of L1*), NrCAM (*neuron-glia cell adhesion molecule related cell adhesion molecule*) und Neurofascin (Brümmendorf und Rathjen, 1995; Grumet, 1992; Hortsch, 2000). Für die korrekte Entwicklung des PNS und des ZNS spielt das L1-Protein eine entscheidende Rolle (Lindner et al., 1983; Rathjen und Schachner, 1984; Fransen et al., 1998; Dahme et al., 1997; Cohen et al., 1998).

1.4.1 Molekulare Struktur und Genetik von L1

L1 wird als Transmembran-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa exprimiert. Es besteht aus einer extrazellulären Domäne mit sechs Ig-artigen Domänen des C2-Typs (Williams und Barclay, 1988) und fünf FN III-Domänen, einer Transmembrandomäne und einer kurzen stark konservierten zytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne enthält 21 potentielle Stellen für Asparagin (N)-ständige Glykosylierung. Die Zuckerketten steuern ca. 25 % zu dem Gesamtmolekulargewicht von 200-220 kDa bei. Die Zusammensetzung der Zucker ist noch nicht vollständig bekannt, unter anderem trägt das L1 das HNK-1-Epitop (Grumet, 1992; Kruse et al., 1985).

Die extrazelluläre Domäne ist, neben der homophilen Interaktion, auch für viele heterophile Interaktionen des L1-Proteins essentiell. Strittig ist, ob die homophile Interaktion des L1 von Ig-Domäne I (Zhao und Siu, 1995), der FN III-Domäne III (Silletti et al., 2000) oder von der gesamten Region der Ig-Domäne I bis zur FN III-Domäne III vermittelt wird (De Angelis et al., 1999). Daneben interagiert die extrazelluläre Domäne mit einer breiten Anzahl an Oberflächenproteinen und Proteinen der extrazellulären Matrix (vergleiche Abb. 1-7). Diese Interaktionspartner können in 4 Gruppen eingeteilt werden (Haspel und Grumet, 2003): (i) Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie, wie NrCAM (Morales et al., 1996), Axonin-1 (Buchstaller et al., 1996) und NCAM (Kadmon et al., 1990; Simon et al., 1991; Horstkorte et al., 1993); (ii) andere Zelladhäsionsmoleküle, wie z. B. die Integrine (Felding-Habermann et al., 1997; Mechtersheimer et al., 2001;

Yip et al., 1998); (iii) Moleküle der extrazellulären Matrix, wie Laminin (Hall et al., 1997), Phosphacan (Grumet et al., 1996) und Neurocan (Friedlander et al., 1994); (iiii) Rezeptoren wie NP-1 (*neuropilin 1*) (Castellani et al., 2000) und der FGF-Rezeptor (Saffell et al., 1997; Garcia-Alonso et al., 2000). L1 bindet an die meisten Interaktionspartner entweder in *trans* oder in *cis*. Einige Moleküle können sowohl in *trans* als auch in *cis* an L1 binden. Ob dafür unterschiedliche Bindungsstellen verantwortlich sind, ist unklar (Haspel und Grumet, 2003).

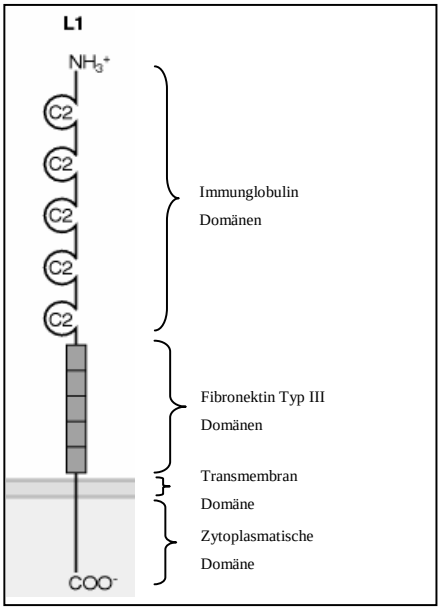


Abbildung 1-7. Schematische Darstellung von L1

Das L1-Molekül besteht aus sechs Ig-Domänen, fünf FN III-Domänen, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne (modifiziert nach Colman und Filbin, 1999).

Das L1-Protein wird von einem Gen kodiert, das auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Aus alternativem Spleißen resultieren zwei unterschiedliche Isoformen (Takeda et al., 1996). Von Neuronen wird die größere Isoform exprimiert, welche alle 28 kodierenden Exons enthält. In der kleineren Isoform, die von nicht-neuralen Zellen exprimiert wird, fehlen Exon 2 und 27. Exon 2 kodiert für 6 Aminosäuren (YKGHHV) am äußersten N-Terminus des L1 (Jouet et al., 1995) und beeinflusst die homophile Interaktion sowie das L1-abhängige Neuritenwachstum (Jacob et al., 2002). Exon 27 kodiert für 4 Aminosäuren (RSLE) innerhalb der zytoplasmatischen Domäne. Die ersten drei dieser vier Aminosäuren sind Teil des Tyrosin-haltige

Sortierungsmotivs YRSL. Letzteres ist wichtig für die Endozytose von L1, für das darauf beruhende Recycling von L1 in Wachstumskegeln und das L1-abhängige Neuritenwachstum (Kamiguchi et al., 1998; Kamiguchi und Lemmon, 2000; Kamiguchi und Yoshihara, 2001). Außerdem ist es wahrscheinlich für die korrekte Sortierung von L1 in Axonen erforderlich (Wisco et al., 2003).

1.4.2 Expressionsmuster und Funktionen des L1

Die Expression von L1 im Nervensystem ist zeitlich und räumlich reguliert. Im ZNS wird L1 während der Embryonalentwicklung ab Tag 10 von postmitotischen Neuronen exprimiert (Lindner et al., 1983). Untersuchungen an jungen Mäusen zeigten, dass die L1-Expression im Hippocampus auf faszikulierende Axone, die das *Stratum moleculare* und den *Hilus* bilden, beschränkt ist (Persohn und Schachner, 1990). Im adulten Nervensystem wird das Protein weiterhin von nicht-myelinisierten Axonen exprimiert, während es von myelinisierten Axonen verschwindet (Bartsch et al., 1989; Martini und Schachner, 1986). Im PNS wird L1 von nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen exprimiert (Martini und Schachner, 1986).

Sowohl während der Entwicklung des Nervensystems als auch im adulten Nervensystem ist L1 in eine Vielzahl wichtiger Prozesse involviert. Dazu gehören Zelladhäsion (Rathjen und Schachner, 1984; Moos et al., 1988; Grumet und Edelman, 1988) und Zellmigration (Lindner et al., 1983), das Axonwachstum (Fischer et al., 1986; Lemmon et al., 1989), die Axonfaszikulierung (Rathjen et al., 1987; Kunz et al., 1998) und die Wegfindung der Axone (Cohen et al., 1998; Castellani et al., 2000). L1 fördert das Zellüberleben von Neuronen (Chen et al., 1999; Loers et al., 2005) und ist auch in die Bildung des Myelins involviert (Wood et al., 1990). L1 ist weiterhin relevant für synaptische Plastizität sowie Lern- und Gedächtnisprozesse (Lüthi et al., 1994; Arami et al., 1996; Law et al., 2003; Saghatelyan et al., 2004). Die Vielfalt der L1-Funktionen im Nervensystem lässt sich auf eine Vielzahl von Bindungspartnern, potentiellen Signalkaskaden und posttranslationalen Modifikationen zurückführen. Wie schon in Abschnitt 1.4.1 erwähnt, interagiert L1 sowohl homophil, was bei vielen Funktionen eine Rolle spielt, als auch mit anderen Mitgliedern der Ig-Superfamilie. Dazu gehören

zahlreiche Proteoglykane und Signaltransduktionsmoleküle (Haspel und Grumet, 2003), die zusammenfassend in Abbildung 1-8 dargestellt sind.

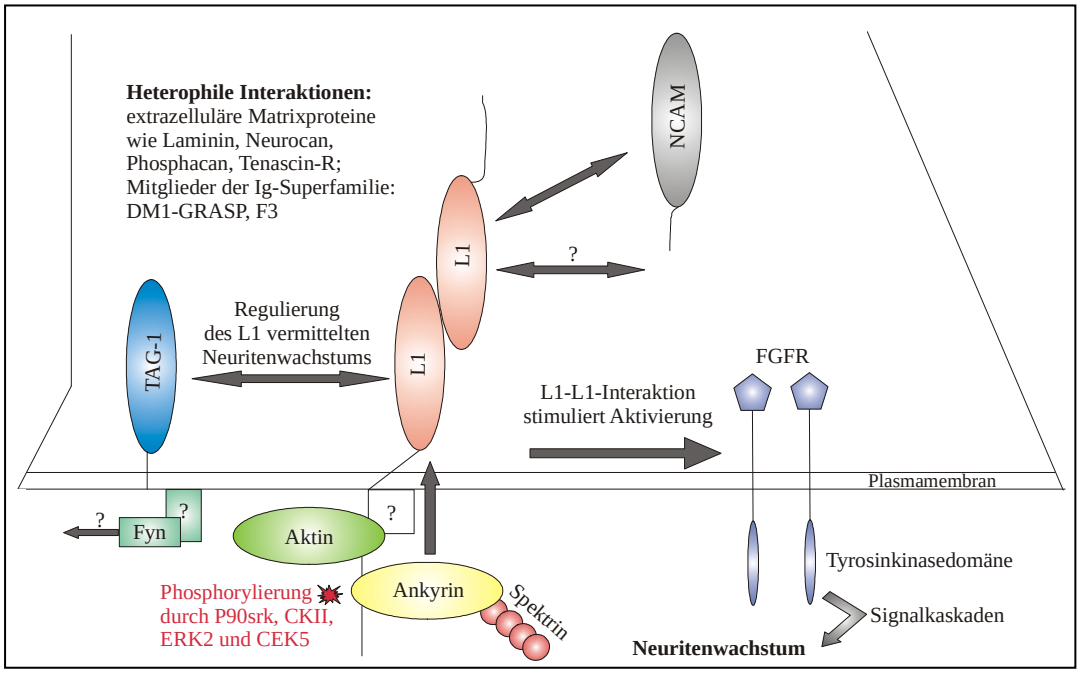


Abbildung 1-8. Die komplexen Interaktionen des L1-Moleküls

Durch die homophile Interaktion zweier L1-Moleküle (in *trans*) und die Aktivierung von FGF-Rezeptoren wird L1-abhängiges Neuritenwachstum initiiert. Die zytoplasmatische Domäne interagiert mit dem Zytoskelett und wird von vielen Kinasen phosphoryliert. Dicke Pfeile stellen eine Interaktion mit einem nachgewiesenen biologischen Effekt dar, dünne Pfeile stellen eine potentielle Bindung dar (modifiziert nach Kenwrick et al., 2000).

1.4.3 Mutationen im L1 führen zu neurologischen Syndromen des L1-Spektrums

Mutationen in allen Regionen des L1-Gens können beim Menschen zu gravierenden neurologischen Syndromen des so genannten L1-Spektrums führen (Moya et al., 2002). Gemeinsame Merkmale dieser L1-Syndrome sind eine erhöhte Sterblichkeit, geistige Behinderung und verschiedene Missbildungen des Gehirns. Patienten mit Punktmutationen in der extrazellulären Domäne von L1 entwickeln häufig einen schwereren Phänotyp als solche mit Mutationen im zytoplasmatischen Bereich (Yamasaki et al., 1997; Wong et al. 1995). Es handelt sich dabei um ein rezessives

X-chromosomal gekoppeltes Krankheitsbild. Das L1-Spektrum ist eine Zusammenfassung mehrerer neurologischer Syndrome, wie HSAS (*hydrocephalus as result of stenosis of the aqueduct of Sylvius*), MASA (*mental retardation, aplasia, shuffling gait, adducted thumbs*), SP-1 (*complicated spastic paraplegia type 1*) und ACC (*agenesis of corpus callosum*) (Fransen et al., 1995). Über 140 verschiedene Mutationen im L1-Gen sind bisher bekannt (Van Camp et al., 1996), die zu einem sehr heterogenen und komplexen Phänotyp führen können. Häufig beschriebene Symptome des Krankheitsbildes sind geistige Unterentwicklung und ein Hydrocephalus, weiter werden auch Paraplegie der unteren Extremitäten, Hypoplasie des corticospinalen Traktes und des *Corpus callosum* sowie angewinkelte Daumen beschrieben, die sehr unterschiedlich ausgeprägt sein können (Weller und Gärtner, 2001). Die verschiedenen L1-Mutationen werden in drei Klassen eingeteilt. Dabei wird Unterschieden, wie eine Mutation die Struktur oder die Expression des L1 beeinflusst. Zur ersten Klasse werden Mutationen in der intrazellulären Domäne von L1 gezählt. Die zweite Klasse umfasst Mutationen, die zu einer *missense*-Mutation, also einem Aminosäureaustausch in der extrazellulären Domäne des L1-Proteins, führen. Zur dritten Klasse gehören, neben den *nonsense*-Mutationen, jene Mutationen, die eine Verschiebung des Leserasters verursachen. Dadurch wird ein vorzeitiges Stopcodon eingeführt und die extrazelluläre Domäne ist entsprechend verkürzt. Mutierte L1-Moleküle dieser Klasse werden nicht mehr in die Zellmembran eingebaut, da sie keine Transmembrandomäne mehr besitzen (Yamasaki et al., 1997).

1.4.4 Heterologe Expression und Kristallisation von L1

Da das endogene L1 nur in geringen Mengen aus Gewebe isoliert und aufgereinigt werden kann, wurde das L1-Protein in verschiedenen heterologen Systemen exprimiert, um größere Mengen biologisch aktives Protein zu produzieren. In *E. coli* wurde die extrazelluläre Domäne und verkürzte Formen des L1 als Fusionsprotein mit einem Glutathion-S-transferase (GST)-*Tag* oder einem Histidin-*Tag* exprimiert. Nach der Aufreinigung und Renaturierung des jeweiligen L1-Fusionsproteins konnte dessen biologische Aktivität in einem Neuritenwachstumsexperiment nachgewiesen

werden (Zhao und Siu, 1995; Yip et al., 1998). Das in *E. coli* exprimierte L1 war nicht glykosyliert, was wahrscheinlich einen negativen Einfluss auf die korrekte Faltung und biologische Aktivität des Proteins hatte. Um dieses Problem zu lösen, wurde die extrazelluläre Domäne des L1 als Fusionsprotein mit einem Fc-*Tag* in einer Affennieren-Zelllinie (COS-Zellen) und *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zellen exprimiert. Das Protein wurde unter anderem für Neuritogenese-Experimente verwendet (Alberts et al., 2003; Chen et al., 1999). Weiterhin wurde die extrazelluläre Domäne und verkürzte Formen des L1 in *Drosophila*-S2-Zellen exprimert und für Kristallisationsexperimente verwendet (Kulahin et al., 2004). In *Spodoptera frugiperda*-Sf9-Zellen wurde die extrazelluläre Domäne des L1 ebenfalls exprimiert und für Neuritenwachstumsexperimente verwendet (Gouveia et al., 2007 und 2008). Erst kürzlich wurde ein 140 kDa großes, lösliches Fragment des L1 als Fusionsprotein mit einem Histidin-*Tag* in Insektenzellen exprimiert. Dieses L1-Fragment ist biologisch aktiv und soll einen vergleichbaren neuritenwachstumsfördernden Effekt wie L1-Fc, das in Säugerzellen exprimiert wurde, haben (Cribb et al., 2008).

Bisher existiert keine Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des L1. Zwar konnte die extrazelluläre Domäne kristallisiert werden, die Kristalle lieferten aber kein Diffraktionsmuster (Kulahin et al., 2005). Einzelne Module der extrazellulären Domäne, die Ig-Domänen I-IV und die Fibronektin-Domänen I-III konnten hingegen kristallisiert werden (Kulahin et al., 2004). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der gesamten und einzelner Fragmente der extrazellulären Domäne des L1-Proteins zeigten, dass das L1 in Lösung eine hufeneinsenförmige oder eine offene Konformation einnehmen kann (Schürmann et al., 2001).

1.5 Eukaryotische Expressionssysteme

Viele als Biopharmazeutika eingesetzte Proteine, die heute auf dem Markt sind, werden rekombinant in pro- oder eukaryotischen Expressionssystemen hergestellt (Wurm, 2004). Wichtige Expressionssysteme sind Bakterien (*Escherichia coli*),

Hefen (*Pichia pastoris* und *Saccharomyces cerevisae*) und Säugetierzellen (vor allem CHO-Zellen). 1987 wurde das erste therapeutische Protein (Plasminogen Aktivator, r-tPA), das rekombinant in CHO-Zellen produziert wurde, von der Firma Genentech auf den Markt gebracht. Seit diesem Zeitpunkt haben eukaryotische Expressionssysteme an Bedeutung gewonnen.

Bei der Auswahl eines passenden Expressionssystems müssen mehrere Faktoren beachtet werden. Dazu gehören der Zeitaufwand, die Verfügbarkeit von Ressourcen und die Eigenschaften, die das rekombinante Protein am Ende besitzen soll. In Tabelle 1-1 findet sich ein vergleichender Überblick über die wichtigsten Expressionssysteme und ihre relevanten Eigenschaften.

Tabelle 1-1. Vergleich von Expressionssystemen

(verändert nach Fernandez und Hoeffler, 1998)

	Expressionssytem			
	Bakterien	**Hefe**	**Insektenzellen**	**Säugetier-Zellkultur**
Zellwachstum	schnell	schnell	langsam	langsam
Mediumkomponenten & -kosten	Minimum gering	Minimum gering	Komplex hoch	Komplex hoch
Expressionslevel	hoch	niedrig - hoch	niedrig- hoch	niedrig - mäßig
Extrazelluläre Expression	Sekretion ins Periplasma	Sekretion ins Medium	Sekretion ins Medium	Sekretion ins Medium
Posttranslationale Modifikationen				
N-ständige Glykosylierung	keine	Mannose	Einfach, *Paucimannose,* selten sialyliert	Komplex
O-ständige Glykosylierung	nein	ja	ja	ja
Proteinfaltung	Rückfaltung erforderlich	Rückfaltung selten erforderlich	korrekte Faltung	korrekte Faltung
Phosphorylierung	nein	ja	ja	ja
Acylierung	nein	ja	ja	ja
Acetylierung	nein	ja	ja	ja
γ-Carboxylierung	nein	nein	nein	ja

1.5.1 CHO-Zellen als Expressionssystem

CHO-Zellen wurden 1957 von Theodore T. Puck bei einer Ovarienbiopsie aus einem weiblichen Hamster isoliert (Tijo und Puck, 1958). Es stellte sich heraus, dass diese Zellen relativ robust sind, eine recht kurze Generationszeit haben und sich gut zur In-vitro-Kultivierung eignen (Jayapal et al.). CHO-Zellen dienen seit dem oft als In-

vitro-Modellsystem für die Untersuchung biochemischer Zusammenhänge und wurden für viele biomedizinische und toxikologische Studien verwendet (Puck, 1985). Heute werden CHO-K1-Zellen verwendet, die nicht mehr in der Lage sind die Aminosäure Prolin zu synthetisieren, um eine unkontrollierte Vermehrung zu verhindern (Kao und Puck, 1968). CHO-Zellen werden mittlerweile auch zur heterologen Proteinexpression genutzt. 60 – 70 % aller rekombinanten Pharmazeutika werden in Säugetierzellen produziert, die meisten davon in CHO-Zellen (Wurm, 2004). Die rekombinanten Proteine müssen biologisch aktiv sein. Das beinhaltet eine korrekte Faltung und posttranslationale Modifikationen, wie z. B. die Glykosylierung. Proteine, die in CHO-Zellen produziert werden, besitzen diese Eigenschaften. Für die Produktion im großen industriellen Maßstab werden die Zellen in Suspensionskultur im Fermenter kultiviert. In den letzten zwanzig Jahren konnte die Produktivität durch Hochzelldichtefermentation und eine längere Kultivierung enorm gesteigert werden (Wurm, 2004). Ein Nachteil der Proteinexpression in CHO-Zellen ist der lange Zeitraum, der benötigt wird, um eine stabile Zelllinie zu generieren, die das gewünschte Protein in großer Menge exprimiert. Meist werden Expressionsvektoren mit einem starken viralen Promotor verwendet (Ringold et al., 1981; Gopalkrishnan et al., 1999). Zur Transfektion der CHO-Zellen gibt es verschiedene Methoden, dazu zählen Calcium-Phosphat-Präzipitation, Elektroporation und Lipofektion (Norton und Pachuk, 2003). Meist werden superspiralisierte Plasmide in die Zellen transfiziert, die dann nach 1 - 2 h durch die Aktivität von Endo- und Exonukleasen im Kern linear vorliegen. Durch nichthomologe Rekombination integriert das Plasmid ins Genom. Die Position der Integration ist entscheidend, denn sie beeinflusst die Expression des Transgens. Zur Selektion der stabil transfizierten Zellen gibt es verschiedene Antibiotika, wie Neomycin, Hygromycin und Puromycin. Die entsprechenden Resistenzgene werden mit Hilfe der verwendeten Expressionsvektoren in die CHO-Zellen eingeführt. CHO-Zellen wachsen normalerweise adhärent (z. B. CellSTACK Zellkulturkammern). Mit geeigneten Methoden und den optimalen Medien können sie aber auch in Suspensionskultur (kontinuierliche Perfusions- oder Batch-Systeme) gehalten werden.

1.5.2 *Pichia pastoris* als Expressionssystem

Die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* ist neben *Saccharomyces cerevisia*e, *Hansenula polymorpha* und *Yarrowia lipolytica* eine der wichtigsten Hefen zur heterologen Expression (Buckholz und Gleeson, 1991; Romanos et al., 1995; Higgins und Cregg, 1998). Hefen stellen eine interessante Alternative zu anderen Expressionssystemen dar, da sie zwei wichtige Charakteristika in sich vereinigen. Zum einen wachsen sie schnell in einem anspruchslosen und kostengünstigen Medium und zum anderen können sie posttranslationale Modifikationen wie N- und O-Glykosylierung (Eckart und Bussineau, 1996) und Disulfidbrückenbildung (Cereghino und Cregg, 2000) durchführen. Die Tendenz zur Hyperglykosylierung ist bei *Pichia pastoris* weniger stark als bei *Saccharomyces cerevisiae* ausgeprägt (Grinna und Tschopp, 1989). *Pichia pastoris* führt keine α-1,3-Verknüpfungen zwischen Mannoseeinheiten durch. Dies ist von Vorteil, da α-1,3-Mannoseseitenketten hoch immunogen und deshalb als Therapeutika ungeeignet sind (Verostek und Trimble, 1995).

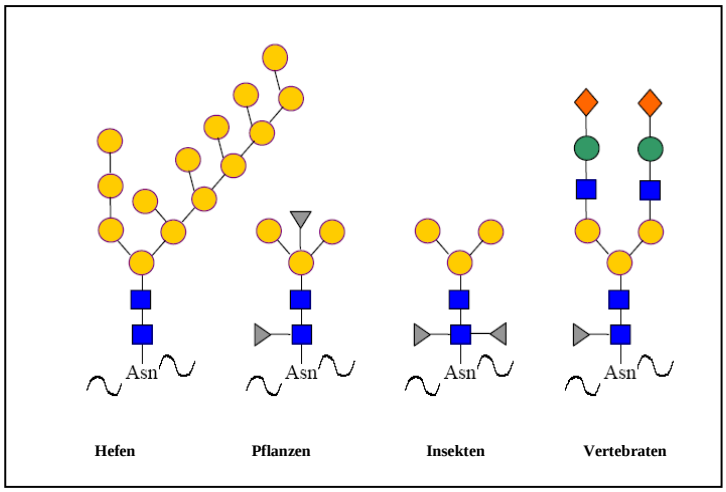


Abbildung 1-9. Die häufigsten N-Glykosylierungen in verschiedenen Spezies
■ N-Acetyl-Glukosamin; ● Mannose; ▶ Fukose; ● Galaktose; ◆ N-Acetyl-Neuraminsäure (modifiziert nach Varki et al., 1999)

Das heterologe Protein kann entweder intrazellulär oder ins Medium sezerniert exprimiert werden. *Pichia pastoris* sezerniert selbst nur geringe Mengen Protein, was einen Vorteil für eine spätere Reinigung darstellt (Tschopp et al., 1987; Barr et al., 1992). Die Sekretion der Fremdproteine kann durch den α-Paarungsfaktor aus

Saccharomyces cerevisiae (Clare et al., 1991; Ridder et al., 1995) oder durch eine proteineigene Signalsequenz (Tschopp et al., 1987; Barr et al., 1992) vermittelt werden. Bei der sekretorischen Expression können die heterologen Proteine proteolytischem Abbau ausgesetzt sein (Higgins und Cregg, 1998; Cereghino und Cregg, 2000). Dieses Problem tritt vermehrt bei Fermentationen von *Pichia pastoris* auf. Durch den Zusatz von leicht verwertbaren Aminosäurequellen, wie Caseintotalhydrolysat, zum Kulturmedium (Brankamp et al., 1995), den Einsatz von Proteaseinhibitoren, die Variation des pH-Wertes (Clare et al., 1991; Rosenfeld et al., 1996) sowie durch die Verwendung proteasedefizienter Hefestämme (SMD1168) (Brierley et al., 1998) kann die Degradation gemindert werden. Zur Selektion dient bei *Pichia pastoris* häufig das *Sh ble*-Gen aus *Streptoalloteichus hindustanus*, das die Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin verleiht (Cregg et al., 1985; Cregg et al., 1989; Higgins et al., 1998). Zeocin wird in Pro- und Eukaryoten als Selektionsmarker verwendet. Rekombinante *Pichia pastori*s-Klone weisen eine hohe genetische Stabilität auf (Cregg und Madden., 1989), da die Expressionskassette durch homologe Rekombination ins Hefegenom integriert wird (Romanos et al., 1995). Die Expression des heterologen Proteins wird durch den Alkoholoxidase 1 (AOX1)-Promotor kontrolliert (Tschopp et al., 1987). Dieser Promotor lässt sich durch Methanol induzieren und durch eine alternative Kohlenstoffquelle, wie Glycerin, reprimieren. In Kulturen, die auf Methanol im Schüttelkolben angezogen werden, liegt der Anteil bei ~5 % des gesamten löslichen Proteins, er kann aber durch Fermentation auf ≥30 % steigen (Couderc und Barrati, 1980). Klonale Variationen sind bei *Pichia pastoris* ausgeprägt, deshalb stellen die Herstellung rekombinanter Klone, die Identifizierung des besten Expressionsstammes und die Etablierung der optimalen Kultivierungsbedingungen kritische Punkte dar. In der Regel muss deshalb eine Vielzahl rekombinanter Klone analysiert werden, um einen gut exprimierenden Klon zu finden.

2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die extrazellulären Domänen der neuralen Zellerkennungsmoleküle P0 und L1 als rekombinante Proteine in biologisch aktiver Form zu produzieren, um nach Möglichkeit Röntgenstrukturanalysen und kernresonanzspektroskopische Analysen (NMR, *nuclear magnetic resonance*) durchführen zu können. Zu Beginn sollten geeignete eukaryotische Expressionssysteme gefunden werden, die es ermöglichen, die Proteine im Milligramm-Maßstab in glykosylierter Form zu exprimieren. Darüber hinaus sollten Aufreinigungsverfahren etabliert werden, die es erlauben, die Proteine mit größtmöglicher Reinheit und biologisch aktiv aus dem Kulturüberstand zu isolieren. Im Falle von P0 sollte neben der wildtypischen Form des Proteins auch eine mutierte Variante, bei der die Aminosäure Isoleucin an Position 106 gegen Leucin ausgetauscht ist, exprimiert werden. Diese Mutation ist eine der möglichen genetischen Ursachen für die Charcot-Marie-Tooth´sche Erkrankung (CMT) im Menschen. Ein Vergleich der dreidimensionalen Strukturen von wildtypischer und mutierter Form könnte wichtige Informationen über den Einfluss der Mutation auf die Struktur von P0 liefern und so ein besseres Verständnis der Entstehung der CMT-Erkrankung ermöglichen. Weiterhin sollte auch der mögliche Einfluss dieser Mutation auf die homophile Interaktion des P0 untersucht werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien und Fertiglösungen wurden mindestens mit dem Reinheitsgrad p. a. verwendet und von folgenden Firmen bezogen:

• Invitrogen (Karlsruhe)
• VWR (Darmstadt)
• Serva (Heidelberg)
• Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Verbrauchsmaterialien stammten von:

• Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg)
• Eppendorf (Hamburg)
• Bio-Rad (München)
• Sigma (München)

3.1.2 Enzyme und Reaktionskits

Reaktionskits und Enzyme wurden von folgenden Firmen bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt:

• QIAGEN (Hilden)
• Invitrogen (Karlsruhe)
• Roche (Mannheim)

• Sigma (München)
• NEB (Frankfurt am Main)
• Macherey-Nagel (Düren)
• Stratagene (La Jolla, USA)

3.1.3 Verwendete Proteaseinhibitoren

Complete Proteasen-Inhibitoren-Cocktail-Tabletten (EDTA-*free*) (Roche) hemmen ein breites Spektrum an Serin-, Cystein- und Metalloproteasen sowie Calpainen. Sie sind zum Schutz von Proteinen geeignet, die aus tierischen Geweben, Pflanzen, Hefen oder Bakterien isoliert werden (North, 1969).

AEBSF ist ein Serinproteasen-Inhibitor. Serinproteasen sind durch ihre Serinseitenkette im aktiven Zentrum charakterisiert. Dieser Serinrest ist reaktiv und an der Hydrolyse der Peptidbindung beteiligt. Die Fluorphosphat-Inhibitoren (z. B. DFP) und die Sulfonylfluoride (z. B. AEBSF oder PMSF) reagieren schnell mit dem Serinrest. Dabei entsteht ein stabiles acyliertes Enzym, das keine proteolytische Aktivität mehr besitzt. AEBSF inhibiert Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein und Thrombin. AEBSF ist ein idealer Ersatz für PMSF und DFP, da es im Vergleich zu den letztgenannten Substanzen in wässrigen Lösungen stabiler und zudem deutlich weniger toxisch ist. Aufgrund ihrer relativ niedrigen Toxizität gegenüber eukaryontischen Zellen kann die Substanz bei der Produktion von rekombinanten Proteinen durch Fermentation von transformierten Zellen eingesetzt werden, um das gewünschte Produkt vor proteolytischem Abbau zu schützen (Lunn und Sansone, 1994; Markwardt, 1982).

3.1.4 Verwendete Antikörper

3.1.4.1 Primäre Antiköper

Die Tabelle 3-1 gibt eine Übersicht über die verwendeten primären Antikörper und ihre Eigenschaften.

Tabelle 3-1. Verwendete Antikörper

Bezeichnung	Spezies (Herkunft)	Epitop	Verdünnung für die Anwendung im *Western Blot*	Hersteller / Referenz
α-P0 (polyklonal)	Kaninchen	Extrazelluläre Domäne von P0 (*danio rerio*)	1:10.000	Labor von M. Schachner
α-L1 (polyklonal)	Kaninchen	Extrazelluläre Domäne des murinen L1-Fc	1:10.000	Labor von M. Schachner
α-L1 555 (monoklonal)	Ratte	Extrazelluläre Domäne des murinen L1, Aminosäuresequenz zwischen der 2.und 3. FN-Domän	1:15.000	Appel et al., 1995
α-human-Fc HRP-gekoppelt (polyklonal)	Ziege	Fc-Fragment des humanen IgG	1:10.000	Sigma-Aldrich / Voller et al., 1976
α-Histidin-*Tag* (polyklonal)	Kaninchen	Mit Histidin markierte Proteine	1:1.000	Cell Signalling / Kroll et al., 1993; di Guan et al., 1988

3.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Die verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish-peroxidase*, HRP) gekoppelt und wurden für den immunologischen Nachweis der Proteine (s. 3.4.4) mit einer Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt.

3.1.5 Verwendete Zelllinien und Hefestämme

In der Tabelle 3-2 sind die zur Expression rekombinanter Proteine verwendeten Zelllinien und Hefestämme aufgeführt.

Tabelle 3-2. Verwendete Zelllinien und Hefestämme

Zelllinie	**Eigenschaften**	**Referenz**
Chinese Hamster Ovary (CHO) K1	Dehydrofolatreduktase-defiziente Hamsterzelllinie	ATCC CRL-9096 (Stanley und Siminovitch, 1977)
Hefestamm (*Pichia pastoris*)	**Genotyp**	**Hersteller**
SMD1168	his4 pep4 (Proteasedefizient)	Invitrogen
X-33	Wildtyp	Invitrogen

3.1.6 Verwendete *E. coli*-Stämme

In der Tabelle 3-3 sind die verwendeten *E. coli*-Stämme mit ihren genotypischen Eigenschaften aufgeführt.

Tabelle 3-3. Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
DH5α	*F-,φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk--,mk+), phoA, supE44, λ-, thi-1, gyrA96, relA1*	Clontech
XL10-Gold	Tetr D(*mcrA*)*183* D(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)*173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F¢ *proAB lacI* qZD*M15* Tn*10* (Tetr) Amy Camr]	Stratagene

3.1.7 Verwendete Plasmide

In der Tabelle 3-4 sind die verwendeten Plasmide und ihre Eigenschaften aufgeführt.

Tabelle 3-4. Verwendete Plasmide

Plasmide	Eigenschaften	Hersteller
pGEM T-Easy	TA-Klonierungsvektor, Ampicillin-Resistenz	Promega
pPICZαA	Hefe-*E. coli*-shuttle Vektor, Expressionsvektor für *Pichia pastoris*, α-Faktor Sekretionssignal, Zeocin-Resistenz	Invitrogen
pcDNA3	Expressionsvektor für Säugetierzellen, Ampicillin-Resistenz	Invitrogen

3.1.8 Verwendete Antibiotika

Zur Selektion wurden die Antibiotika Ampicillin (Sigma-Aldrich) und Zeocin (Invitrogen) eingesetzt. Das Ampicillin wurde mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml verwendet. Das Zeocin wurde zur Selektion der *E. coli*-Klone mit einer

Endkonzentration von 25 µg/ml und zur Selektion der *Pichia pastoris*-Klone mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt.

3.1.9 Verwendete Oligonukleotide

In der Tabelle 3-5 sind die verwendeten Primer aufgeführt. Primer wurden von der Firma metabion (Martinsried) bezogen.

Tabelle 3-5. Verwendete Primer

Primer für die Sequenzierung der P0-cDNA (Wildtyp und Mutante)	
P0-2	TCC TTC TGG TCC AGT GAA
P0-3	TGG GTA GGG GAC
P0-4	CCC ACT AGG TAT GGG GTG
P0-5	AGA TTT CAC AAA TCT TCG
P0-6	AAG AAA TCA AAA GGG CTG
Primer für die Klonierung der cDNA für die extrazelluäre Domäne von P0 in den pPICZαA-Vektor	
P0-extra-dom-PmlI-for	TTT TTC ACG TGG ATT GTG GTT TAC ACG GAC AGG
P0-extra-dom-XbaI-rev	CAC CAC TTC TAG AAC CCC ATA CCT AGT GGG CAC TTT TTC
Primer für die Klonierung der cDNA des *full-length* P0 in den pcDNA3-Vektor	
P0-cDNA-EcoRI-for	GCT CTT GAA TTC ATG GCT CCC GGG GCT CCC TCC TCC
P0-cDNA-Xba-rev	CTG TTT TCT AGA TTT CTT ATC CTT GCG AGA CTC CCC CAG
Primer für die Mutagenese der cDNA des wildtypischen P0	
P0-mut-for	GAT GTC AAA AAC CCA CCA GAC TTA GTG GGC AAG ACC TCT CAG
P0-mut-rev	CTG AGA GGT CTT GCC CAC TAA GTC TGG GTT TTT GAC ATC
Primer für die Klonierung der cDNA für die extrazelluläre Domäne des mL1 in den Vektor pcDNA3	
mL1-ecd-EcoRI-for	TTT GCT GAA TTC TAC CAT GGA TGG TCG TGA TGC TGC
mL1-ecd-XbaI-rev	GAT GAG TTT TTG TTC TAG AAA GCT ACC TGT TCC ATT AGT CTT CAC

3.1.10 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

Agarosegel-Probenpuffer (10 x)	Tris 10 mM EDTA 1 mM Glycerin 50 % (w/v) Bromphenoblau 0,05 % (w/v) pH 7,2
BMMY- / BMGY-Medium	Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton 2 % (w/v) YNB 1,34 % (w/v) Kaliumphosphatpuffer 100 mM pH 6,0 Histidin 0,04 % (w/v) Biotin 0,0004 % (w/v)) Glycerin 1 % (w/v) bzw. Methanol 0,5 % (w/v)
LB-Medium	Pepton 1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 1 % (w/v)
LB-Agar	wie LB-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar
LB-Medium *(low salt)*	Pepton 1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 0,5 % (w/v)
LB-Agar *(low salt)*	wie LB-Medium *(low salt)* mit 1,5 % (w/v) Agar

PBS	NaCl 137 mM
	KCl 2,7 mM
	Na_2HPO_4 7,4 mM
	KH_2PO_4 1,5 mM
	pH 7,4
RIPA-Puffer	NaCl 150 mM
	Tris 50 mM
	EDTA 1 mM
	NP40 1 %
	pH 7,4
SDS-Probenpuffer (4 x)	Tris 100 mM
	SDS 4 % (w/v)
	Glycerol 20 %
	Bromphenolblau 0,0005 % (w/v)
	DTT 4 % (w/v)
	pH 6,8
SDS-Laufpuffer	Tris 25 mM
	Glycin 1,92 mM
	SDS 0,1 %
	pH 8,3
TAE-Puffer (50 x)	Tris 2 M
	EDTA 100 mM
	pH 8,0
TBS	Tris 10 mM
	NaC l8,76 g
	pH 7,5
TBST	TBS
	Tween 0,01 %

TE-Puffer	Tris 10 mM EDTA 1 mM pH 8,0
YPD-Medium	Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton 2 % (w/v) Glucose 2 % (w/v) Histidin 0,04 % (w/v)
YPD-Agarplatten	wie YPD-Medium mit 2 % (w/v) Agar
YPDS-Agarplatten	Sorbitol 1,86 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) Trypton 2 % (w/v) Glucose 2 % (w/v) Histidin 0,04 % (w/v) Agar 2 % (w/v)

3.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in großem Maßstab

Um große Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* zu gewinnen, wurde der QIAGEN-Kit *QIAfilter Plasmid Maxi* gemäß der Empfehlungen von QIAGEN verwendet. Die QIAGEN-Protokolle für die Plasmidpräparation basieren auf einer modifizierten alkalischen Lyse, bei der die Bindung der Plasmid-DNA an die Anionenaustauscher-Matrix (QIAGEN Resin) in den QIAGEN-tips unter geeigneten Niedrigsalz- und pH-Bedingungen erfolgt. In einem Waschschritt bei mittlerer Salzkonzentration wurden RNA, Proteine, Farbstoffe und niedermolekulare Verunreinigungen entfernt. Die Plasmid-DNA wurde dann in einem Hochsalz-Puffer eluiert. Die anschließende

Isopropanol-Fällung diente dem gleichzeitigen Konzentrieren und, zusammen mit der Ethanol-Behandlung, dem Entsalzen der DNA.

3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab

Zur Gewinnung kleiner Mengen DNA aus Bakterienkulturen erfolgte die Plasmidisolierung mit Hilfe des *GFX™ Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham) oder des *NucleoSpin Plasmid* Kits (Macherey-Nagel). Beide Kits wurden entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Die DNA-Proben wurden mit dem gleichen Volumen eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt, gevortext und anschließend zentrifugiert (13.000 x g / 5 min / RT). Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Nach Zugabe eines einfachen Volumens Chloroform wurde erneut zentrifugiert (13.000 x g / 5 min / RT) und die obere Phase wieder in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die anschließende Ethanolfällung erfolgte durch Zugabe des 2,5fachen Volumens an 96 % Ethanol und 0,1 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,2). Die Ansätze wurden jeweils für 30 min bei -20°C gelagert und anschließend zentrifugiert (13.000 x g / 25 min / 4°C). Die sedimentierte DNA wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 x g / 5 min / 4°C). Nach dem Entfernen des Überstandes wurde die DNA bei RT vollständig getrocknet und in einem angemessenen Volumen sterilem, entionisiertem Wasser oder TE-Puffer gelöst.

3.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration in Lösungen wurde mit Hilfe der UV-Spektroskopie (UV Spektrometer Pharmacia Ultrospec 3000) bestimmt. Dabei wurde die Extinktion einer geeigneten Verdünnung der DNA-Lösung bei 260 nm gemessen. Durch Abzug

der Extinktion des Leerwertes ließ sich die DNA-Konzentration berechnen. Eine Extinktion von 0,1 entspricht 5 µg/ml doppelsträngiger DNA. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Reinheit die Extinktion bei 280 nm gemessen. Wenn das Verhältnis von E_{260} zu E_{280} außerhalb des Bereiches von 1,5 - 2,0 lag, deutete dies auf eine Verunreinigung durch Proteine oder RNA hin.

3.2.5 Restriktionsanalyse

(Sambrook et al., 1989)

DNA-Restriktionen wurden in den für das entsprechende Enzym mitgelieferten Puffern durchgeführt. Dabei wurden die vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Inkubationszeiten und Temperaturoptima für die jeweiligen Enzyme beachtet. 1 µg DNA wurde in der Regel mit 2 U Enzym geschnitten.

3.2.6 Ligation

(Sambrook et al., 1989)

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Fragmente wurden durch die T4 DNA-Ligase verknüpft. Ligationen von DNA-Fragmenten mit überhängenden komplementären Enden (*sticky ends)* wurden für 1h bei RT inkubiert. Dann wurde die Hälfte des Liagtionsansatzes in kompentente *E. coli* transformiert. Die andere Hälfte des Ligationsansatzes wurde ü. N. bei 4°C inkubiert und anschließend in kompetente *E. coli* transformiert. Das optimale molare Verhältnis von Vektor zu Insert wurde genau berechnet: Das Verhältnis von Vektor zu Insert variierte zwischen 3:1, 6:1 und 9:1.

3.2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

(Sambrook et al., 1989)

Durch Restriktionsspaltung erhaltene DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen (SubCell®GT Elektrophoresekammern, BioRad) in TAE-Puffer aufgetrennt. Die Agarosegele wurden durch Lösen von 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer hergestellt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 10 x Agarosegel-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein 1 kB^+ DNA-Marker (Gibco BRL) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zum Nachweis der DNA für 30 min in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml in TAE-Puffer) gefärbt und die DNA-Banden mit Hilfe eines Imagesystems (E.A.S.Y. RH Imager, HEROLAB, Wiesloh) unter UV-Licht analysiert und fotografiert.

3.2.8 Polymerase-Kettenreaktion

(Mullis et al., 1986)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden DNA-Abschnitte amplifiziert. Dazu wurde eine Reaktion angesetzt, die neben dem Enzym, der DNA-Polymerase, auch Desoxyribonukleotide sowie zwei Primer enthielt. Einer dieser Primer war stets komplementär zu einem der beiden Enden des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Die Vervielfältigung der DNA wurde durch drei Schritte erreicht:

1. Denaturierungsschritt: Die zu amplifizierende DNA und die Primer wurden auf 94°C - 96°C erhitzt und dadurch in ihre Einzelstränge zerlegt.
2. Primerhybridisierung: Die Primer lagerten sich sequenzspezifisch bei einer Temperatur von 40°C - 70°C an die einzelnen DNA-Stränge an.
3. Elongation: Bei 68°C - 72°C verlängerte die DNA-Polymerase, ausgehend vom 3´-Ende des Primers, den fehlenden zweiten DNA-Strang in 5´-3´-Richtung.

3.2.9 Anhängen von 3´-Poly-A-Überhängen

Um PCR-Fragmente mit glatten Enden in einen Vektor mit T-Überhang zu klonieren, mussten diese Fragmente zunächst mit 3'-A-Überhängen versehen werden. Dazu wurden 7 µl des PCR-Produktes mit 0,5 mM dATP, 1 µl *Taq*-Polymerase, 1 µl 10 x *Taq*-Puffer und 1,5 mM $MgCl_2$ versetzt und für 10 min bei 70°C inkubiert.

3.2.10 Gerichtete Mutagenese

Zur Einführung einer gezielten Mutation innerhalb einer DNA wurde der *Quickchange® Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Methode beruht auf einer PCR. Dazu wurden das zu mutierende doppelsträngige DNA-Konstrukt und zwei Oligonukleotid-Primer, die beide die gewünschte Mutation trugen, verwendet. Die Mutation sollte in der Mitte der Primer liegen und von 10 - 15 Nukleotiden flankiert sein, die der Sequenz der zu mutierenden DNA entsprechen. Die Primer hybridisierten mit der einzelsträngigen DNA und wurden dann während der Elongation von der *PfuUltra HF* DNAPolymerase (Stratagene) verlängert. Dadurch entstand das mutierte DNA-Konstrukt. Für die PCR-Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

5 µl	10 x Reaktionspuffer
10 ng	dsDNA-Template
125 ng	5´-Primer
125 ng	3´-Primer
1 µl	dNTP-Mix
3 µl	*Quick Solution*

dd H_2O → Endvolumen 50 µl

Die Vervielfältigung der mutierten DNA wurde durch vier Schritte erreicht:

1. Initiale Denaturierung: 95°C für 1 min
2. Denaturierung: 95°C für 50 sec
3. Primerhybridisierung: 60°C für 50 sec
4. Elongation: 68°C für 1min / kb der Länge des Plasmids
5. Finale Elongation: 68°C für 7 min

} 18 Zyklen

Nach der PCR wurde der Ansatz mit der methylierungsabhängigen Endonuklease *DpnI* inkubiert, 10 U *DpnI* für 2 h bei 37°C. Dabei wurde die methylierte Ausgangs-DNA verdaut. Anschließend wurde die mutierte DNA in ultrakompetente XL10-Gold-Zellen transformiert. Positive Klone wurden am folgenden Tag in 5 ml Flüssigkulturen in LB Medium *(low salt)* mit 25 µg/ml Zeocin angeimpft und wiederum am folgenden Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert. Durch Sequenzanalyse wurde die DNA auf die Richtigkeit der eingefügten Mutation überprüft.

3.2.11 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse von DNA erfolgte in der Sequenzierabteilung des ZMNH. Hierzu wurden 1 µg DNA mit 10 pM des entsprechenden Sequenzierprimers versetzt und auf 8 µl Endvolumen mit dd H_2O aufgefüllt.

3.2.12 Vermehrung von *E. coli*-Zellen

E. coli-Kulturen wurden als Schüttelkultur (225 UpM) in LB- und LB-Medium *(low salt)* bei 37°C über Nacht kultiviert. Zur Anzucht rekombinanter *E. coli*-Kulturen wurde das Medium stets mit dem Antibiotikum, gegen das das jeweilige Plasmid eine Resistenz vermittelte, supplementiert. Zeocin wurde in einer Endkonzentration von 25 µg/ml und Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. LB-Zeo_{25}-Agarplatten *(low salt)* und LB-Amp_{100}-Agarplatten wurden auch zur

kurzzeitigen Lagerung von Bakterienklonen auf Masterplatten verwendet und bei 4°C gelagert.

3.2.13 Transformation von *E. coli*-Zellen

(Sambrook et al., 1989)

Die Bakterien wurden mittels Hitzeschock transformiert. Hierzu wurden 100 µl kompetente Bakterien (DH5α oder TOP10) auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden sie mit der DNA durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 90 sec bei 42°C wurden die Bakterien für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 500 µl LB-Medium hinzu gegeben, und die Bakterien wurden für 1 h bei 37°C und 200 UpM inkubiert. 100 µl der Zellen wurden auf LB- bzw. LB-Agar *(low salt)* (in beiden Fällen supplementiert mit Antibiotika, gegen die das jeweilige Plasmid eine Resistenz vermittelte) ausplattiert. Der Rest wurde 2 min bei 3.000 UpM zentrifugiert, und es wurden 200 µl des Überstandes abgenommen. Die Zellen wurden in dem restlichen Medium resuspendiert und in dieser Konzentration ebenfalls auf LB- bzw. LB-Agar *(low salt)* (supplementiert mit Antibiotika der vom Plasmid vermittelten Resistenz) ausplattiert und bei 37°C ü. N. inkubiert.

3.2.14 Kultivierung von *Pichia pastoris*

Pichia pastoris-Kulturen wurden als Schüttelkultur in YPD-Medium bei 30°C unter Schütteln (200 UpM) angezogen. Die Anzucht erfolgte in 300 ml-Schüttelkolben. Darüber hinaus musste darauf geachtet werden, dass das Kulturvolumen 1/10 des Volumens des Inkubationsgefäßes nicht überschreitet. Für die Kurzzeitlagerung der Hefen wurden diese auf YPD-Agarplatten ausgestrichen, ca. 24 h bei 30°C kultiviert und dann bei 4°C aufbewahrt. Für das Anlegen von Stammkulturen wichtiger Hefeklone wurden je 500 µl einer Übernacht-YPD-Kultur mit 500 µl sterilem 30 % (v/v) Glycerin gemischt und bei -80°C gelagert.

3.2.15 Transformation von *Pichia pastoris* durch Elektroporation

(modifiziert nach Becker und Guarente, 1991)

5 ml einer *Pichia pastoris*-Übernacht-Kultur wurden in 50 ml YPD-Medium über Nacht bei 30°C und 200 UpM kultiviert. Mit 500 µl dieser Vorkultur wurde eine 500 ml-Kultur angeimpft. Nach erneuter Inkubation ü. N. wurden die Zellen bei einer OD_{600} von 1,3 - 1,5 geerntet und bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in der gleichen Menge eisgekühltem Wasser resuspendiert, zentrifugiert (1.500 x g), in 250 ml eiskaltem Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert, in 20 ml eiskalter Sorbitol-Lösung (1 M) resuspendiert, nochmals zentrifugiert und zum Schluss in maximal 1 ml eiskalter Sorbitol-Lösung (1 M) aufgenommen. Die kompetenten Zellen (80 µl) wurden mit 10 - 20 µg der linearisierten und aufgereinigten DNA gemischt, in eine auf Eis stehende Elektroporationsküvette (0,2 cm) überführt und 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Elektroporator (Bio-Rad GenePulser) transformiert (Spannung: 1,5 kV). Sofort nach dem Puls wurde 1 ml eiskalte Sorbitol-Lösung (1 M) in die Küvette gefüllt, der Transformationsansatz in ein steriles Plastikgefäß überführt und ohne Schütteln inkubiert (1 h, 30°C). Die Zellen wurden auf YPDS-Platten (YPD + 1 M Sorbitol) mit Zeocin (100 µg / ml) ausplattiert und 3 - 4 Tage bei 30°C inkubiert.

3.2.16 Kultivierung transformierter *Pichia pastoris*-Klone für die rekombinante Proteinexpression

Mit einer einzelnen Kolonie eines rekombinanten *Pichia pastoris*-Klons wurden 50 ml BMGY-Medium in einem 300 ml Schüttelkolben angeimpft. Kultiviert wurde in einem Schüttelinkubator mit 200 Upm bei 30°C bis die Zellen eine OD_{600} von ca. 5 hatten. Die Zellen wurden zentrifugiert (1.500 x g / 5 min / RT) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 25 ml BMMY resuspendiert. Alle 24 h wurde die Methanolkonzentration mit 100 % Methanol auf 0,5 % eingestellt. Nach 48 h wurden die Zellen wieder zentrifugiert (3.000 x g / 5 min / RT), der Überstand wurde in ein separates Gefäß überführt, anschließend sterilfiltriert und durch SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese analysiert.

Zusätzlich wurden die rekombinanten *Pichia pastoris*-Klone in einem 35 l-Fermenter kultiviert. Dazu wurden je 250 ml BMGY-Medium in zwei 2 l-Schüttelkolben mit einer einzelnen Kolonie eines rekombinanten *Pichia pastoris*-Klons angeimpft. Kultiviert wurde ü. N. in einem Schüttelinkubator mit 200 Upm bei 30°. Mit dieser Vorkultur wurde ein mit 35 l BMGY-Medium gefüllter Fermenter (Braun Biotech International GmbH, Melsungen) angeimpft. Die Kultivierung lief über 3 Tage. Nach 12 h wurde das erste Mal Methanol zugegeben und so eine Konzentration von 0,5 % Methanol eingestellt. Anschließend wurde alle 12 – 16 h Methanol zugegeben. Nach dem Ende der Fermentation wurden die Zellen mit einer Durchflusszentrifuge (GEA Westfalia Separator GmbH, Oelde) vom Überstand separiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung aller Säugerzellen erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, einem CO_2- Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 %. Die für die Kultivierung der Zellen benötigte Plastikware wurde von der Firma Nunc bezogen.

3.3.1 Kultivierung von CHO-Zellen

Für die Kultivierung der C*hinese Hamster Ovary* (CHO)-Zelllinie wurde *Glasgow`s Minimal Essential Medium* (GMEM) der Firma PAA Laboratories verwendet. Dem Basalmedium GMEM wurden die in Tabelle 3-6 aufgeführten Zusätze zugefügt. Für die Kultivierung wurden Kulturflaschen in einer Größe von 75 cm^2 verwendet. Die Passage der Zellen wurde bei ungefähr 90 %iger Konfluenz der Zellen durchgeführt. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit 10 ml Hank`s gepufferter Salz-Lösung (HBSS, PAA Laboratories) gewaschen. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche erfolgte bei RT durch eine Inkubation mit 3 ml Trypsin für 2 - 5 min. Nach einer Zugabe von 7 ml Kulturmedium wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 ausgesät.

Tabelle 3-6. Zusammensetzung des Kulturmediums für die CHO-Zelllinie

Bestandteil	Konzentration	Herkunft
GMEM	1 x	PAA Laboratories
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	10 %	PAA Laboratories
L-Glutamin (100 x, 200 mM)	1 %	PAA Laboratories
Penicillin (10.000 Units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (100 x)	2 %	PAA Laboratories
non essential amino acids (100 x)	1 x	PAA Laboratories
Glutamat / Aspartat (100 x)	1 x	Sigma-Aldrich
Nucleoside (50 x)	1 x	Sigma-Aldrich

3.3.2 Langzeitlagerung der Zelllinien

Für die Langzeitlagerung der Zelllinien wurden die Zellen nach Erreichen der Konfluenz und Ablösen mit Trypsin im Anschluss an den Zentrifugationsschritt (1.000 UpM / 10 min / RT) in 1 - 2 ml Einfriermedium (vergleiche Tabelle 3-7) resuspendiert. Aliquots der einzufrierenden Zellen wurden in Isopropanol in speziellen Einfrierbehältern auf –80°C für mindestens 24 h gekühlt. Die Lagerung der Zellen erfolgte vorübergehend bei –80°C. Für eine langfristige Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Tabelle 3-7. Zusammensetzung des Einfriermediums für CHO-Zellen:

Bestandteil	Konzentration	Herkunft
GMEM	70 %	PAA Laboratories
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	20 %	PAA Laboratories
DMSO	10 %	Fluca

3.3.3 Transfektion von CHO-Zellen

Für die Transfektion von CHO-Zellen wurde das *Lipofectamin Plus Kit* (Invitrogen) verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden 2 x 10^5 CHO-Zellen in Vertiefungen mit einem Durchmesser von 35 mm ausgesät. Nach ca. 18 - 24 h hatten die Zellen üblicherweise eine Dichte von 60 – 70 % erreicht. Sie wurden dann mit GMEM ohne FCS und Antibiotika gewaschen und mit 2 µg DNA pro 35 mm Well transfiziert. Die Transfektion wurde wie im Protokoll des Herstellers beschrieben durchgeführt. Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium gegen Selektionsmedium mit 0,8 mg/ml Geneticin (siehe Tabelle 3-8) ausgetauscht. Die Zellen wurden für 2 - 3 Wochen im Selektionsmedium kultiviert, wobei das Medium alle 2 - 3 Tage gewechselt wurde, bis einzelne Klone gepickt werden konnten. Diese einzelnen Klone wurden in Vertiefungen einer 12-Well-Platte überführt und wieder ca. eine Woche im Selektionsmedium kultiviert, wobei ebenfalls alle 2 - 3 Tage das Medium gewechselt wurde. Sobald wieder einzelne Klone gepickt werden konnten, wurden diese ein zweites Mal in Vertiefungen einer 12-Well-Platte überführt, in Selektionsmedium kultiviert, wie unter 3.3.2 beschrieben, eingefroren und bei -80°C gelagert.

Tabelle 3-8. Zusammensetzung des Selektionsmediums

Bestandteil	Konzentration	Herkunft
GMEM	1 x	PAA Laboratories
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	10 %	PAA Laboratories
L-Glutamin (100 x, 200 mM)	1 %	PAA Laboratories
Geneticin 0,8 mg/ml	1 x	PAA Laboratories
non essential amino acids (100 x)	1 x	PAA Laboratories
Glutamat / Aspartat (100 x)	1 x	Sigma-Aldrich
Nucleoside (50 x)	1 x	Sigma-Aldrich

3.3.4 Lyse von CHO-Zellen

Um CHO-Zellen, die in einer 6-Well-Platte kultiviert wurden, zu lysieren, wurden sie zunächst einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 300 µl RIPA-Puffer (siehe 3.1.10) mit einem Zellschaber aus der Vertiefung geschabt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellen wurden leicht drehend 1 h bei 4°C inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (15.000 x g, 4°C, 10 min) abgetrennt und der Überstand wurde bei –20°C aufbewahrt.

3.3.5 Oberflächenbiotinylierung transient transfizierter CHO-Zellen

Die CHO-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion zweimal mit eiskaltem PBS^{2+} gewaschen. Die an der Zelloberfläche exprimierten Proteine wurden durch die Inkubation mit 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce) in PBS^{2+} für 10 min bei 4°C biotinyliert. Durch Inkubation mit 20 mM Glycin in PBS^{2+} für 5 min bei 4°C wurde die Reaktion beendet. Anschließend wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit eiskaltem PBS^{2+} gewaschen. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert. Das Zelllysat wurde ü. N. bei 4°C mit Streptavidin-gekoppelten Agarose-*Beads* inkubiert, mit denen dann die biotinylierten Proteine präzipitiert wurden. Die *Beads* wurden dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen. Durch Kochen (5 min, 95°C) in 1x SDS-Probenpuffer (siehe 3.1.10) wurden die Proteine von den *Beads* eluiert und konnten dann im *Western Blot* analysiert werden.

PBS^{2+}	wie PBS mit 0,5 mM $CaCl_2$ 2 mM $MgCl_2$

3.3.6 Zell-Aggregations-Assay mit transient transfizierten CHO-Zellen

(modifiziert nach Filbin et al., 1990)

48 h nach der Transfektion wurden die CHO-Zellen mit PBS gewaschen. Um die Zellen von der Plastikoberfläche zu lösen, wurden sie 2 – 3 min bei Raumtemperatur mit 0,025 % Trypsin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit M*inimum Essential Medium* (MEM) gewaschen und in GMEM resuspendiert. Das Resuspendieren erfolgte durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren mit Hilfe einer 18-*gauge* Kanüle. Nach dem Resuspendieren sollte die Suspension ein Minimum von 95 % Einzelzellen enthalten. Die Zellen wurden gezählt und in einer Konzentration von 2 x 10^6 Zellen/ml in Polystyren-Tubes (Falcon) gefüllt. Nun wurden die Zellen bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. Alle 30 min wurde eine Probe genommen und am Kontron-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) auf Aggregation überprüft. Dazu

wurden bei 20facher Vergrößerung jeweils 5 Aufnahmen gemacht. Um den Aggregationsindex zu ermitteln, wurden die Gesamtzellzahl und die Zahl der Zellaggregate auf den einzelnen Aufnahmen ermittelt. Der Aggregationsindex entspricht dem Quotienten aus der Anzahl der Aggregate dividiert durch die Gesamtzellzahl (Lee et al., 2008).

3.3.7 Produktion von mL1-Fc und mL1-TEV-Fc

Für die Produktion von Fc-Fusionsproteinen wurde GMEM (PAA Laboratories) verwendet. Dem Basalmedium GMEM wurden die aufgeführten Zusätze zugefügt (Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9. Zusammensetzung des Produktionsmediums für CHO-Zellen

Bezeichnung	Konzentration	Herkunft
GMEM	1 x	PAA Laboratories
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert) Ultra low IgG	2 %	PAA Laboratories
L-Glutamin (100 x, 200 mM)	1 %	PAA Laboratories
Penicillin (10.000 Units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (100 x)	2 %	PAA Laboratories

Für die Produktion der Fc-Fusionsproteine wurde eine CELLSTACK 2-Stack-Kulturkammer (1,272 cm^2) verwendet. Die CHO-Zellen wurden zuerst in 100 ml Kulturmedium, verteilt auf zwei Kulturflaschen (150 cm^2), ausgesät. Nach 3 – 4 Tagen in Kultur wurden die Zellen, wie in 3.3.1 beschrieben, passagiert, mit Produktionsmedium in der Kulturkammer ausgesät und 7-8 Tage in Kultur gehalten. Im Anschluss wurde der Überstand sterilfiltriert und im *Western Blot* auf das enthaltene Protein überprüft. Das enthaltene Fc-Fusionsprotein wurde entweder sofort über Protein A aufgereinigt oder der Überstand wurde bis zur Aufreinigung bei –20°C aufbewahrt.

3.3.8 Primärzellkultur

3.3.8.1 Beschichtung von 96-Well-Platten mit poly-L-Lysin

Die Beschichtung der 96-Well-Platten mit Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich) erfolgte ü. N. bei 4°C. Die einzelnen Vertiefungen wurden dazu in einer sterilen 0,01 %igen Lösung von Poly-L-Lysin (PLL) in PBS inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten dreimal mit HBSS gewaschen und 30 min unter UV-Licht bei RT getrocknet. Die Platten wurden bei 4°C unter sterilen Bedingungen aufbewahrt.

3.3.8.2 Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen

(Chen et al., 1999; Loers et al., 2005)

Für die Präparation der Kleinhirnneurone wurden 6 Tage alte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Die Präparation der Kleinhirne erfolgte auf Eis. Die Tiere wurden durch Dekapitierung getötet. Das Gehirn wurde entnommen und das Kleinhirn präpariert, welches dann in eiskalte HBSS gegeben wurde. Mit Hilfe eines Stereomikroskops wurden vom Kleinhirn assoziierte Blutgefäße und die Hirnhaut entfernt, das Kleinhirn in frische eiskalte HBSS überführt und mit einer feinen Schere in drei Teile geteilt. Die Gewebestücke wurden mit eiskalter HBSS gewaschen (5 ml HBSS / drei Kleinhirne), anschließend mit Trypsin/DNase I-Lösung (0,2 g Trypsin, 20 mg DNase I, 200 µl $MgCl_2$ (80 mM) auf 20 ml mit HBSS auffüllen, pH 7,8) (1 ml / drei Kleinhirne) 15 min bei RT inkubiert. Es folgten wiederum drei Waschschritte mit HBSS. Nach Zugabe der DNase I-Lösung (10 mg DNase I, 50 mg Glucose, auf 20 ml mit *Basal Medium Eagle* (BME) auffüllen) (1 ml / drei Kleinhirne) wurden die Gewebestücke durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit abgerundeten Pasteurpipetten (drei Pasteurpipetten mit abnehmendem Durchmesser) homogenisiert. Nach Zugabe von HBSS (5 ml / drei Kleinhirne) wurde die Zellsuspension 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 100 x g und 4°C zentrifugiert. Kam es nach der Inkubation auf Eis zu einer

Sedimentation von Gewebestücken, wurde lediglich der Überstand weiterverwendet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Kleinhirnneurone wurden in vorgewärmtem Medium X-1 (siehe Tabelle 3-10) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellsuspension wurde mit Medium X-1 entsprechend verdünnt. Für die Analyse des Neuritenwachstums der Kleinhirnneuronen wurden die Zellen in einer Zelldichte von $1x10^5$ Zellen/ml und $2x10^5$ Zellen/ml in eine mit HBSS gewaschene und mit PLL oder mit einem anderen Substrat beschichtete Vertiefung ausgesät.

Tabelle 3-10. Zusammensetzung des X-1-Mediums

Bestandteil	Konzentration	Herkunft
BME-Medium	1 x	Invitrogen
$NaHCO_3$	2,2 mg/ml	Invitrogen
Natriumpyruvat (100 mM)	1 mM	PAA Laboratories
Penicillin (10.000 Units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (100 x)	2 %	PAA Laboratories
L-Glutamin (100 x, 200 mM)	1 %	PAA Laboratories
BSA	0,1 %	Sigma-Aldrich
Insulin	10 µg/ml	Sigma-Aldrich
L-Thyroxin	4 nM	Sigma-Aldrich
Natriumselenit	30 nM	Sigma-Aldrich
Transferrin	100 µg/ml	Calbiochem
Aprotinin	0,027 TIU/ml	Sigma-Aldrich

3.4 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Mit Hilfe dieser Methode konnten Proteine zur Analyse und Bestimmung des Molekulargewichtes in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Dazu wurde die Mini-Protean II Elektrophoresekammer (BioRad) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Es wurden SDS-Polyacrylamidgele von 1,5 mm Dicke und einer Laufstrecke von ungefähr 0,5 cm im Sammelgel und 5 cm im Trenngel verwendet. Die Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen zeigt Tabelle 3-1. Es wurden 5 %ige Sammelgele und 7,5 %ige, 10 %ige oder 15 %ige Trenngele verwendet. Zur Proteinprobe wurde 4 x SDS-Probenpuffer (siehe 3.1.10) in einem Verhältnis von 4:1 (Probe:Puffer) gegeben, 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Für die Gelherstellung wurden Polyacrylamid-Trenngele in die Gelkammer (Bio-Rad) gegossen und bis zur vollständigen Polymerisierung mit Isopropanol überschichtet. Nach etwa 1 h wurde das Isopropanol entfernt. Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen, in das dann der Probenkamm eingesetzt wurde. Das Gel wurde nun in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Das Gel konnte nun mit den Proben beladen werden. Es wurde eine konstante Spannung von 150 V angelegt.

Tabelle 3-11. Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen

	Sammelgel 5 %	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %
30 % Polyacrylamid	0,83 ml	2 ml	2,665 ml	4 ml
1 M Tris / HCl pH 6,8	0,625 ml			
1 M Tris / HCl pH 8,8		2,98 ml	2,98 ml	2,98 ml
10 % SDS in dd H_2O	50 µl	80 µl	80 µl	80 µl
dd H_2O	3,45 ml	2,91 ml	2,25 ml	0,91 ml
TEMED	5 µl	4 µl	4 µl	4 µl
10 % APS in dd H_2O	40 µl	24 µl	24 µl	24 µl
Gesamtvolumen	5 ml	8 ml	8 ml	8 ml

3.4.2 Coomassie-Färbung

Zum Nachweis von Proteinen mit kolloidaler Coomassie-Färbung wurde Roti-Blue® (Carl Roth) verwendet und nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Gele wurden für 2 – 15 h in 100 ml der Roti-Blue® Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel in eine saubere Färbeschale überführt und unter Schütteln in 100 ml Waschlösung inkubiert, bis vorhandene Proteinbanden deutlich vom Gelhintergrund zu unterscheiden waren.

Roti-Blue® Färbelösung (1 x)	20 % Roti-Blue® Färbelösung (5 x) 20 % Methanol (v/v) 60 % dd H_2O
Waschlösung	25 % Methanol (v/v) 75 % dd H_2O

3.4.3 Immunoblot (*Western Blot*)

(Towbin et al., 1979; Burnette, 1981)

Bei der Immunoblot-Analyse wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran (Protan® Nitrocellulosemembran BA 85, 0,45 µm, Schleicher und Schuell) transferiert. Für diesen elektrophoretischen Transfer der Proteine von SDS-Gelen auf Nitrocellulosemembranen wurden MINI TRANSBLOT Apparaturen (BioRad) verwendet. Das Transfersandwich aus einem Schwämmchen, zwei Gel-Blotting-Papieren (Schleicher und Schuell), dem SDS-Polyacrylamidgel, der Nitrocellulose-Membran, wieder zwei Gel-Blotting-Papieren und einem Schwämmchen wurde nach Angaben des Herstellers in Blotpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin in dd H_2O) zusammengebaut, wobei auch alle Bestandteile des Transfersandwiches zuvor in Blotpuffer eingeweicht wurden. Das Transfersandwich wurde gemäß den Angaben des Herstellers in die mit Blotpuffer gefüllte Blottingapparatur zusammen mit einer Eiskühlung eingesetzt. Der Transfer wurde dann entweder bei Proteinen bis 30 kDa 100 min lang bei einer konstanten Spannung von 80 V durchgeführt oder bei Proteinen mit einem Molekulargewicht von >30 kDa 120 min lang bei einer konstanten Spannung von 80 V durchgeführt.

3.4.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

(Ausrubel et al., 1996)

Anschließend an den elektrophoretischen Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen eine Stunde lang bei RT in Blockierungslösung (4 % Magermilchpulver in TBST) inkubiert. Danach wurde die Membran mit dem primären Antikörper (verdünnt in Blockierungslösung) ü. N. bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Alle weiteren Inkubations- und Waschschritte wurden bei RT durchgeführt. Nach fünf Waschschritten von jeweils 5 min mit TBST wurde die Membran mit dem

sekundären Antikörper (Verdünnung 1:10.000 in Blockierungslösung) 1 h lang inkubiert. Hinterher wurde die Membran wieder fünfmal für 5 min mit TBST gewaschen und die Nachweisreaktion angeschlossen. Die verwendeten Primärantikörper mit den entsprechenden Verdünnungen sind in Tabelle 3-1 aufgelistet.

Um eine Membran nach der Antikörperbehandlung mehrfach verwenden zu können, wurde der Antikörper durch 15 min Inkubation der Membran in der Stripping-Lösung wieder entfernt. Anschließend wurde die Membran 3 min in 1 M Tris pH 8,8 neutralisiert und mehrmals mit dd H_2O gewaschen.

Stripping Lösung	0,1 M Glycin
	pH 2,5 – 3

3.4.5 Immunologischer Nachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz

Die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) war an die verwendeten sekundären Antikörper gekoppelt. Sie katalysierte die Lumineszenzreaktion, die durch Zugabe der Reagenzien *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* und *SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate* (Perbio) induziert wurde. Die enthaltenen Reagenzien wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Nitrocellulosemembran gegeben und 5 min lang inkubiert. Danach wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Filmkassette gelegt und durch Belichtung eines Röntgenfilms (Kodak® BioMax Light Film, Sigma-Aldrich) über verschiedene Zeiträume ausgewertet.

3.4.6 Dialyse

Das Umpuffern von Proteinlösungen bzw. die Entfernung niedermolekularer Verunreinigungen aus diesen Lösungen erfolgte mittels Dialyse. Die verwendeten Dialyseschläuche besaßen Porengrößen von 12 - 14 kDa, oder 4 - 6 kDa (Spectra

Por-Dialyseschläuche, Fa. Spectrum Medical Industries, bezogen über Fa. Carl Roth).

3.4.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

(Smith et al., 1985)

Die Proteinkonzentration wurde mit der Bichinconinsäure-Methode des BCA-Kits der Firma Pierce gemäß deren Empfehlungen durchgeführt. Der Test basierte auf der Reduktion von Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion), wobei sich ein purpurfarbener Komplex bildete. Auf diese Weise konnte die Proteinkonzentration spektroskopisch mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm bestimmt werden.

3.4.8 Deglykosylierung mit N-Glycosidase F

Zur vollständigen Deglykosylierung von Proteinen mit der N-Glycosidase F (Roche) wurde das aufgereinigte Protein durch Kochen (5 min, 95°C) in SDS-Probenpuffer denaturiert. Dazu wurde folgende Reaktion angesetzt:

10 µg Glykoprotein, hier in 8 µl PBS
2 µl SDS-Probenpuffer
→ 5 min bei 95°C kochen
10 µl 10 x Deglykosylierungspuffer (siehe unten)
2 µl N-Glycosidase F (1 U/µl)
<u>78 µl dd H_2O</u>
100 µl

Die Reaktion wurde ü. N. bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. Die einzelnen Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt. Das deglykosylierte Protein konnte dann im *Western Blot* mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

10 x Deglykosylierungspuffer	20 mM Natriumphosphat 10 mM EDTA 0,5 % Triton X-100 pH 7,2

3.5 Aufreinigung von Proteinen

3.5.1 Reinigung von Fc-Fusionsproteinen mit der Protein A-Affinitätschromatographie

Grundlage der Affinitätschromatographie ist die spezifische und hochaffine Wechselwirkung zwischen Molekülen. Protein A ist ein bakterielles Zellwandprotein des *Staphylococcus aureus* und weist eine spezifische Affinität zur Fc-Region von Immunglobulinen der G-Klasse (IgG) auf. Es enthält vier homologe Bindungsstellen für den Fc-Teil von Antikörpern und kann daher pro Ligand zwei Fc-Moleküle binden. Die Bindungsstärke zwischen dem Fc-Teil und dem Protein A wird durch die Herkunft (Spezies) und Subklasse des Antikörpers beeinflusst und kann erheblich variieren (Bjork und Kornvall, 1984).

Etwa 0,5 g Protein A-Sepharose (Pharmacia) wurden mit 50 ml PBS pH 7,5 aufgeschwemmt und 3 Stunden bei 4°C unter leichtem schütteln gewaschen. Bei 4°C wurde die Suspension stehengelassen bis das Gel sedimentiert war. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Gel dreimal mit dem zehnfachen Volumen PBS für 30 min gewaschen. Danach wurde die Gelsuspension 1:1 mit PBS verdünnt und in eine Glassäule (Biorad) überführt. In der Säule sedimentierte das Gel erneut, bevor die Säule mit dem zehnfachen Säulenbettvolumen bei einer Flussrate von 0,5 ml/min gewaschen wurde. Danach konnte der Kulturüberstand aufgereinigt werden.
Hierzu wurde die Säule mit 10 Vol. Äquilibrierungspuffer bei einer Flussrate von 0,25 - 0,5 ml/min gewaschen. Anschließend wurde der sterilfiltrierte Kulturüberstand mit einer Flussrate von 0,1 – 0,33 ml/min auf die Säule gegeben. Danach wurde die Säule erst mit 5 - 10 Vol. Waschpuffer 1 und dann mit 5 - 10 Vol. Waschpuffer 2

gewaschen. Das Fusionsprotein wurde mit dem Elutionspuffer und einer Flussrate von 0,25 ml/min eluiert und schnell mit Neutralisationspuffer neutralisiert. Zum Schluss wurde die Säule mit 10 Vol. Äquilibrierungspuffer, gefolgt von 5 Vol. Aufbewahrungspuffer, gewaschen und bei 4°C gelagert.

Äquilibrierungspuffer	PBS
Waschpuffer 1	100 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8,0
Waschpuffer 2	25 mM Tris pH 6,8
Neutralisationspuffer	1 M Tris pH 8,0
Aufbewahrungspuffer	PBS 0,01 % Natriumazid pH 7,4

3.5.2 Reinigung His-*getaggter* Proteine mit Hilfe der Ni-NTA-Technologie

(Porath et al., 1975)

Die DNA-Rekombination ermöglicht es, rekombinante Proteine als Fusionsproteine mit einem Affinitätstag zu exprimieren. Ein solcher Affintätstag ist der sechsfache Histidin-*Tag*. Mit seiner Hilfe kann das entsprechende Fusionsprotein über eine auf der Bindung an Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) beruhende Metallaffinitäts-Chromatographie aufgereinigt werden. NTA ist ein vierzähniger Chelatbildner, der von Hoffmann-La Roche entwickelt wurde. NTA besetzt vier der sechs

Lingandenbindungsstellen in der Koordinationssphäre des Nickelions (Ni^{2+}). Zwei Seiten bleiben für die Interaktion mit dem sechsfachen Histidin-*Tag* frei. Der sechsfache Histidin-*Tag* bindet an Ni-NTA. Alle Schritte der Aufreinigung wurden bei 4°C durchgeführt. Die Säule wurde mit Lysispuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit dem Kulturüberstand beladen und mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde das Protein mit dem Elutionspuffer eluiert. Die Konzentration von Imidazol im Lysispuffer kann variiert werden, sollte aber zwischen 0 und 10 mM Imidazol betragen.

Lysispuffer	50 mM NaH_2PO_4
	300 mM NaCl
	10 mM Imidazol
	pH 8,0
Waschpuffer	50 mM NaH_2PO_4
	300 mM NaCl
	20 mM Imidazol
	pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM NaH_2PO_4
	300 mM NaCl
	250 mM Imidazol
	pH 8,0

3.5.3 Spaltung von Fc-Fusionsproteinen mit der *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease

(modifiziert nach Haspel et al., 2000)

Der Fc-*Tag* dient der Aufreinigung von Fc-Fusionsproteinen mittels Protein A-Affinitätschromatographie. Für weiterführende physiologische Experimente oder für strukturelle Analysen kann sich der *Tag* als störend erweisen. Deshalb wurden die Fc-Fusionsproteine mit einem von der TEV-Protease (Invitrogen) spaltbaren Fc-*Tag*

exprimiert. TEV-Protease ist der Name für die 27 kDa große katalytische Domäne des *Nuclear Inclusion a* (NIa) Proteins des *Tobacco Etch Virus* (Parks et al., 1994; Polayes et al., 1994). Vorteile der TEV-Protease sind ihre hohe Spezifität für eine 7 Aminosäure lange Sequenz (ENLYFQG) und ihre Aktivität bei 4°C (Polayes et al., 1994). Für die TEV-Spaltung wurde das Fc-Fusionsprotein an Protein A-Sepharose-*Beads* ü. N. bei 4°C und leichtem Schütteln gebunden. Dafür wurden im kleinen Maßstab 50 µl *Beads* und 5 µg Fusionsprotein eingesetzt. Die *Beads* wurden vorher zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Nach der Inkubation wurden die *Beads* zweimal mit 1 ml PBS mit 0,1 % Triton X-100, dann zweimal mit 1 ml PBS mit 0,5 % Triton X-100 und zum Schluss zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Das Fusionsprotein konnte nun durch Inkubation mit der TEV-Protease eluiert werden. Dazu wurde folgende Reaktion angesetzt:

10 µl TEV-Protease (10 U/µl)
1,5 µl 0,1 M DTT
138,5 µl PBS
150µl

Zusätzlich wurde die Spaltung auch nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. Dafür wurde folgende Reaktion angesetzt:

5 µg Fusionsprotein
7,5 µl 20 x *TEV Buffer*
1,5 µl 0,1 M DTT
1 µl TEV-Protease (10 U/µl)
mit dd H_2O auf 150 µl auffüllen

Die Reaktionsansätze wurden 6 h oder ü. N. bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. Die einzelnen Fraktionen wurden im SDS-Gel aufgetrennt. Das gespaltene Fusionsprotein konnte dann im *Western Blot* mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

3.6 Kristallisation von Proteinen

3.6.1 Dynamische Laserlichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (Dynamic Light Scattering, DLS) ist eine Methode, mit der das Streulicht eines Lasers an einer gelösten Probe, z. B. einem Protein in Lösung, analysiert wird. Durch die relative Bewegung der gelösten Teilchen zueinander entstehen Fluktuationen in der Intensität des Streulichtes, deren Dauer abhängig von der Größe der Moleküle ist. So kann der hydrodynamische Radius eines Moleküls bestimmt werden. Der hydrodynamische Radius einer Probe gibt Aufschluss darüber, ob die Probe monodispers ist. Für die Kristallisation eines Proteins ist es wichtig, dass es in Lösung monodispers vorliegt, also keine Proteinaggregate vorliegen. Deshalb wurde vor jedem Kristallisationsansatz eine DLS-Messung durchgeführt. Um mögliche Aggregate abzutrennen, wurde die Proteinlösung vor der Messung kurz zentrifugiert (15.000 x g, 4°C, 10 min). Die Küvette wurde sehr gründlich mit Ethanol und dd H_2O gereinigt, anschließend wurde sie kurz mit Druckluft getrocknet. 40 µl der Proteinlösung wurden in die Küvette gegeben und im Spectroscatter 201 (RiNA GmbH, Berlin) gemessen.

3.6.2 Kristallisation nach der Dampfdiffusionsmethode

(McPherson, 1982)

Die Kristallisation wurde im Laboratorium für Strukturbiologie von Infektion und Entzündung (Universität Hamburg, Department Chemie) nach der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen durchgeführt. Dazu wurden 480 verschiedene Kristallisationsbedingungen mit Hilfe des Roboters Honeybee 961 (Genomic Solutions) in Plastikplatten mit 96 Vertiefungen (Corning, Lowell, USA) pipettiert. Zuerst wurden für einen in diesem Laboratorium üblichen *Screen* folgende Kits von der Firma Hampton Research (Aliso Viejo, USA) verwendet: Hampton Research Index, Hampton Research Cryo, Hampton Research MembFAC, Hampton

Research 1 + 2. Zusätzlich wurde der Kit Jena Bioscience 1-8 (Jena Bioscience, Jena) verwendet, so dass für einen *Screen* insgesamt 5 x 96 Bedingungen zur Verfügung standen. Später wurden Kits der Firma QIAGEN standardmäßig verwendet: Classic Suite, JCSG + Suite, ComPAS Suite. Ein *Screen* beinhaltete dann 3 x 96 Bedigungen. Dazu wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1:1 mit der entsprechenden Reservoirlösung verdünnt, so dass der Präzipitant, also das Fällungsmittel, verdünnt vorlag. Anschließend wurde die Platte mit einer Klebefolie luftdicht verschlossen.

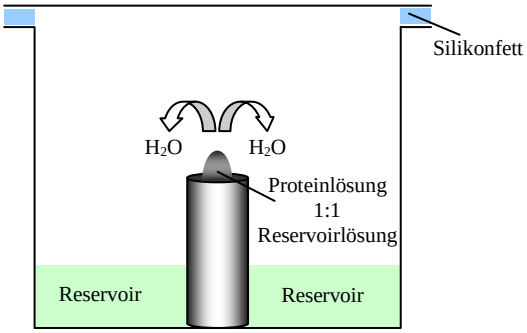


Abbildung 3-1. Proteinkristallisation nach der Dampfdiffusionsmethode
Beispielhafte Darstellung der Dampdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen. Das Reservoir enthält den Präzipitanten hochkonzentriert, wodurch dem Gemisch aus Protein- und Reservoirlösung in diesem abgeschlossenen System Wasser entzogen wird.

Die Reservoirlösung enthielt den verwendeten Präzipitanten hochkonzentriert. Durch die höhere Konzentration des Präzipitanten im Reservoir wurden dem Gemisch aus Protein- und Reservoirlösung durch Diffusion über die Gasphase Wassermoleküle entzogen. Die Proteinlösung wurde dadurch so lange konzentriert, bis sich die Konzentration des Präzipitanten in der Proteinlösung mit der in der Reservoirlösung angeglichen hatte (vergleiche Abb. 3-1). Die Übersättigung der Proteinlösung erfolgt so sehr langsam. Die für die Kristallbildung essentielle Keimbildung vollzieht sich in der übersättigten Proteinlösung, wobei diese Übersättigung möglichst langsam erfolgen sollte.

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung und Expression der extrazellulären Domäne des *myelin protein zero* (P0) in *Pichia pastoris*

Um strukturelle Analysen der extrazellulären Domäne des neuralen Zellerkennungsmoleküls P0 durchführen zu können, wird möglichst reines Protein in großen Mengen benötigt. Dafür sollte die extrazelluläre Domäne des murinen P0-Proteins in der Hefe *Pichia pastoris* als Fusionsprotein mit einem Myc- und einem sechsfachen Histidin-*Tag* exprimiert werden.

4.1.1 Klonierung der cDNA für die extrazelluläre Domäne des murinen P0-Proteins

Die Klonierung der cDNA für die extrazelluläre Domäne des murinen P0 in den pPICzαA-Vektor umfasste mehrere Schritte, die in einem Klonierungsschema (Abbildung 4-1) zusammengefasst dargestellt sind. Der erste Schritt umfasste das Umschreiben von mRNA durch reverse Transkription in cDNA. Die mRNA wurde aus dem Ischiasnerv isoliert und freundlicher Weise von Dr. Thomas Tilling (ZMNH, Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt.

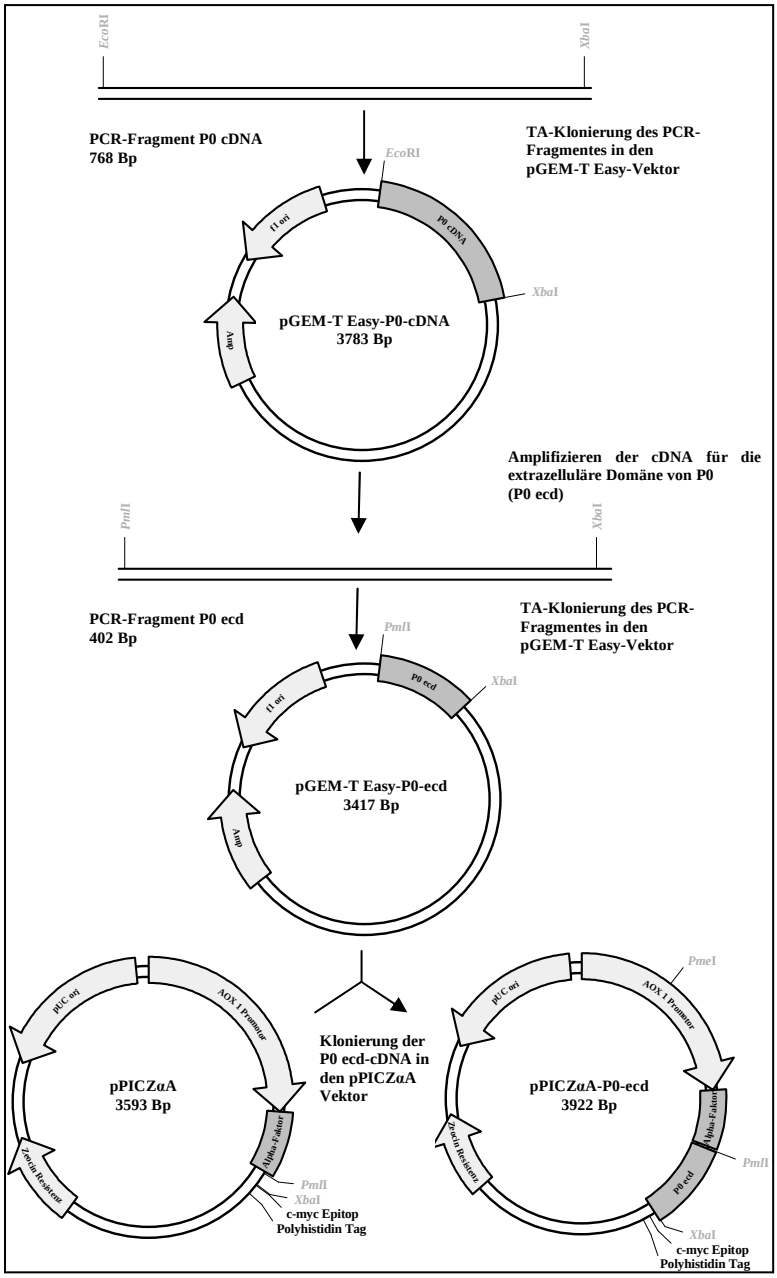


Abbildung 4-1. Schema der Klonierung der cDNA für die extrazelluläre Domäne des murinen P0-Proteins in den Expressionsvektor pPICZαA

Aus dieser cDNA wurde die kodierende Sequenz von P0 mit der Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert. Dazu wurden die Primer P0-cDNA-EcoRI-for und P0-cDNA-XbaI-rev verwendet (siehe Tab. 3-5), durch die vor dem Startcodon eine *EcoRI*- und nach dem Stopcodon eine *XbaI*-Schnittstelle eingefügt wurde (vgl. Abb. 4-1). Das PCR-Produkt wurde mittels TA-Klonierung in den pGEM-T EASY-Vektor kloniert und der Ligationsansatz in DH5α-Zellen tranformiert. Mittels Blau-Weiß-Selektion konnten vermeintlich positive Klone identifiziert werden. Aus diesen

Klonen wurde anschließend Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen *EcoRI* und *XbaI* überprüft. Der Restriktionsansatz wurde mit einem Größenmarker auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und positive Klone konnten dann, wie in Abbildung 4-2 beispielhaft zu sehen, an ihrem spezifischen Bandenmuster identifiziert werden.

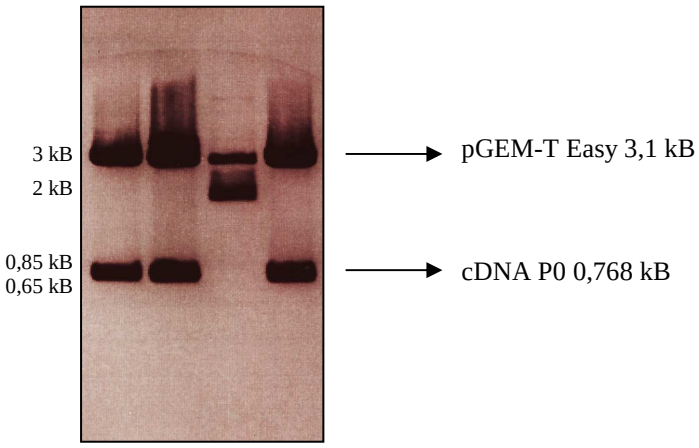


Abbildung 4-2. Restriktionsanalyse verschiedener pGEM-T EASY-P0-cDNA-Klone
Positive Klone zeigten zwei Banden: eine mit einer Größe von 3,1 kB für den linearisierten pGEM-T EASY-Vektor und eine mit einer Größe von 0,768 kB, die dem P0-PCR-Produkt entsprach. Zur Auftrennung wurde ein 1 % iges Agarosegel verwendet.

Ausgehend von diesem Konstrukt wurde die cDNA für die extrazelluläre Domäne von P0 (P0-ecd-cDNA) mit der *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert und die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *PmlI* und *XbaI* am 5´- bzw. 3`-Ende eingeführt. Dazu wurden die Primer P0-extra-dom-PmlI-for und P0-extra-dom-XbaI-rev verwendet (siehe Tab. 3-5). Das PCR-Produkt wurde anschließend ebenfalls in den pGEM-T EASY-Vektor kloniert. Die P0-ecd-cDNA wurde über die eingeführten Restriktionsstellen in den pPICZαA- *E. coli / Pichia pastoris-Shuttle*-Vektor kloniert. Alle für *Pichia pastoris* entwickelten Expressionsvektoren wurden als *E. coli / Pichia pastoris-Shuttle*-Vektoren konstruiert, d. h., die Vektoren sind zur Transformation beider Organismen geeignet. Sie enthalten einen Replikationsstartpunkt für *E. coli* und verschiedene Selektionsmarkergene für beiderlei Organismen. Zur Expression heterologer Proteine dient ein ca. 900 Basen großer DNA-Abschnitt, der aus der 5‘-Promotorregion des Alkoholoxidase1 (*AOX1*)-Gens, aus der Transkriptionsterminationssequenz desselben Gens und einem dazwischen liegenden Polylinker besteht (Cregg et al., 2000). Der Ligationsansatz

wurde in *E. coli*-DH5α-Zellen transfomiert und die durch den pPICzαA-Vektor vermittelte Zeocinresistenz zur Selektion verwendet. Aus Zeocin-resistenten Klonen wurde das Plasmid isoliert und durch einen Restriktionsverdau mit *PmlI* und *XbaI* überprüft.

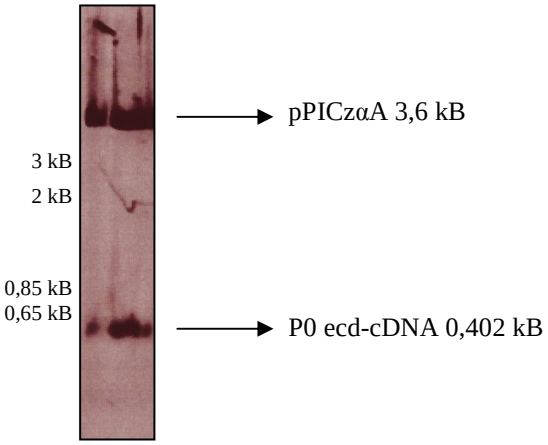


Abbildung 4-3. Restriktionsanalyse des pPICzA-P0-ecd-Plasmids
Die Bande mit einem Molekulargewicht von 3,6 kB entspricht dem linearen pPICZαA-Vektor. Die zweite Bande mit einem Molekulargewicht von 0,4 kB entspricht der P0-ecd-cDNA. Zur Auftrennung wurde ein 1 % iges Agarosegel verwendet.

Der laut Restriktionsanalyse positive Klon wurde anschließend einer DNA-Sequenzanalyse unterworfen. Diese zeigte, dass es sich um einen positiven Klon ohne Mutationen handelte. Er wurde daher für die Transformation von *Pichia pastoris* verwendet.

4.1.2 Transformation und Expression der extrazellulären Domäne des murinen P0-Proteins in *Pichia pastoris*

Zur Transformation des pPICZαA-P0-ecd-Expressionskonstruktes in die Hefe wurde das Plasmid mit *PmeI* linearisiert. *PmeI* schneidet im Promotorbereich und ermöglicht so die homologe Rekombination im AOX1-Promotor des Hefegenoms. Das linearisierte Plasmid wurde in zwei *Pichia pastoris*-Stämme transformiert. Dabei handelt es sich einerseits um den proteasedefizienten Stamm SMD1168 und andererseits um den Wildtyp-Stamm X-33. Die Integration ins Genom der Hefe wurde mit einer *Colony*-PCR bestätigt (Primer AOX 5´ und AOX 3´, siehe Tab. 3-5).

Drei Klone, die in der PCR als positiv identifiziert werden konnten, wurden in einem kleinen Maßstab (5 ml) angezogen und auf Expression des rekombinanten P0-Proteins getestet. Dazu wurde der Kulturüberstand der Klone durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert (Abbildung 4-4).

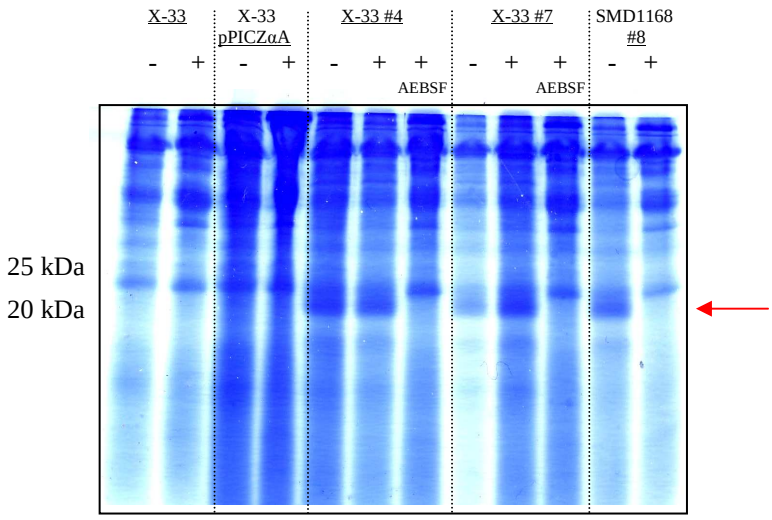


Abbildung 4-4. Nachweis der Expression des P0-ecd-Myc-His-Fusionsproteins in verschiedenen *Pichia pastoris*-Klonen: SDS-PAGE

Der Kulturüberstand verschiedener *Pichia pastoris*-Klone wurde durch Elektrophorese in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert, das mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt wurde. Die Höhe der vermutlich dem P0-Fusionsprotein zuzuordnenden Banden ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet. +: Proteinexpression wurde durch Zugabe von Methanol induziert; -: Nicht Induzierte Negativkontrolle; AEBSF: Zugabe von 40 µmol AEBSF, eines Serinproteasen-Inhibitors

In Proben aus den Kulturüberständen beider X-33-Klone war 24 h nach der Induktion der Proteinexpression mit Methanol eine zusätzliche Proteinbande mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 25 kDa sichtbar. Auch beim SMD1168-Klon war diese Proteinbande nach der Induktion zu beobachten. Rechnerisch beträgt das Molekulargewicht der extrazellulären Domäne von P0 16,1 kDa. Da sie als glykosyliertes Fusionsprotein exprimiert wurde, ist ein Molekulargewicht von 20-25 kDa durchaus anzunehmen. Zusätzlich wurden die Kulturüberstände mit Hilfe eines *Western Blots* analysiert (Abb. 4-5). Hierfür wurden Antikörper gegen den sechsfachen Histidin-*Tag* und gegen P0 verwendet.

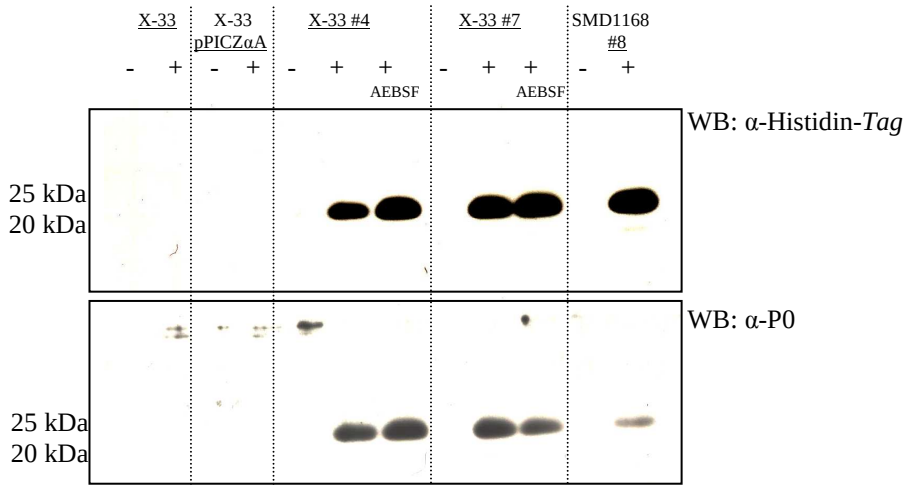


Abbildung 4-5. Nachweis der Expression des P0-ecd-Myc-His-Fusionsproteins in verschiedenen *Pichia pastoris*-Klonen: *Western Blot*

Proben aus dem Kulturüberstand verschiedener *Pichia pastoris*-Klone wurden mit Hilfe eines *Western Blots* analysiert. Dabei wurde das P0-ecd-Myc-His-Fusionsprotein sowohl mit einem polyklonalen α-Histidin-*Tag*-Antikörper als auch mit einem polyklonalen α-P0-Antikörper nachgewiesen. +: Proteinexpression wurde durch Zugabe von Methanol induziert; -: Nicht Induzierte Negativkontrolle; AEBSF: Zugabe von 40 µmol AEBSF, eines Serinproteasen-Inhibitors

Im *Western Blot* ließ sich das P0-ecd-Myc-His-Fusionsprotein sowohl mit dem α-Histidin-*Tag*-Antikörper als auch mit dem α-P0-Antikörper im Überstand aller drei Klone nachweisen. Um eine eventuelle Proteolyse des Fusionsproteins ausschließen zu können, wurde während der Induktion der Serinproteaseinhibitor AEBSF hinzugegeben. AEBSF inhibiert Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein und Thrombin. Aufgrund seiner relativ niedrigen Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen kann dieser Inhibitor bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in *Pichia pastoris* eingesetzt werden. (Lunn und Sansone, 1994; Markwardt et al., 1982). Wie in Abbildung 4-5 zu erkennen, ist die Proteinbande des Klons X-33 #4 nach der Zugabe von AEBSF etwas „dicker“. Anscheinend findet in Abwesenheit des Proteaseinhibitors eine geringe Proteolyse des P0-Proteins statt. Keinen Effekt hatte die Zugabe von AEBSF auf die produzierte P0-Menge des Klons X-33 #7. Dort war keine Abnahme in Abwesenheit des Proteaseinhibitors zu beobachten.

4.1.3 Bestimmung des Phänotyps verschiedener transformierter *Pichia pastoris*-Klone

Nach der Transformation des pPICZαA-P0-ecd-Vektors in die Hefe erhielt man Klone, die sich in ihrer Fähigkeit unterschieden, Methanol zu metabolisieren. Diese Fähigkeit ist abhängig vom Integrationsort der Expressionskassette. Es wird zwischen verschiedenen Phänotypen, den Mut-Phänotypen (Mut: *methanol utilization*), unterschieden. Mut^{+}-Stämme wachsen sehr gut auf Methanol, Mut^{s}-Stämme (s: *slow*) hingegen zeigen ein deutlich langsameres Wachstum auf Methanol. Für beide Phänotypen gibt es verschiedene Protokolle zur Expression rekombinanter Proteine. Für eine optimale Proteinausbeute ist es also wichtig, den Mut-Phänotyp eines *Pichia pastoris*-Klons zu bestimmen. Alle Klone, die in dieser Doktorarbeit verwendet wurden, hatten den Mut^{s}-Phänotyp. Beim Mut^{s}-Stamm wurde das Gen der Alkoholoxidase 1 (*AOX1*) durch die Integration der Expressionskassette zerstört, wodurch dieser Mutante nur die schwächer exprimierte Alkoholoxidase 2 (*AOX2*) zur Verfügung steht. Dies erklärt auch das vergleichsweise langsamere Wachstum auf Methanol.

Die Herstellung rekombinanter Klone und die Identifizierung des optimalen Expressionsstammes sind die wohl kritischsten Punkte für eine erfolgreiche Expression in *Pichia pastori*s. Aus diesem Grunde wurden zwei unterschiedliche Hefestämme verwendet. Klonale Variationen sind ausgeprägt, und um einen guten Expressionsstamm zu identifizieren, wurde eine Vielzahl von Klonen analysiert. In diesem Fall wurde der Klon #4 des Wildtyp-Hefestammes X-33 für die weiteren Versuche ausgewählt. Dieser Klon wies im Schüttelkolben eine reproduzierbare und relativ stabile Expressionsrate des rekombinanten P0 auf.

4.2 Aufreinigung der extrazellulären Domäne des murinen P0-Proteins aus *Pichia pastoris*

Die extrazelluläre Domäne von P0 wurde als Fusionsprotein mit einem Myc- und einem sechsfachen Histidin-*Tag* exprimiert und sollte mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose aus dem Kulturüberstand aufgereinigt werden. Dazu wurde der Klon X-33 #4 in 50 ml BMGY angezogen und in BMMY-Medium induziert. Das P0 wurde aus dem Kulturüberstand über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt und anschließend für die weiteren Analysen mit einem *Vivaspin concentrator* (*cut-off* 5 kDa) aufkonzentriert und umgepuffert. Die erfolgreiche Aufreinigung ist in Abb. 4-6 dokumentiert.

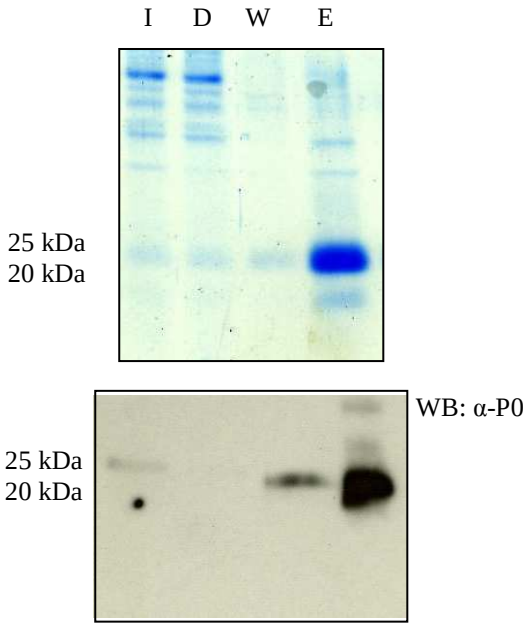


Abbildung 4-6. Analyse der Aufreinigung des P0-ecd-Myc-His-Fusionsproteins mittels SDS-PAGE und *Western Blot*

Das P0-Fusionsprotein wurde über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden dann mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung sowie mit Hilfe eines *Western Blots* analysiert. P0 wurde mit einem polyklonalen α-P0-Antikörper nachgewiesen.

I: Hefekulturüberstand (*Input*) P0; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Elution

Die Gesamtproteinkonzentration wurde vor und nach der Reinigung mit einem BCA-Test bestimmt (vergleiche 3.4.7). So konnten aus einem Liter Überstand aus dem Schüttelkolben 1 mg P0-ecd-Myc-His-Fusionsprotein aufgereinigt werden.

4.3. Charakterisierung der in *Pichia pastoris* exprimierten extrazellulären Domäne des P0-Proteins

4.3.1 Deglykosylierung mit N-Glycosidase F

Proteine, die von *Pichia pastoris* in den Überstand sezerniert werden, werden in der Regel glykosyliert. N-Glykosylierungen finden innerhalb der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr statt, wobei die Oligosaccharidketten nur aus Mannoseeinheiten bestehen. *Pichia pastoris* neigt nicht so stark zur Hyperglykosylierung von Proteinen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Bretthauer und Castellino, 1999; Grinna und Tschopp, 1989). Um zu überprüfen, ob die in *Pichia pastoris* exprimierte extrazelluläre Domäne von P0 glykosyliert und womöglich hyperglykosyliert war, wurde das aufgereinigte Protein mit N-Glycosidase F inkubiert. N-Glykosidase F spaltet alle Typen von Asparagin-gebundenen N-Glykanen, vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in Peptidbindung vorliegen (Tarentino, 1985).

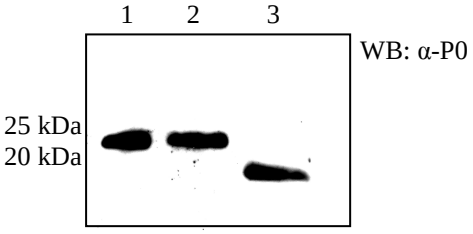


Abbildung 4-7. Deglykosylierung des P0-ecd-Myc-His-Fusionsproteins mit N-Glykosidase F

Mittels *Western Blot* wurde die Deglykosylierung des P0 analysiert und mit einem polyklonalen α-P0-Antikörper nachgewiesen.

1: *Input*, P0; 2: P0, mit Inkubationspuffer; 3: P0, mit Inkubationspuffer und N-Glycosidase F

Wie in Abbildung 4-7 zu erkennen, verursachte die N-Glykosidase F-Behandlung eine Verschiebung der P0-spezifischen Bande zu einem geringeren Molekulargewicht. Diese Verschiebung ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass N-Glykane vom P0-Fusionsprotein abgespalten wurden. Somit wird P0-ecd-Myc-His von *Pichia pastoris* in N-glykosylierter Form exprimiert. Da die Veränderung des Molekulargewichtes nicht sehr groß war (ca. 5 kDa), kann davon ausgegangen werden, dass das P0 nicht hyperglykosyliert wurde. Bei einer Hyperglykosylierung wäre ein MW-Unterschied zwischen 100-200 kDa zu erwarten gewesen.

4.3.2 Analyse der in *Pichia pastoris* exprimierten extrazellulären Domäne des P0-Proteins mit 1D NMR-Spektroskopie

Die aufgereinigte extrazelluläre Domäne von P0 wurde von Dr. Thorsten Biet am *Institute of Chemistry* der Universität Lübeck mittels 1D NMR-Spektroskopie analysiert. Auch in der Auswertung der NMR-Spektren war zu erkennen, dass das in *Pichia pastoris* exprimierte P0 als Glykoprotein vorliegt. In der Abbildung 4-8 sind zwischen 5 und 6 ppm anomere Strukturen erkennbar, die der Zuckerkette entsprechen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Mannose. Diese Aussage kann aber nicht abschließend getroffen werden.

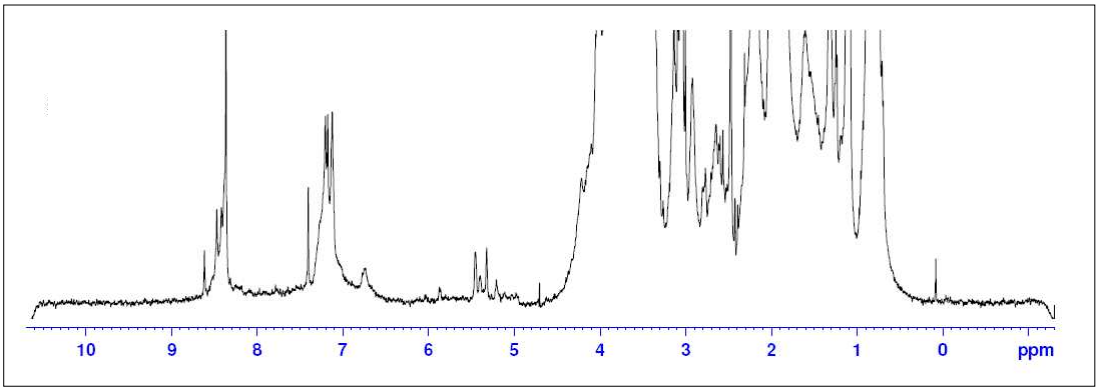


Abbildung 4-8. Eindimensionales Protonenspektrum (1D-1H-Spektrum) der in *Pichia pastoris* exprimierten extrazellulären Domäne von P0

Das aufgereinigte P0-ecd-Myc-His-Fusionsprotein wurde für die NMR-Analyse extensiv dialysiert, anschließend lyophilisiert und in D_2O aufgenommen.

4.3.3 Charakterisierung der aufgereinigten extrazellulären Domäne des P0-Proteins mittels Dynamischer Laserlichtstreuung

Für die Proteinkristallisation ist es wichtig, dass das aufgereinigte, zu kristallisierende Protein in monodisperser Form vorliegt, d. h., dass keine Aggregate die Probe verunreinigen dürfen. Um zu untersuchen, ob das aufgereinigte P0 in monodisperser Form vorliegt und ob es für eine Kristallisation geeignet ist, wurde eine DLS (dynamic light scattering)-Messung in Zusammenarbeit mit Dr. Lars Redecke am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg durchgeführt.

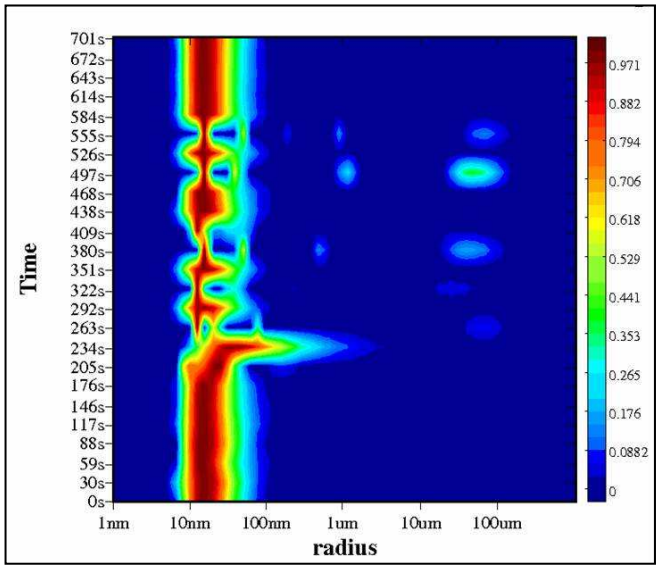


Abbildung 4-9. Messung der Dynamischen Laserlichtstreuung (DLS)
Eine Lösung des aufgereinigten P0-ecd-Myc-His-Fusionsproteins wurde mittels DLS auf das Vorhandensein von Aggregaten überprüft. Im Diagramm sind der hydrodynamische Radius (X-Achse) und die Signalintensität (Z-Achse, durch Farbkodierung sichtbar gemacht) über die Zeit (Y-Achse) aufgetragen.

In Abbildung 4-9 wurde der hydrodynamische Radius der Moleküle (X-Achse) in Abhängigkeit vom Zeitpunkt während der Messung (Y-Achse) aufgetragen. Die mittels Farbkodierung sichtbar gemachte Signalintensität ist proportional zur Anzahl der Moleküle, die zu einem bestimmten Zeitpunkt einen bestimmten hydrodynamischen Radius aufweisen. Eine rote Färbung entspricht einer besonders hohen Anzahl von Molekülen. An der fast durchgehenden roten Linie bei einem

hydrodynamischen Radius von 10 - 20 nm ist zu erkennen, dass der größte Teil der Moleküle, also das P0-ecd-Myc-His-Fusionsprotein in Lösung, überwiegend in monodiperser Form vorliegt. Die in *E. coli* exprimierte und kristallisierte extrazelluläre Domäne des P0 hatte einen hydrodynamischen Radius von 7 nm (Shapiro et al., 1996). Es sind wenige Aggregate mit einem hydrodynamischen Radius zwischen 10 und 100 µm zu erkennen. Das aufgereinigte P0-ecd-Myc-His-Fusionsprotein konnte also für einen *Screen* verschiedener Kristallisationsbedingungen eingesetzt werden.

4.4 Kristallisation der extrazellulären Domäne des P0-Proteins

Der *Screen* von 480 verschiedenen Fällungsbedingungen wurde am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) im Laboratorium für Strukturbiologie von Infektion und Entzündung in Zusammenarbeit mit Dr. Markus Perbandt durchgeführt. Mit einem Roboter Honeybee 961 (Genomic Solutions) wurden die Kristallisationsansätze für klassische Dampfdiffusionsexperimente im Nanolitermaßstab pipettiert (vergleiche 3.6.2). Für den *Screen* wurden 3,2 mg P0-ecd-Myc-His-Fusionsprotein eingesetzt. Die Lösung hatte eine Konzentration von 16 mg/ml. Keine der 480 Bedingungen lieferte bei dieser Proteinkonzentration einen Kristall. Die in *E. coli* exprimierte extrazelluläre Domäne von P0 war bereits in einer früheren Studie kristallisiert worden (Shapiro et al., 1996). Shapiro et al. hatten das aufgereinigte Protein in einer Konzentration von 45 mg/ml für die Kristallisation eingesetzt. Derart große Mengen P0 können nur schwer im 1-Liter-Maßstab produziert werden. Deshalb wurde von unserem Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe von Prof. Dübel (*Department of Biotechnology*, TU Braunschweig), eine Fermentation des *Pichia pastoris*-Klons X-33 #4 in einem 35 l-Fermenter durchgeführt, um größere Mengen an P0-ecd-Myc-His-Fusionsprotein zu erhalten. Aus dem gesamten Fermentationsüberstand konnten jedoch nur 0,69 mg Fusionsprotein aufgereinigt werden. Der mit einer DLS-Messung bestimmte hydrodynamische Radius lag bei ca. 30 nm (Daten nicht gezeigt). Da dieser größere hydrodynamische Radius wahrscheinlich auf Aggregatbildung durch das P0-Fusionsprotein zurüchzuführen war, konnte es nicht für einen Kristallisations-*Screen*

eingesetzt werden. Für einen neuen *Screen* verschiedener Kristallisationsbedigungen mit einer höheren Proteinkonzentration wurden verschiedene Proteinchargen aus Produktionen im 1 l-Maßstab vereinigt. Alle Chargen wurden mittels DLS-Messung analysiert.

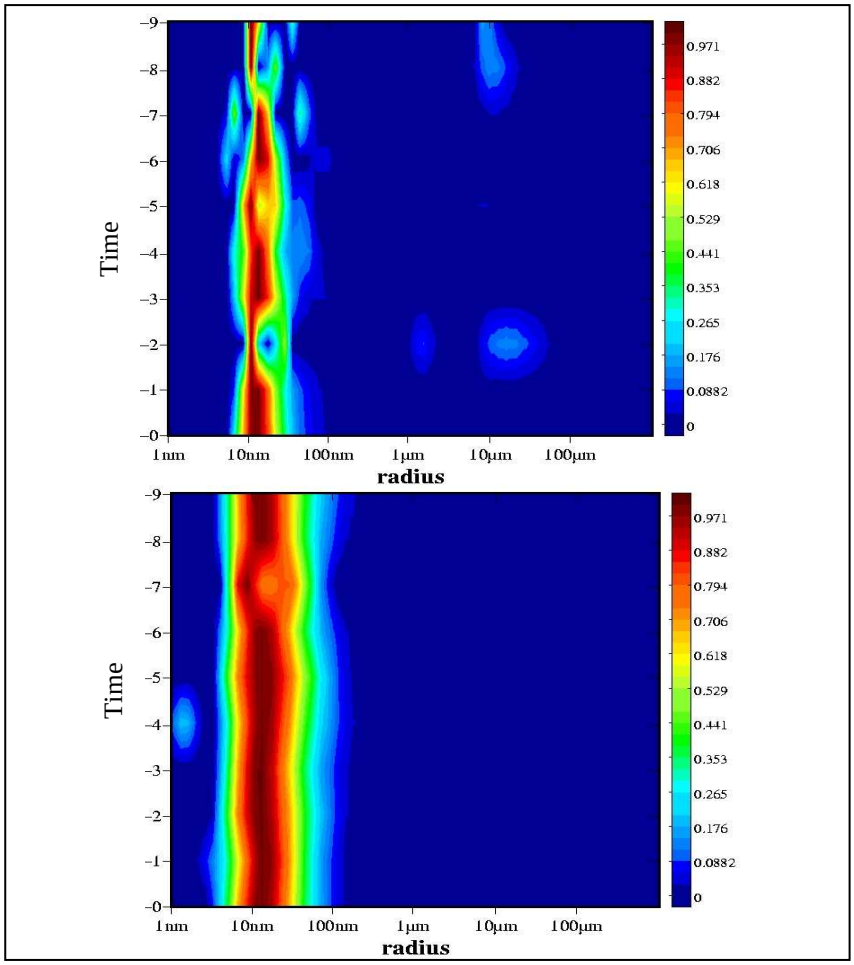


Abbildung 4-10. Messung der Dynamischen Laserlichtstreuung (DLS) verschiedener P0-Proteinchargen

Zwei Lösungen des aufgereinigten P0-ecd-Myc-His-Fusionsproteins wurde mittels DLS auf das Vorhandensein von Aggregaten überprüft. Im Diagramm sind der hydrodynamische Radius (X-Achse) und die Signalintensität (Z-Achse, durch Farbkodierung sichtbar gemacht) über die Zeit (Y-Achse) aufgetragen.

Wie in Abbildung 4-10 zu erkennen, lagen die Proben überwiegend in monodisperser Form vor und hatten einen hydrodynamischen Radius von ca. 10 nm und. Für den *Screen* von 288 Kristallisationsbedigungen wurden 2,2 mg P0-ecd-Myc-His-Fusionsprotein eingesetzt. Die Lösung hatte eine Konzentration von 22 mg/ml. Zum

Zeitpunkt der Fertigstellung der Dissertation konnte noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Kristallisation erfolgreich war.

4.5 Expression der extrazellulären Domäne der Ile106Leu-Mutante des P0-Proteins in *Pichia pastoris*

Das Zellerkennungsmolekül P0 stabilisiert durch homophile Interaktion der extrazellulären Domäne die *intraperiod line* des kompakten Myelins. Mutationen im P0-Gen sind eine der möglichen genetischen Ursachen für die Charcot-Marie-Tooth´sche Erkrankung (CMT). Bei der P0sub-Mutation im für die extrazelluläre Domäne kodierenden Bereich ist an einer Stelle die Base Adenin gegen Thymin ausgetauscht. Das hat den Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Leucin (Ile106Leu) an Position 106 zur Folge (Rünker et al., 2004). Im Menschen führt die P0sub-Mutation zu dem schweren HMSN Typ 1 mit einer frühen Manifestation der Krankheit (Gabreëls-Festen et al., 1996). Um zu untersuchen, ob diese Mutation einen Einfluss auf die Struktur der extrazellulären Domäne von P0 hat, sollte analog zu P0-ecd-Myc-His ein rekombinantes Fusionsprotein der Ile106Leu-Mutante in *Pichia pastoris* exprimiert werden, und das gereinigte Protein für die Röntgenstrukturanalyse kristallisiert werden.

4.5.1 In-vitro-Mutagenese und Klonierung der cDNA für die extrazelluläre Domäne des murinen P0-Ile106Leu-Proteins

Zur Herstellung eines rekombinanten P0-Ile106Leu-Proteins wurde die Mutation Ile106Leu mit Hilfe einer gerichteten Mutagenese in das vorhandene pPICZαA-P0-ecd-Plasmid (siehe 4.1.1, Abb. 4-1) eingeführt. Dazu wurden die Primer P0-mut-for und P0-mut-rev verwendet (siehe Tab. 3-5). Die mutierte P0-ecd wurde in einen neuen pPICZαA-Vektor kloniert, um auszuschließen, dass durch die PCR eine zufällige Mutation in den Vektor eingeführt wurde. Das resultierende Plasmid wurde als pPICZαA-P0-ecd-mut bezeichnet.

4.5.2 Transformation und Expression der extrazellulären Domäne des murinen P0-Ile106Leu-Proteins in *Pichia pastoris*

Das pPICZαA-P0-ecd-mut-Plasmid wurde für die Transformation mit dem Enzym *PmeI* linearisiert und in die beiden *Pichia pastoris*-Stämme SMD1168 und X-33 transformiert. 50 Klone wurden auf die Expression der mutierten extrazellulären Domäne des P0-Proteins hin analysiert. Dazu wurden sie in 5 ml BMGY-Medium angezogen und induziert. Der Kulturüberstand wurde dann mittels *Western Blot* analysiert. Bei 5 Klonen konnte eine Expression der mutierten extrazellulären Domäne im Hefekulturüberstand nachgewiesen werden. Der Klon #1 des proteasedefizienten Hefestammes SMD1168 wurde für die weiteren Versuche ausgewählt. Dieser Klon wies im Schüttelkolben eine reproduzierbare und relativ stabile Expressionsrate des rekombinanten P0-Ile106Leu-Fusionsproteins auf.

4.6 Aufreinigung der in *Pichia pastoris* exprimierten extrazellulären Domäne des murinen P0-Ile106Leu-Proteins

Auch die Ile106Leu-Mutante der extrazellulären Domäne des P0-Proteins wurde als Fusionsprotein mit einem Myc- und einem sechsfachen Histidin-*Tag* exprimiert. Das Fusionsprotein konnte ebenfalls mit Hilfe von Ni-NTA-*Beads* aus dem Kulturüberstand aufgereinigt werden.

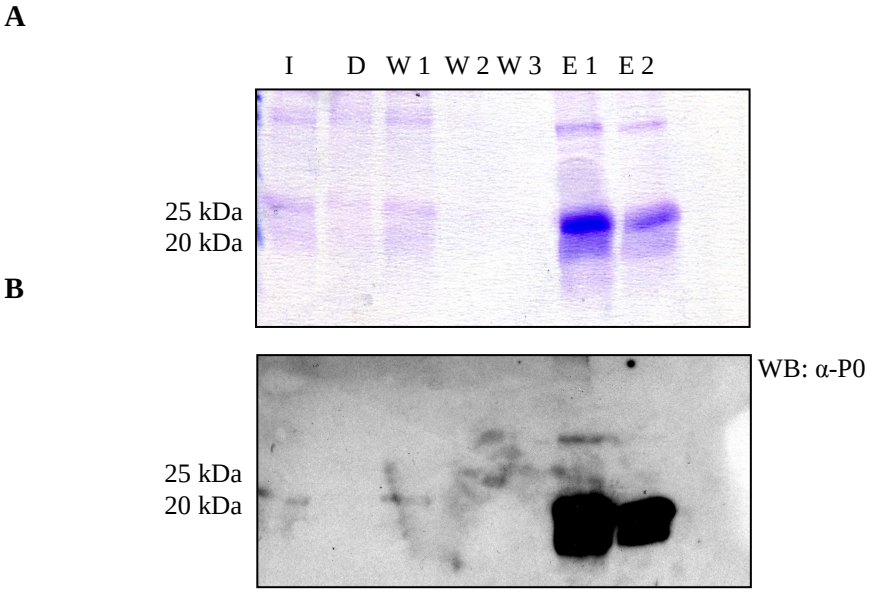


Abbildung 4-11. Analyse der Reinigung des P0-ecd-Ile106Leu-Myc-His-Fusionsproteins mittels SDS-PAGE (A) und *Western Blot* (B)

Das mutierte P0-Fusionsprotein wurde über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Die einzelnen Reinigungsschritte wurden dann mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (**A**) und *Western Blot* (**B**) analysiert. Das mutierte P0 wurde mit einem polyklonalen α-P0-Antikörper nachgewiesen.

I: Hefekulturüberstand (*Input*) P0-Mutante; D: Durchlauf W 1: Waschfraktion 1; W 2: Waschfraktion 2; W 3: Waschfraktion 3 E 1: Elution 1; E 2: Elution 2

Wie in Abbildung 4-11 zu sehen, konnte auch die mutierte Form von P0 aus dem Hefekulturüberstand aufgereinigt werden. Die Gesamtproteinkonzentration wurde vor und nach der Reinigung mit einem BCA-Test bestimmt (vergleiche 3.4.7). So konnten aus einem Liter Überstand aus dem Schüttelkolben 1 mg P0-Ile106Leu-Fusionsproteins aufgereinigt werden. Da für einen Kristallisationsansatz größere Mengen benötigt wurden, führte unser Kooperationspartner, die Arbeitsgruppe von Prof. Dübel (*Department of Biotechnology*, TU Braunschweig), wieder eine Fermentation im 35 l-Maßstab durch. Für die Aufreinigung des P0-Ile106Leu-Proteins aus dem Fermentationsüberstand musste der Überstand zunächst dialysiert werden. Ohne vorherige Dialyse war keine Bindung des Fusionsproteins an die Ni-NTA-Säule zu beobachten.

4.7 Kristallisation der extrazellulären Domäne des murinen P0-Ile106Leu-Proteins

Für die Kristallisation wurde zunächst rekombinantes Protein aus 5 l Fermentationsüberstand mit Hilfe von Ni-NTA-*Beads* aufgereinigt. Am Ende der Aufreinigung betrug die Ausbeute an P0-Ile106Leu 2,2 mg. Da die Proteinkonzentration der Lösung mit 2,2 mg/ml zu gering war, wurde die Proteinlösung mit einem *Vivaspin concentrator* (*cut-off* 5 kDa) aufkonzentriert. Nach dem Aufkonzentrieren konnte ein Niederschlag, wahrscheinlich von ausgefallenem Protein, beobachtet werden. Für einen *Screen* verschiedener Kristallisationsbedingungen wurden dann 330 µg P0-Ile106Leu-Protein mit einer Konzentration von 6,6 mg/ml eingesetzt.

Von dem Ansetzen des *Screens* verschiedener Kristallisationsbedigungen wurde eine DLS-Messung durchgeführt.

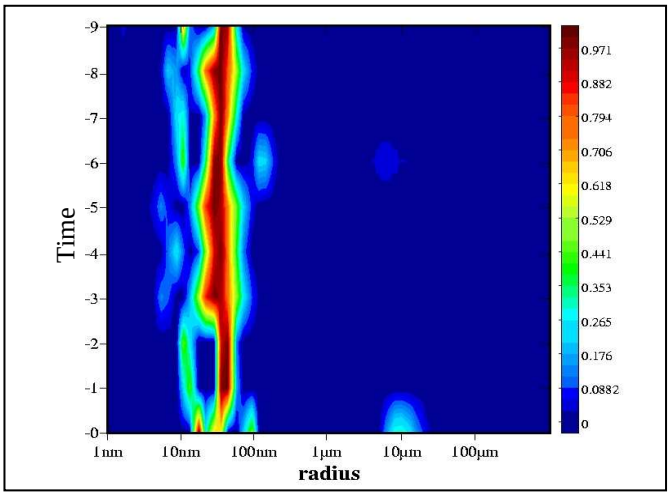


Abbildung 4-12. Messung der Dynamischen Laserlichtstreuung (DLS) des P0-Ile106Leu-Proteins

Eine Lösung des aufgereinigten P0-Ile106Leu-Proteins wurde mittels DLS auf das Vorhandensein von Aggregaten überprüft. Im Diagramm sind der hydrodynamische Radius (X-Achse) und die Signalintensität (Z-Achse, durch Farbkodierung sichtbar gemacht) über die Zeit (Y-Achse) aufgetragen.

Die DLS-Messung des P0-Ile106Leu-Proteins zeigt, dass neben dem Monomer auch Aggregate vorhanden waren. Der hydrodynamische Radius des Monomers lag bei 13 nm, der der Aggregate bei ca. 30 nm. Da die vorhandenen Aggregate einen sehr ähnlichen hydrodynamischen Radius hatten, wurde trotz der nicht optimalen Bedingungen ein *Screen* verschiedener Kristallisationsbedigungen angesetzt. Bis zum Abschluss der Dissertation lag noch kein Ergebnis dieser Kristallisation vor.

4.8 Rekombinante Expression von P0 voller Länge in *Chinese hamster ovary* (CHO)-Zellen

Es ist nicht genau bekannt, wie einzelne Mutationen die Eigenschaften des P0-Proteins verändern und dann zur CMT1B-Erkrankung führen. Eine mögliche Ursache ist eine veränderte Oberflächenexpression von P0. Verantwortlich dafür könnte ein verringerter Transport des mutierten P0 an die Zelloberfläche sein, verbunden mit einem verstärkten Abbau des Proteins im Zytoplasma der Zelle. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte untersucht werden, ob die Mutation Ile106Leu in der extrazellulären Domäne des P0-Proteins zu einer, im Vergleich zum nicht-mutierten Protein, veränderten Oberflächenexpression führt.

4.8.1 Klonierung und In-vitro-Mutagenese des murinen P0-Proteins voller Länge

Dazu wurde die gesamte Wildtyp-P0-cDNA in den pcDNA3FLAG/HIS-Vektor, einen Expressionsvektor für Säugetierzellen, kloniert, wie in dem Klonierungsschema (vergleiche Abbildung 4-13) zusammenfassend dargestellt ist.

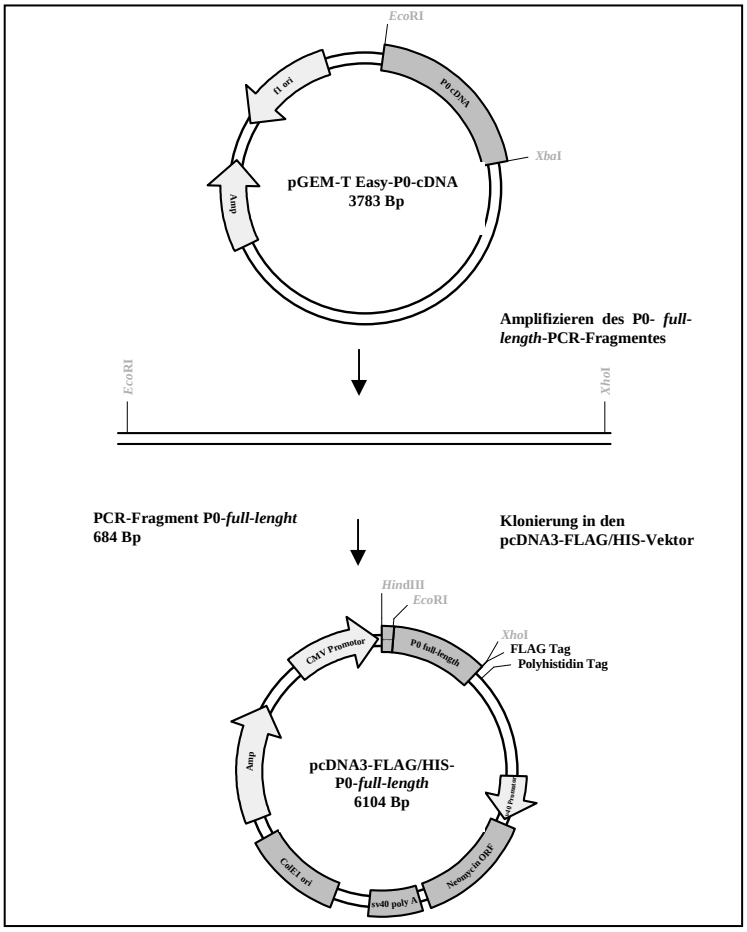


Abbildung 4-13. Schema der Klonierung der murinen P0-cDNA in den pcDNA3-FLAG/HIS-Vektor

Ausgehend von dem pGEM-T Easy-P0-cDNA-Vektor wurde die cDNA für die gesamte kodierende Sequenz des murinen P0-Proteins mit der *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert. Dazu wurden die Primer P0-cDNA-EcoRI-for und P0-cDNA-Xba-rev verwendet (siehe Tab. 3-5). Die Restriktionsstellen für die Enzyme *EcoRI* und *XhoI* wurden am 5´- bzw. 3`-Ende eingefügt. Das PCR-Produkt wurde anschließend direkt in den pcDNA3-FLAG/HIS-Vektor kloniert, wozu die eingefügten Restriktionsstellen verwendet werden konnten. Dieser Vektor enthielt bereits eine eukaryotische Signalsequenz für Membranproteine. Das resultierende Plasmid wurde als pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-wt bezeichnet (vergleiche Abb. 4-13). Anschließend wurde die Mutation Ile106Leu mit Hilfe einer gerichteten Mutagenese in dieses Plasmid eingeführt. Um sicher zu gehen, dass durch die Mutagenese keine Fehler in den Expressionsvektor eingefügt wurden, wurde die mutierte cDNA noch einmal in einen neuen pcDNA3-FLAG/HIS-Vektor kloniert. Das

Expressionsplasmid für die Ile106Leu-Mutante erhielt die Bezeichnung pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-mut.

4.8.2 Transfektion und Expression des wildtypischen P0-Proteins und der Ile106Leu-Mutante von P0 in CHO-Zellen

Sowohl das pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-wt-Plasmid als auch das pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-mut-Plasmid wurden in CHO-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und durch *Western Blot* auf die Expression des Wildtyp-P0-Proteins und des mutierten P0-Proteins hin überprüft.

4.8.3 Untersuchung der Oberfächenexpression des wildtypischen P0-Proteins und der Ile106Leu-Mutante von P0 in CHO-Zellen

Um zu untersuchen, ob sich die Oberflächenexpression von P0 in den CHO-Zellen durch die Ile106Leu-Mutation verändert, wurden sowohl das pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-wt-Plasmid als auch das pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-mut-Plasmid in CHO-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle diente eine Transfektion der Zellen mit dem leeren pcDNA3-FLAG/HIS-Expressionsvektor. Anschließend wurde eine Oberflächenbiotinylierung der transfizierten CHO-Zellen durchgeführt. Proteine, die an der Zelloberfläche exprimiert wurden, konnten dabei mit Biotin markiert werden und daraufhin mit Streptavidin-gekoppelten *Beads* aus dem gesamten Zelllysat isoliert werden. Nach der Elution konnten die Proteine dann in einem *Western Blot*–Experiment mit einem für P0 spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

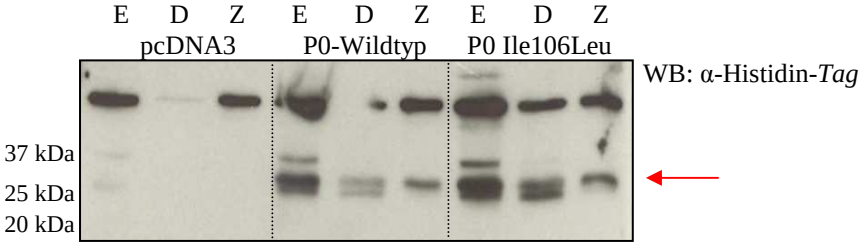


Abbildung 4-14. Oberflächenlokalisation von P0 und P0-Ile106Leu in transfizierten CHO-Zellen

Das Ergebnis der Oberflächenbiotinylierung ist anhand eines repräsentativen *Western Blots* dargestellt. CHO-Zellen wurden mit dem pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-wt-Vektor, dem pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-mut Vektor und dem pcDNA3-FLAG/HIS-Vektor (als Negativkontrolle, *mock transfection*) transfiziert. Anschließend wurde eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt und die einzelnen Fraktionen im *Western Blot* analysiert. P0 bzw. P0-Ile106Leu wurden mit einem polyklonalen α-P0-Antikörper nachgewiesen. Der Pfeil zeigt die aufgrund des Molekulargewichtes erwartete Lage einer P0-spezifischen Bande an.

E: Elution; D: Durchlauf; Z: Zelllysat

Sowohl das wildtypische P0 als auch die mutierte Form wurden von den CHO-Zellen exprimiert. Das von den CHO-Zellen exprimierte P0 hatte eine Größe von ca. 30 kDa, denn die diesem Molekulargewicht zuzuordnende Bande konnte nicht in den Negativkontrollspuren detektiert werden und ist somit P0-spezifisch (Abb. 4-14). Die Oberfächenbiotinylierung wurde in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Das Ergebnis der Auswertung ist in Abbildung 4-15 dargestellt.

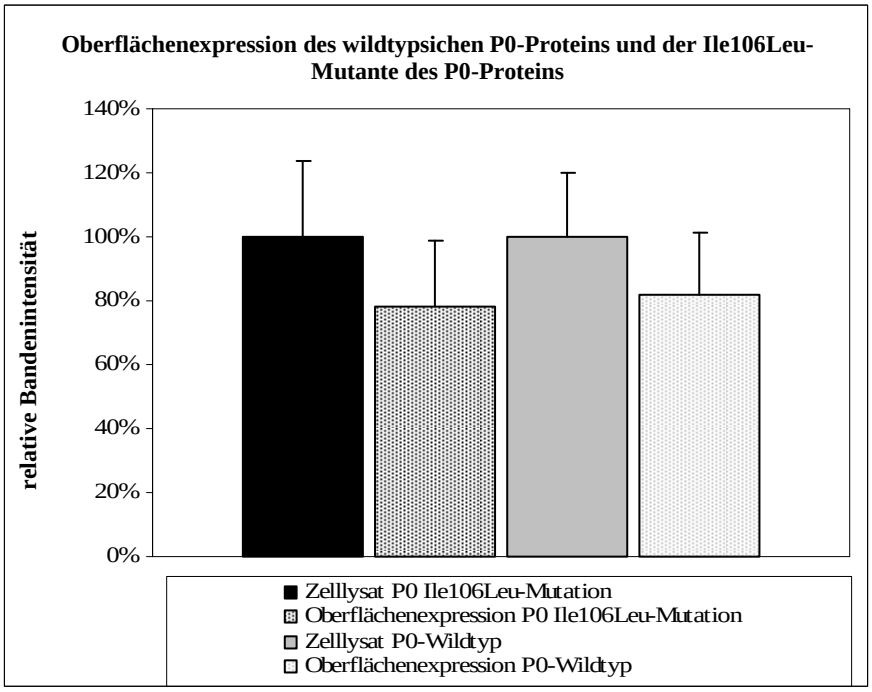


Abbildung 4-15. Vergleich der Oberflächenexpression des wildtypischen P0-Proteins und der Ile106Leu-Mutante von P0

In diesem Diagramm ist die Oberflächenexpression der Ile106Leu-Mutante von P0 und des wildtypischen P0-Proteins im Verhältnis zur Gesamtexpression des jeweiligen Proteins dargestellt. Die Expression im Zelllysat der transfizierten CHO-Zellen wurde auf 100 % festgesetzt. Da die Elutionsproben immer im korrekten Verhältnis zu den Zelllysatproben im *Western Blot* aufgetragen wurden, kann man die Bandenintensität der Proben des Zelllysates und der Oberflächenexpression tatsächlich miteinander vergleichen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Mittelwerte.

Die mittlere P0-Bandenintensität der Proben aus den jeweiligen Lysaten transfizierter CHO-Zellen wurde auf 100 % festgesetzt. Diese Proben enthielten sowohl biotinyliertes P0, das an der Zelloberfläche markiert wurde, als auch P0-Moleküle, die sich in der Zelle befanden und nicht mit Biotin markiert wurden. 82 % des wildtypischen P0 wurden auf der Zelloberfläche exprimiert. Auch die mutierte Form des P0-Proteins wurde zu 78 % auf der Zelloberfläche exprimiert.

4.9 Untersuchung des Einflusses der P0-Ile106Leu-Mutation auf die homophile Interaktion des P0-Proteins

Da die Ile106Leu-Mutation keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression des P0 in CHO-Zellen hatte, sollte nun der Einfluss der Ile106Leu-Mutation auf die Fähigkeit des P0-Proteins, homophil zu interagieren, untersucht werden. Dazu wurden nicht mutiertes murines P0 voller Länge und die Ile106Leu-Mutante von P0 transient in CHO-Zellen exprimiert. Als Positivkontrolle dienten CHO-Zellen, die das ebenfalls homophil interagierende Zelladhäsionsmolekül L1 transient exprimierten. Als Negativkontrolle dienten mit dem leeren pcDNA3-Vektor transfizierte Zellen. Zusätzlich wurden alle CHO-Zellen mit dem pcDNA3-EGFP-Vektor transfiziert. Diese Zellen exprimierten als Marker das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP). Dadurch konnte zwischen transfizierten (grün fluoreszierenden) und nicht-transfizierten Zellen unterschieden werden. Mit den transfizierten CHO-Zellen wurde anschließend ein Aggregations-*Assay* durchgeführt, wobei nur die grün fluoreszierenden Zellen in die Auswertung einbezogen wurden.

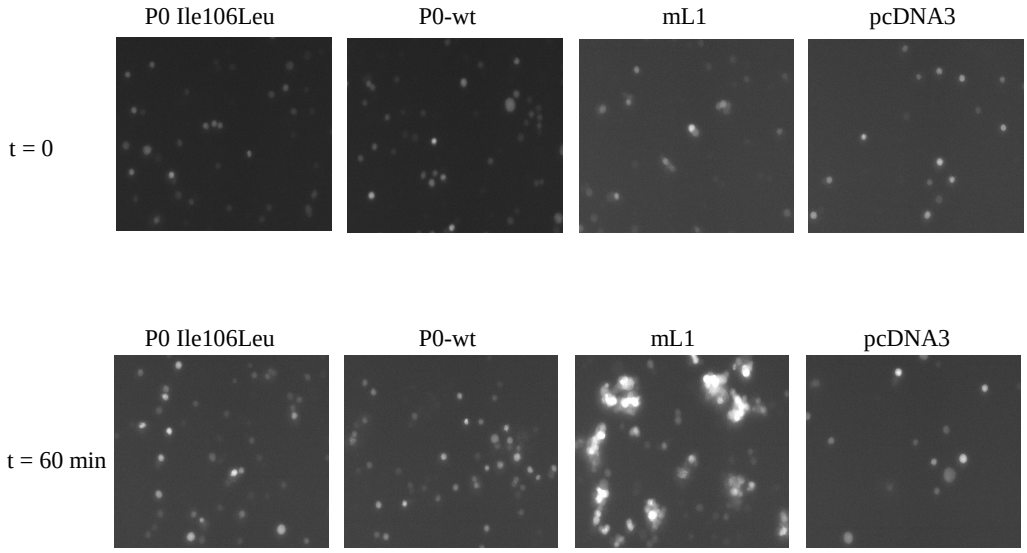


Abbildung 4-16. Aggregations-*Assay* mit transfizierten CHO-Zellen

In dieser Abbildung sind beispielhaft die Bilder eines Aggregations-*Assays* gezeigt. A: Transfizierte CHO-Zellen am Startpunkt des Experimentes (t = 0). B: Transfizierte CHO-Zellen nach 60 min.

Wie in der Abbildung 4-16 zu erkennen ist, zeigten die mit dem pcDNA3-mL1-Vektor (Expressionsvektor für murines L1) transfizierten CHO-Zellen, welche hier als Positivkontrolle dienten, zu Beginn des Experimentes kaum Aggregation. Nach 60 min war, wie erwartet, eine deutliche Aggregation zu erkennen. Neben wenigen kleinen Aggregaten, die aus 2-3 Zellen bestanden, waren auch viele große Aggregate mit mehr als 3 Zellen zu erkennen. Sowohl die kleinen als auch die großen Aggregate bestanden nur aus grün fluoreszierenden Zellen, also EGFP-exprimierenden Zellen. Es war davon auszugehen, dass diese Zellen auch L1 exprimierten. Die CHO-Zellen, die nur mit dem pcDNA3-Vektor transfiziert wurden und als Negativkontrolle dienten, zeigten sowohl zu Beginn des Versuchs als auch nach 60 min keine Aggregation. Die CHO-Zellen, die wildtypisches P0 exprimierten, zeigten am Startpunkt keine Aggregation; auch nach 60 min war nur eine leichte Aggregation zu erkennen. Die gebildeten Aggregate bestanden meist sowohl aus grün fluoreszierenden als auch aus nicht fluoreszierenden Zellen (hier nicht gezeigt). Die CHO-Zellen, die die Ile106Leu-Mutante von P0 exprimierten, verhielten sich ähnlich. Zu Beginn des Experimentes zeigten sie kaum Aggregation. Auch nach 60 min waren nur wenige Aggregate zu erkennen, die auch nur aus wenigen Zellen bestanden. Der Aggregations-Index (Lee et al., 2008) wurde bestimmt und ist in Abbildung 4-17 graphisch dargestellt (siehe 3.3.6).

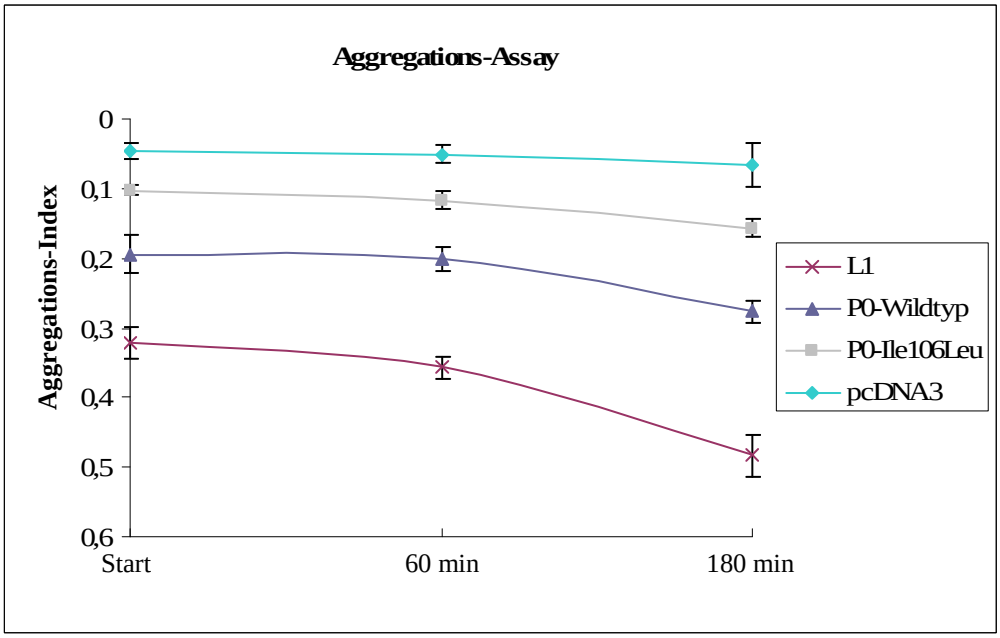


Abbildung 4-17. Aggregation von CHO-Zellen, die mit Expressionsplasmiden für P0, P0-Ile106Leu und L1 transfiziert wurden

In diesem Diagramm ist der Aggregations-Index (AI) der transfizierten CHO-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die Gesamtzahl der transfizierten Zellen und die Anzahl der Aggregate wurden ausgezählt und der AI bestimmt. Der AI lässt sich aus der Anzahl der Aggregate, dividiert durch die Anzahl der Zellen errechnen. Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der jeweiligen Mittelwerte.

In der Abbildung 4-17 ist gut erkennbar, dass die CHO-Zellen, die nur mit dem leeren pcDNA3-Vektor transfiziert wurden, die schwächste Aggregation und die L1-exprimierenden Zellen die stärkste Aggregation über einen Zeitraum von 180 min zeigten. Die Zellen, die die P0-Mutante Ile106Leu exprimierten, zeigten eine etwas geringere Aggregation als die, die wildtypisches P0 exprimierten. Dies deutet darauf hin, dass die Ile106Leu-Punktmutation die homophile P0-P0-Interaktion stört (vgl. 5.1.5).

4.10 Expression der extrazellulären Domäne von murinem L1 (mL1) in CHO-Zellen

Die extrazelluläre Domäne des L1-Proteins der Maus (murines L1, mL1) sollte für strukturelle Analysen in großen Mengen in CHO-Zellen exprimiert werden. Die extrazelluläre Domäne des murinen L1 hat ein Molekulargewicht von ca. 150-180 kDa. Derart große Proteine sind oft anfälliger für den Abbau durch Proteasen. Deshalb wurden CHO-Zellen ausgewählt, die sich in unserem Labor als gutes System für die Expression neuraler Zelladhäsionsmoleküle erwiesen hatten. Die extrazelluläre Domäne des mL1-Proteins (mL1-*extracellular domain*, mL1-ecd) sollte von den CHO-Zellen als Fusionsprotein mit dem humanen Fc-Fragment sezerniert werden, um später eine Reinigung über Protein A zu ermöglichen. Für spätere strukturelle Analysen, wie die Kristallisation, könnte sich ein so großer *Tag* wie Fc als störend erweisen, weshalb zwischen der L1-ecd und dem Fc-Fragment eine *Linker*-Sequenz mit Spaltstelle für die TEV-Protease eingeführt wurde. Dieser *Linker* ermöglicht die Abspaltung des Fc-Fragments nach der Reinigung.

4.10.1 Klonierung der cDNA für die extrazelluläre Domäne des mL1

Die Klonierung der cDNA für die extrazelluläre Domäne des mL1 und des TEV-Fc-Fragmentes in den pcDNA3-Expressionsvektor bestand aus mehreren Schritten, die schematisch in der Abbildung 4-18 dargestellt sind. Im ersten Schritt wurde die extrazelluläre Domäne des mL1 mit den Primern mL1-ecd-EcoRI-for und mL1-ecd-XbaI-rev (siehe Tab. 3-5) aus dem pEE14-mL1-Fc-Vektor (Chen et al., 1999) mit der *Pfu*-Polymerase amplifiziert, und so gleichzeitig die Schnittstellen für die Enzyme *EcoRI* und *XbaI* eingeführt. Das PCR-Produkt wurde mittels TA-Klonierung in den pGEM-T EASY-Vektor kloniert. Der Ligationsansatz wurde in DH5α-Zellen tranformiert. Mittels Blau-Weiß-Selektion konnten vermeintlich positive Klone identifiziert werden, aus denen anschließend Plasmid-DNA isoliert wurde und durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen *EcoRI* und *XbaI* überprüft wurde. Die Klone, die in der Restriktionsanalyse positiv waren, wurden einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen. Ein auch nach Sequenzanalyse positiver Klon wurde ausgewählt, und die

cDNA für die extrazelluläre Domäne von mL1 wurde mit den Enzymen *EcoRI* und *XbaI* aus dem pGEM-T Easy-Vektor ausgeschnitten. Der pcDNA3-Vektor wurde ebenfalls mit *EcoRI* und *XbaI* linearisiert, und mit der cDNA für die extrazelluläre Domäne des mL1 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in DH5α-Zellen transformiert und die durch den pcDNA3-Vektor vermittelte Ampicillinresistenz zur Selektion verwendet. Aus vermeintlich positiven Klonen wurde das Plasmid isoliert und durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XbaI* überprüft.

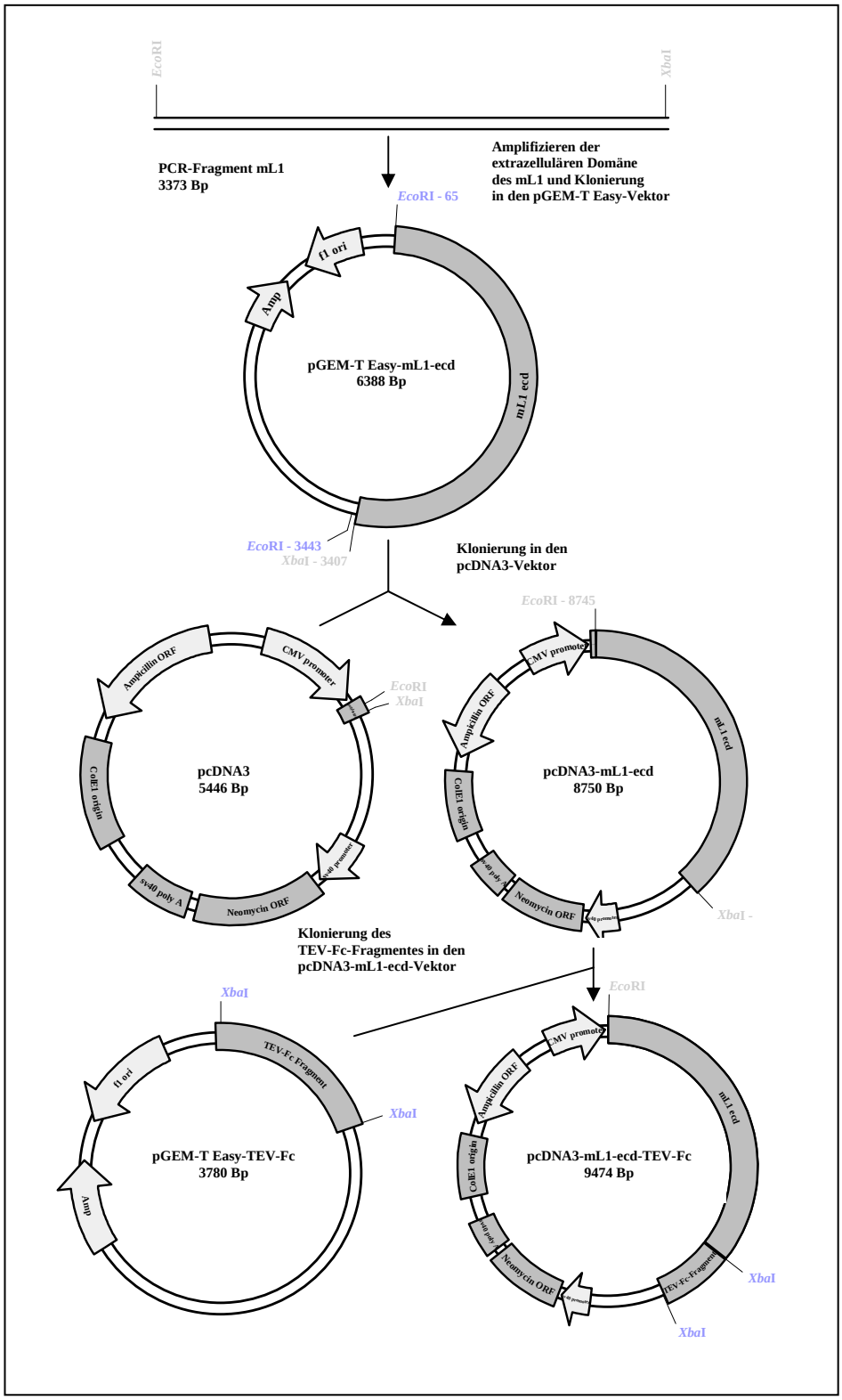


Abbildung 4-18. Schema der Klonierung der extrazellulären Domäne des mL1 und des TEV-Fc-Fragmentes in den pcDNA3-Vektor

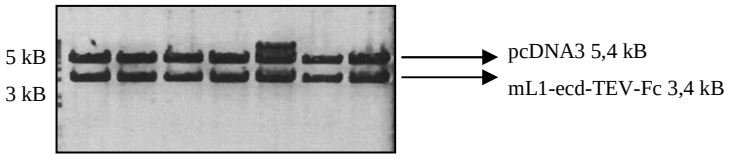


Abbildung 4-19. 1 %iges Agarosegel der Restriktionsanalyse verschiedener pcDNA3-mL1-ecd-TEV-Fc Klone

Postive Klone zeigten zwei Banden mit einem Molekulargewicht von 5,4 kB für den pcDNA3-Vektor. Die zweite Bande, die ein Molekulargewicht von 3,4 kB aufwies, entsprach der extrazellulären Domäne des mL1 mit dem TEV-Fc-Fragment.

Wie in Abbildung 4-19 gut zu erkennen ist, gab es mehrere Klone, die in der Restriktionsanalyse positiv waren. Diese positiven Klone wurden sequenziert und ein einwandfreier Klon wurde ausgewählt. Das TEV-Fc-Fragment wurde aus dem pGEM-T Easy-Vektor ausgeschnitten und über die Restriktionsstelle des Enzyms *XbaI* in den pcDNA3-mL1-ecd-Vektor eingebaut. Der Ligationsansatz wurde ebenfalls in DH5α-Zellen transfomiert und die durch den pcDNA3-Vektor vermittelte Ampicillinresistenz zur Selektion verwendet. Aus vermeintlich positiven Klonen wurde das Plasmid isoliert und durch einen Restriktionsverdau mit *XbaI* überprüft. Die vermeintlich positiven Klone wurden sequenziert und ein fehlerloser Klon wurde für die weiteren Experimente ausgewählt.

4.10.2 Transiente Transfektion und Expression des mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins in CHO-Zellen

Als erstes sollte überprüft werden, ob die extrazelluläre Domäne des murinen L1-Proteins als Fusionsprotein mit dem TEV-Fc-Fragment von den CHO-Zellen exprimiert und in das Medium sezerniert wird. Dazu wurde der pcDNA3-mL1-ecd-TEV-Fc-Vektor in CHO-Zellen transfiziert. Die Zellen und der Kulturüberstand wurden nach 48 h geerntet und mittels *Western Blot* auf die Expression des mL1-TEV-Fc-Proteins untersucht (Abb. 4-20).

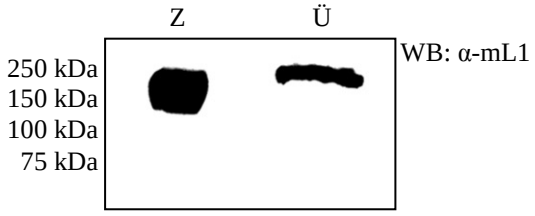


Abbildung 4-20. Expression von mL1-TEV-Fc: Analyse des Kulturüberstandes transient transfizierter CHO-Zellen

Z: Zelllysat; Ü: Kulturüberstand

Das Zelllysat und der Kulturüberstand der mit dem pcDNA3-mL1-ecd-TEV-Fc-Vektor transfizierten CHO-Zellen wurden mittels *Western Blot* analysiert. Das mL1-TEV-Fc konnte mit dem polyklonalen α-mL1-Antikörper detektiert werden.

Das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein wurde von den CHO-Zellen exprimiert. Das Fusionsprotein konnte sowohl im Zelllysat als auch im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Es wurde also, wie vorgesehen, von den CHO-Zellen sezerniert. Das Molekulargewicht des mL1-TEV-Fc-Proteins, das im Zelllysat detektiert wurde, war etwas niedriger als das des sezernierten Proteins.

4.10.3 Stabile Transfektion und Expression des mL1-TEV-Fc in CHO-Zellen

Nachdem nachgewiesen worden war, dass das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein von CHO-Zellen exprimiert und in den Überstand sezerniert wurde, sollte eine Zelllinie hergestellt werden, die das Protein stabil exprimiert. Die CHO-Zellen wurden, wie im Abschnitt 3.3.3 beschrieben, stabil mit dem pcDNA3-mL1-ecd-TEV-Fc-Vektor transfiziert. Der Kulturüberstand der daraus entstandenen Klone wurde durch einen *Western Blot* auf Anwesenheit von mL1-TEV-Fc überprüft.

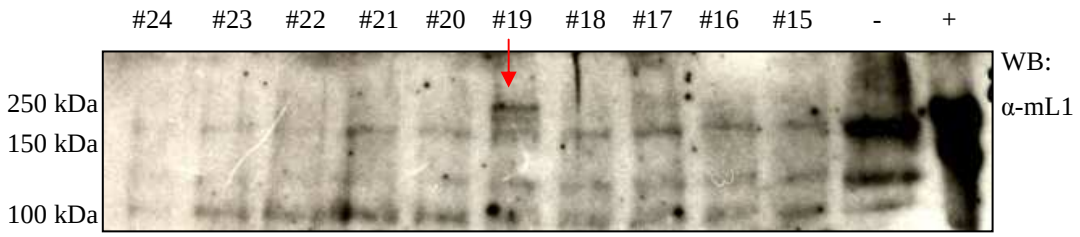


Abbildung 4-21. Expression von mL1-TEV-Fc: Analyse der Kulturüberstände stabil transfizierter CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden mit dem pcDNA3-mL1-TEV-Fc-Vektor stabil transfiziert. Die Kulturüberstände der Klone #15 - #24 wurden durch einen *Western Blot* analysiert. Das mL1-TEV-Fc wurde mit einem polyklonalen α-mL1-Antikörper nachgewiesen.

#24: CHO-mL1-TEV-Fc #24; #23: CHO-mL1-TEV-Fc #23; #22: CHO-mL1-TEV-Fc #22; #21: CHO-mL1-TEV-Fc #21; #20: CHO-mL1-TEV-Fc #20; #19: CHO-mL1-TEV-Fc #19; #18: CHO-mL1-TEV-Fc #18; #17: CHO-mL1-TEV-Fc#17; #16: CHO-mL1-TEV-Fc #16; #15: CHO-mL1-TEV-Fc #15; -:CHO-pcDNA3 (mit dem pcDNA3-Vektor transfizierte CHO-Zellen; Negativkontrolle); +: Gesamthirnhomogenat (Positivkontrolle)

Das mL1-TEV-Fc konnte nur im Überstand eines stabil transfizierten CHO-Klons nachgewiesen werden, wie in der Abbildung 4-21 zu erkennen ist. Nur im Kulturüberstand des Klons #19 (mit dem roten Pfeil markiert) konnte eine Proteinbande, die aufgrund des Molekulargewichtes und des Fehlens in der Negativkontrollspur als spezifisch für das mL1-TEV-Fc anzusehen ist, nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle diente in diesem Versuch Gesamthirnhomogenat von 6-8 Tage alten Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6J. Neben der spezifischen Bande sind noch andere unspezifische Proteinbanden zu erkennen. Diese Proteinbanden traten auch im Kulturüberstand von CHO-Zellen, die nur mit dem pcDNA3-Vektor transfiziert wurden (Negativkontrolle), auf. Der Klon #19 wurde nun in einem größeren Maßstab für die Produktion und Reinigung des mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins angezogen.

4.10.4 Produktion und Reinigung des mL1-TEV-Fc aus CHO-Zellkulturüberstand

Zur Produktion des mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins wurden die stabil transfizierten CHO-Zellen kultiviert, wie im Abschnitt 3.3.7 beschrieben. Nach der Produktion des Proteins wurde die Aufreinigung über eine Protein A-Säule durchgeführt, wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben. Nach der Elution wurde das Protein mit einem *Vivaspin concentrator* (*cut-off* 50 kDa) konzentriert und umgepuffert. Im Anschluss wurden die Fraktionen der Reinigung mit Hilfe eines *Western Blots* analysiert (Abb. 4-22).

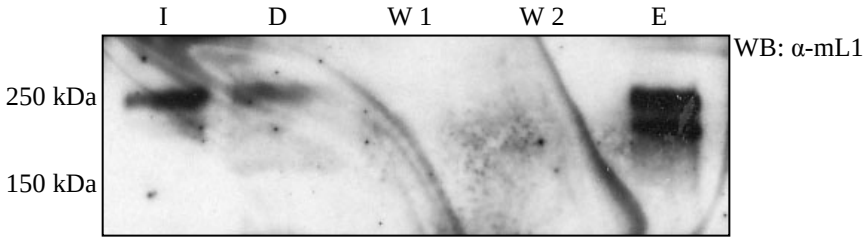


Abbildung 4-22. Analyse der Reinigung des mL1-TEV-Fc -Fusionsproteins
Das von stabil transfizierten CHO-Zellen in den Kulturüberstand sezernierte mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein wurde mit einem polyklonalen α-mL1-Antikörper nachgewiesen.
I: Zellkulturüberstand (*Input*); D: Durchlauf Protein A-Säule; W 1: Waschfraktion 1 Protein A-Säule; W 2: Waschfraktion 2 Protein A-Säule; E: Elution von der Protein A-Säule.

Das mL1-TEV-Fc konnte über die Protein A-Säule aufgereinigt werden. In der Elutionsfraktion ist neben einer Bande bei 250 kDa, die dem *full-length*-Protein entspricht, auch eine kleinere Bande zu erkennen, die ebenfalls vom L1-Antikörper erkannt wird.

4.11 Untersuchung der biologische Aktivität des mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins

Als Substrat in Zellkultur angeboten, fördert das L1-Protein das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen (Lagenaur und Lemmon, 1987). Auch die extrazelluläre

Domäne von L1, als Fusionsprotein mit dem humanen Fc-Fragment exprimiert, fördert das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen (Chen et al., 1999; Doherty et al., 1995). Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob das Einfügen der TEV-Protease-Erkennungssequenz einen Einfluss auf das L1-vermittelte Neuritenwachstum hat (Abb. 4-23).

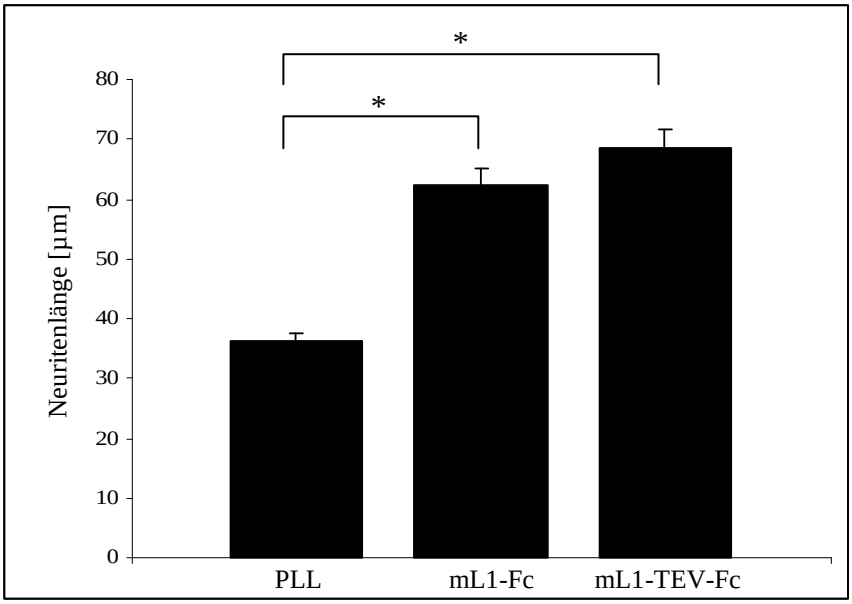


Abbildung 4-23. Effekt des TEV-Linkers auf das L1-abhängige Neuritenwachstum
Kleinhirnneurone wurden in Wells einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Vertiefungen waren entweder mit poly-L-Lysin (PLL), mL1-Fc oder mL1-TEV-Fc beschichtet (s. 3.3.7.1). Nach dem Fixieren und Färben der Zellen wurden die totalen Neuritenlängen pro Zelle der Kleinhirnneurone bestimmt und in dem Diagramm dargestellt. Die Werte von einem Experiment sind hier beispielhaft gezeigt. Das Ergebnis wurde in zwei weiteren unabhängigen Experimenten reproduziert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des jeweiligen Mittelwertes.

Wie erwartet zeigten die Kleinhirnneurone auf substratbeschichtetem mL1-Fc ein erhöhtes Neuritenwachstum im Vergleich zum beschichteten PLL. Auch wenn das mL1-TEV-Fc als Substrat beschichtet wurde, konnte ein Fördern des Neuritenwachstums in Vergleich zum PLL beobachtet werden. Der Effekt war noch deutlicher als beim mL1-Fc. Die TEV-Protease-Erkennungssequenz übte also keinen negativen Einfluss auf das L1-vermittelte Neuritenwachstum aus.

4.12 Etablierung der Spaltung des mL1-TEV-Fc mit der TEV-Protease

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überwiegend die AcTEV Protease (Invitrogen) verwendet. Diese Protease ist stabiler als die ursprünglich aus dem *tobacco etch virus* isolierte TEV-Protease (Nayak et al., 2003), hat einen sechsfachen Histidin-*Tag* und wurde in *E. coli* produziert. Zunächst sollte untersucht werden, ob die AcTEV Protease ein Positivkontrollsubstrat (hL1-TEV-Fc 1-3; Haspel et al., 2000) in gleichem Maße spaltet wie die von Haspel et al. verwendete TEV-Protease (Life Technologies, später Invitrogen). Diese Protease hat ebenfalls einen sechsfachen Histidin-*tag* und wurde in *E. coli* produziert (im Folgenden wird diese Protease mit rTEV bezeichnet). Da die rTEV Protease nicht mehr produziert wurde, stellte Martin Grumet (Rutgers University) mir freundlicherweise eine kleine Restmenge zur Verfügung. Das hL1-TEV-Fc 1-3-Fusionsprotein besteht aus den ersten drei Fibronektin-Domänen des humanen L1, die als Fusionsprotein mit dem TEV-Fc-Fragment in CHO-Zellen exprimiert wurden (Haspel et al., 2000). Das hL1-TEV-Fc 1-3 wurde mir freundlicherweise von Martin Grumet (Rutgers University) zur Verfügung gestellt.

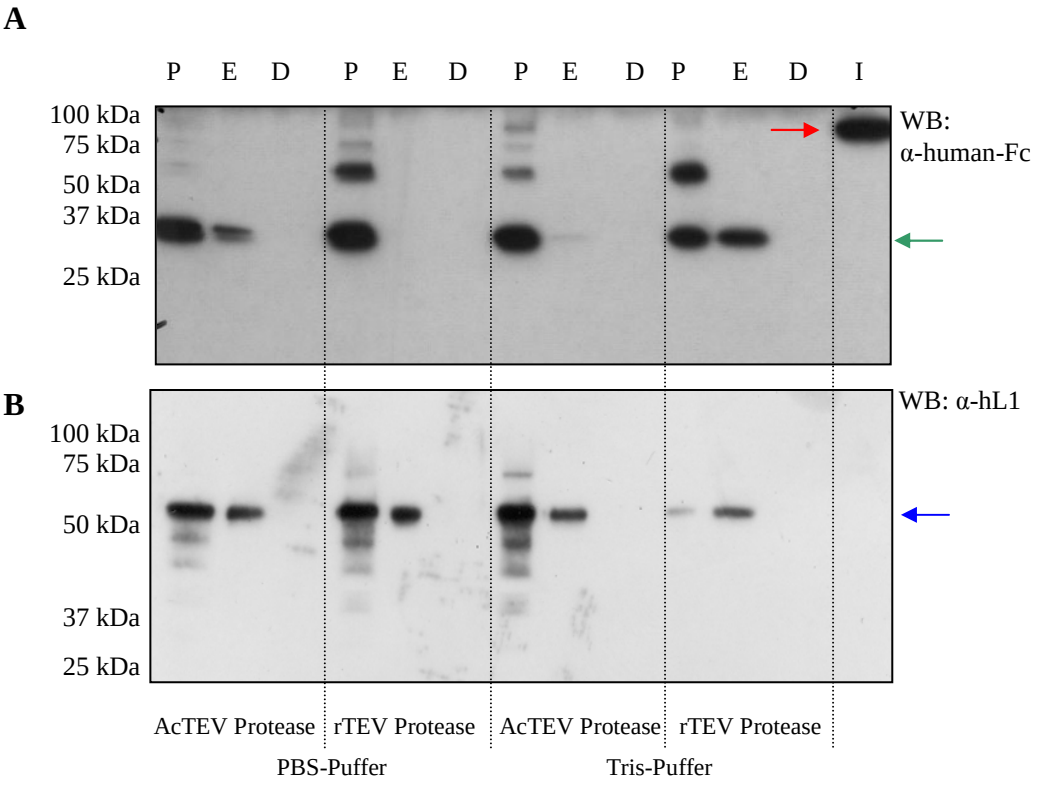


Abbildung 4-24. Analyse der hL1-TEV-Fc Spaltung mit der TEV-Protease mittels *Western Blot*

I: *Input*; E: Elution mit der rTEV oder der AcTEV Protease; P: *Beads* in 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer gekocht; D: Durchlauf

Für die Spaltung wurde das hL1-TEV-Fc 1-3 an Protein A-*Beads* gekoppelt. Die TEV-Spaltung wurde sowohl mit einer frisch gelieferten Charge der AcTEV Protease als auch mit der rTEV Protease durchgeführt, die von M. Grumet zur Verfügung gestellt wurde. Neben dem üblicherweise verwendeten PBS-Puffer wurde auch ein Tris-Puffer (20 x *TEV Buffer:* 1 M Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0) eingesetzt (vergleiche 1.), der vom Hersteller (Invitrogen) mitgeliefert wurde. Das hL1-TEV-Fc-Fusionsprotein wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes L1 (α-hL1) nachgewiesen. Das Fc-Fragment wurde mit dem polyklonalen HRP-gekoppelten α-human-Fc-Antikörper nachgewiesen. Das intakte Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von 90 kDa (roter Pfeil Abbildung 4-24 A). Nach der Spaltung hat das hL1-Fragment ein Molekulargewicht von 55 kDa (blauer Pfeil Abbildung 4-24 B) und das Fc-Fragment hat ein Molekulargewicht von 30 kDa (grüner Pfeil Abbildung 4-24 A).

Bei einem optimalen Verlauf der Spaltung wäre zu erwarten gewesen, dass sich das hL1-Fragment in der Elutionsfraktion befindet. Das Fc-Fragment würde dann nach dem Kochen der Protein A-*Beads* eluieren.

Wie in Abbildung 4-24 zu erkennen, wurde das Kontrollsubstrat sowohl durch die rTEV als auch durch die AcTEV Protease gespalten. Das hL1-TEV-Fc 1-3 wurde von der rTEV Protease besser im PBS-Puffer als im Tris-Puffer gespalten, was durch eine stärkere L1-immunreaktive Bande in der jeweiligen Elutionsfraktion deutlich wurde (s. Abb. 4-24 B). Das gespaltene hL1-Fragment wurde auch nach dem Kochen der *Beads* detektiert (s. Abb. 4-24 B, *lane* P). Das Fc-Fragment wurde wie erwartet nach dem Kochen der *Beads* nachgewiesen. Zusätzlich wurde das Fc-Fragment auch in den Elutionsfraktionen detektiert (vergleiche Abb. 4-24 A).

Nun sollten die Bedingungen evaluiert werden, unter denen eine Spaltung des mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins mit der AcTEV Protease möglich ist. Dazu wurde das mL1-TEV-Fc-Protein sowohl mit der rTEV als auch mit der AcTEV Protease inkubiert. Bei diesem Spaltungsansatz wurde das mL1-TEV-Fc nicht an Protein A-*Beads* gekoppelt, die Spaltungsreaktion wurde wie vom Hersteller empfohlen angesetzt (vgl. 3.5.3). Ungespalten hatte das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein ein Molekulargewicht von ca. 250 kDa. Nach einer erfolgreichen Spaltung sollte das L1-Fragment ein Molekulargewicht von ca. 220 kDa haben, da für das abgespaltene Fc-Fragment ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa zu erwarten ist.

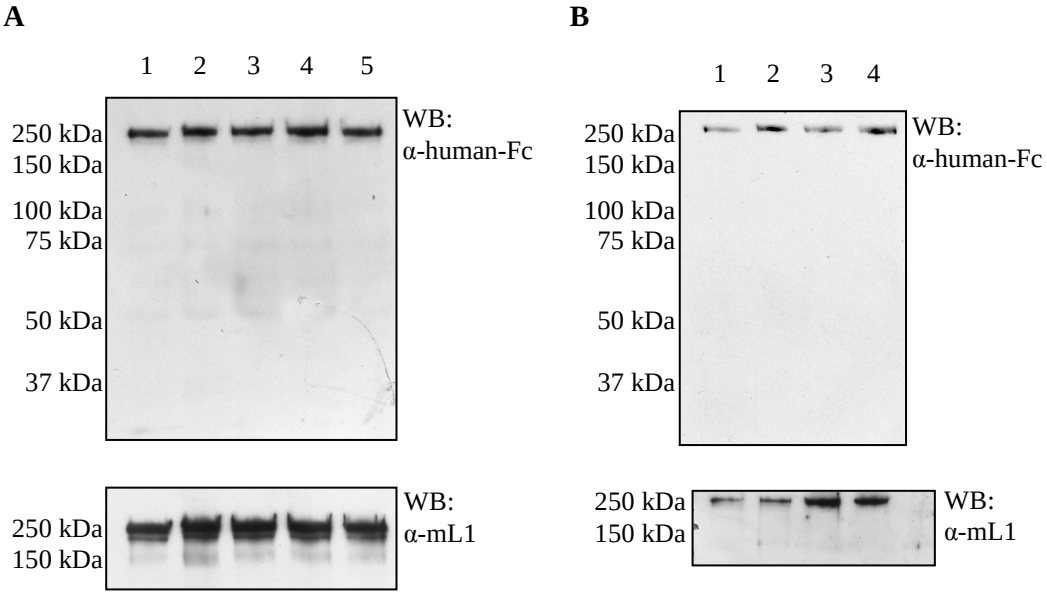


Abbildung 4-25. *Western Blot*-Analyse der mL1-TEV-Fc-Spaltung mit der AcTEV und der rTEV Protease

Die Reaktionsansätze wurden 6 h bei 30°C inkubiert. Das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein bzw. eventuelle mL1-Fragmente wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Maus-L1 (α-mL1) nachgewiesen. Zusätzlich wurde das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein oder das eventuell entstandene Fc-Fragment mit einem HRP-gekoppelten polyklonalen Antikörper gegen das humane Fc-Fragment (α-human-Fc) nachgewiesen.

A: 1: *Input*; 2: AcTEV Protease (10 U), Tris-Puffer; 3: AcTEV Protease (10 U), PBS-Puffer; 4: rTEV Protease (10U), PBS-Puffer; 5: ohne Protease

B: 1: AcTEV Protease (100 U), Tris-Puffer; 2: AcTEV Protease (200 U), Tris-Puffer; 3: rTEV Protease (20 U), Tris-Puffer; 4: ohne Protease

Unter diesen, vom Hersteller empfohlenen, Bedingungen wurde das mL1-TEV-Fc nicht gespalten. Es war keine Verschiebung des Molekulargewichtes L1-immunreaktiver Banden im Vergleich zum *Input* zu erkennen (Abb. 4-25). Nun sollte untersucht werden, ob eine Kopplung des mL1-TEV-Fc an Protein A-*Beads* eine Spaltung ermöglicht.

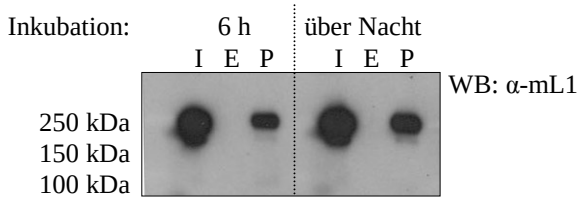


Abbildung 4-26. Analyse der Spaltung des an Protein A-*Beads* gebundenen mL1-TEV-Fc, mit 10 U AcTEV Protease

Der Reaktionsansatz wurde für 6 h und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Spaltung wurde im PBS-Puffer durchgeführt. Das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein und mögliche mL1 ecd-Fragmente wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Maus-L1 (α-mL1) nachgewiesen.

I: *Input*; E: Elution mit der AcTEV Protease (10 U); P: *Beads* in 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer gekocht

Auch eine Kopplung des mL1-TEV-Fc an Protein A-*Beads* brachte keinen Erfolg. Neben der Kopplung an Protein A-*Beads* wurde die Reaktion nicht nur 6 h, sondern auch über Nacht inkubiert, um die Spaltbedingungen zu optimieren. Es konnte aber dennoch keine Spaltung beobachtet werden (Abb. 4-26). Im nächsten Schritt wurde die eingesetzte Menge der AcTEV Protease auf 100 U erhöht. .

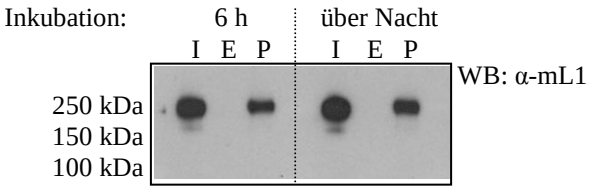


Abbildung 4-27. Analyse der Spaltung des an Protein A-*Beads* gebundenen mL1-TEV-Fc mit 100 U AcTEV Protease

Die Reaktionsansätze wurden für 6 h oder über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Spaltung wurde im PBS-Puffer durchgeführt. Das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein und mögliche mL1-ecd-Fragmente wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Maus-L1 (α-mL1) nachgewiesen.

I: *Input*; E: Elution mit der AcTEV Protease (100 U); P: *Beads* in 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer gekocht

Auch diese Erhöhung der Proteasekonzentration führte nicht zu einer Spaltung des mL1-TEV-Fc (Abb. 4-27). Der Fehlschlag der bisher dargestellten Spaltungsversuche könnte auf eine Faltung des Fusionsproteins zurückzuführen sein,

die die Spaltstelle für die AcTEV Protease unzugänglich macht. Um den TEV-Linker für die Protease besser zugänglich zu machen, wurden dem PBS-Puffer in einem nachfolgenden Versuch Detergenzien in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt. Dabei wurde das mL1-TEV-Fc wieder an Protein A-*Beads* gebunden.

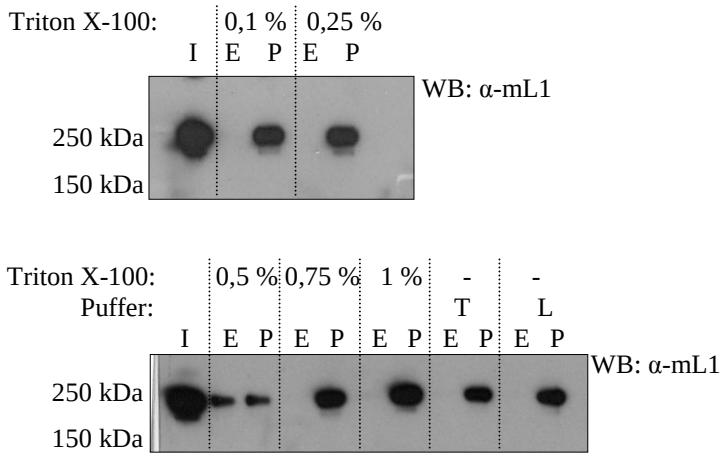


Abbildung 4-28. Analyse der TEV-Spaltung des an Protein A-*Beads* gebundenen mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins in Anwesenheit verschiedener Detergenzien

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 30°C inkubiert. Dem verwendeten PBS-Puffer wurde Triton X-100 in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt. Daneben wurde ein TEV-Puffer (Gingras, 2005) (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 % NP 40, 0,5 mM EDTA, pH 8,0) und ein Lysis-Puffer (Lyapina et al., 2001) (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,2 % Triton X-100, 10 mM EDTA, pH 7,2) verwendet. Das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein und mögliche mL1-ecd-Fragmente wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Maus-L1 (α-mL1) nachgewiesen.

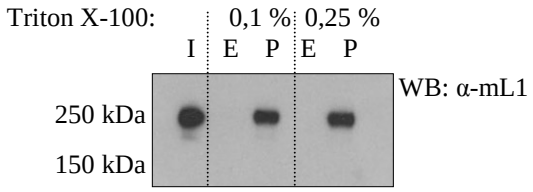
I: *Input*; E: Elution mit der AcTEV Protease (10 U); P: *Beads* in 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer gekocht

T: TEV-Puffer; L: Lysis-Puffer

Auch nach Zugabe der Detergenzien war keine Spaltung durch die AcTEV Protease erkennbar (Abb. 4-28). Durch Inkubation der *Beads* mit der AcTEV Protease im PBS-Puffer mit 0,5 % Triton X-100 wurde mL1-TEV-Fc eluiert (vgl. Abb.4-28 B, *lane* 2). Da sich das Molekulargewicht aber nicht von dem des intakten Fusionsproteins im *Input* unterscheidet, handelt es sich wahrscheinlich um einen unspezifischen Effekt, und nicht um eine Abspaltung der extrazellulären Domäne von mL1 durch die Protease. Die Zugabe der Detergenzien kann die AcTEV Protease

unter Umständen hemmen. Um einen solchen Effekt zu kompensieren, wurde die Konzentration des Enzyms erhöht.

A



B

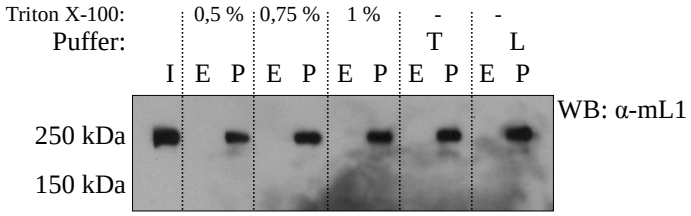


Abbildung 4-29. Analyse der TEV-Spaltung des an Protein A-*Beads* gebundenen mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins mit verschiedenen Detergenzien

Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 30°C inkubiert. Dem verwendeten PBS-Puffer wurde Triton X-100 in unterschiedlicher Konzentration zugesetzt. Daneben wurde ein TEV-Puffer (Gingras, 2005) (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 % NP 40, 0,5 mM EDTA, pH 8,0) und ein Lysis-Puffer (Lyapina et al., 2001) (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,2 % Triton X-100, 10 mM EDTA, pH 7,2) verwendet. Das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein und mögliche mL1-ecd-Fragmente wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen Maus-L1 (α-mL1) nachgewiesen.

I: *Input*; E: Elution mit der AcTEV Protease (100 U); P: *Beads* in 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer gekocht

T: TEV-Puffer; L: Lysis-Puffer

Trotz der Erhöhung der AcTEV Proteasenkonzentration von 10 U auf 100 U konnte keine Spaltung des mL1-TEV-Fc beobachtet werden (Abb. 4-29). In keiner der Elutionen konnte gespaltenes Fusionsprotein detektiert werden.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die extrazellulären Domänen biologisch bedeutsamer neuraler Zellerkennungsmoleküle in eukaryotischen Systemen rekombinant zu exprimieren. Die Aufreinigung dieser Proteine sollte optimiert werden, um Struktur- und Funktionsanalysen zu ermöglichen.

5.1. Rekombinante Expression, Reinigung und Charakterisierung des neuralen Zellerkennungsmoleküls P0

Der erste Teil dieser Dissertation zielte darauf ab, die extrazelluläre Domäne des neuralen Zellerkennungsmoleküls P0 in *Pichia pastoris* rekombinant in biologisch aktiver Form zu exprimieren. Neben der wildtypischen Form des P0-Proteins sollte auch eine mutierte Variante, bei der die Aminosäure Isoleucin an Position 106 gegen Leucin ausgetauscht ist, exprimiert werden. Da diese Mutation eine der möglichen genetischen Ursachen für die Charcot-Marie-Tooth´sche Erkrankung (CMT) im Menschen ist, könnte ein Vergleich der dreidimensionalen Struktur, von wildtypischer und mutierter Form, wichtige Informationen über den Einfluss der Mutation auf die Struktur von P0 liefern. Zusätzlich sollte auch der mögliche Einfluss dieser Mutation auf die homophile Interaktion des P0-Proteins untersucht werden.

5.1.1 Expression der extrazellulären Domäne des wildtypischen murinen P0 in *Pichia pastoris*

Die cDNA der extrazellulären Domäne des P0-Proteins wurde für die Expression in *Pichia pastoris* in den pPICzαA-Vektor kloniert und anschließend in die beiden Hefestämme X-33 und SMD1168 transformiert. Die extrazelluläre Domäne des wildtypischen P0-Proteins wurde von der Hefe *Pichia pastoris* als ca. 23 kDa großes Fusionsprotein mit einem Myc- und einem sechsfachen Histidin-*Tag* in den

Kulturüberstand sezerniert. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins liegt damit über dem auf der Basis des Aminosäurerückgrats errechneten Wert von 16,7 kDa. Dieser Unterschied kann auf die Glykosylierung des P0-Proteins durch die Hefe zurückgeführt werden. So liegt das Molekulargewicht des Fusionsproteins nach der Deglykosylierung mit der N-Glycosidase F, zwischen 15 und 20 kDa (vergleiche Abb. 4-7). Dies entspricht dem errechneten Molekulargewicht. Im Vergleich dazu lag das Molekulargewicht der unglykosylierten, in *E. coli* exprimierten, extrazellulären Domäne des murinen P0 bei 17 kDa (Schneider-Schaulies et al., 1990). Das Molekulargewicht der extrazellulären Domäne des humanen P0-Proteins lag mit 14 kDa etwas darunter (Bond et al, 2001). Das Molekulargewicht des aus dem peripheren Nerversystem isolierten *full-length* P0-Proteins lag bei 28-30 kDa (Greenfield et al., 1973).

Die Expression der extrazellulären Domäne des P0-Proteins konnte im *Western Blot* sowohl mit einem spezifischen Antikörper gegen das P0-Protein als auch mit einem Antikörper gegen den Histidin-*Tag* nachgewiesen werden. Die Reinigung der extrazellulären Domäne des P0-Proteins erfolgte über Ni-NTA-Agarose-*Beads*, an die das Protein über seinen sechsfachen Histidin-*Tag* gebunden wurde. Die Elution erfolgte wie vom Hersteller vorgegeben mit einer hohen Imidazol-Konzentration (250 mM). Da diese Imidazol-Konzentration störend für die nächsten Konzentrationsschritte war, wurde das Protein durch Dialyse umgepuffert und anschließend mit einem *Vivaspin concentrator* (*cut-off* 5 kDa) aufkonzentriert. Dieser Schritt des Aufkonzentrierens erwies sich als sehr verlustträchtig. Eine braune Verfärbung deutete darauf hin, dass das P0 an die Membran adhärierte. So gingen ca. 80 % des Proteins in diesem Schritt verloren. Erst durch eine *passivation procedure* (Application Note Satorius) der Membran konnte der Verlust stark reduziert werden, so dass keine Verfärbung der Membran mehr zu erkennen war. Wahrscheinlich beeinflusst diese passivation procedure die homophilen bzw. hydrophilen Eigenschaften der Membran. So könnte eine Adsorption des Proteins an die Membran reduziert werden.

Die Ausbeute des wildtypischen P0-Fusionsproteins in *Pichia pastoris* betrug 1 mg/l Schüttelkolbenkultur. Die Expressionsrate der in *Pichia pastoris* exprimierten Proteine kann sehr unterschiedlich sein. So liegt z. B. die Expressionsrate des *bovine*

follicle-stimulating hormone β–subunit bei 4 µg/l (Samaddar et al., 1997). Im Gegensatz dazu liegt sie im Falle des *mouse epidermal growth factor* bei 450 mg/l (Clare et al., 1991). Die Expression und Sezernierung rekombinanter Proteine in *Pichia pastoris* wird durch verschiedene genetische und physiologische Faktoren beeinflusst. Zu nennen sind hierbei der Codon-Gebrauch des exprimierten Gens, die Anzahl der integrierten Expressionskassetten, die effiziente Transkription durch die Verwendung eines starken Promotors und eines Translationssignals, die Translokation durch die Signalsequenz, die Prozessierung und Faltung im endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat, die Sezernierung aus der Zelle und die Proteolyse (Hohenblum et al., 2004). Um eine hohe und stabile Expressionsrate zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit der durch Methanol induzierbare AOX1-Promotor verwendet. Dieser Promotor bietet unter anderem den Vorteil, dass die Transkription des rekombinanten Proteins durch einen Repressions- / Derepressionsmechanismus reguliert wird. Dadurch können auch Proteine die für die Zelle toxisch sind exprimiert werden (Macauley-Patrick et al., 2005). Als Alternative könnte z. B. auch der konstitutive GAP-Promotor verwendet werden. Auch mit diesem Promotor wurden ähnlich hohe Expressionsraten wie mit dem AOX1-Promotor erreicht. Der GAP-Promotor bietet den Vorteil, dass die Transkription nicht erst mit Methanol induziert werden muss. Trotzdem wird der AOX1-Promotor überwiegend verwendet, da vermutet wird das eben gerade diese konstitutive Produktion rekombinanter Proteine toxisch für die Zelle sein kann (Menendez et al., 2004). Um einer Proteolyse des P0-Proteins entgegen zu wirken, wurde der Proteaseinhibitor AEBSF verwendet. AEBSF inhibiert Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein und Thrombin. Aufgrund seiner relativ niedrigen Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen kann dieser Inhibitor bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in *Pichia pastoris* eingesetzt werden. (Lunn und Sansone, 1994; Markwardt et al., 1982). Während der Produktion des wildtypischen P0-Proteins und des Ile106Leu-P0-Proteins im Fermenter wurde keine Proteolyse beobachtet.

5.1.2 Charakterisierung der in *Pichia pastoris* exprimierten extrazellulären Domäne des P0-Proteins

Um das rekombinante P0-Protein genauer zu charakterisieren, wurde es mit der N-Glykosidase F deglykosyliert. Die extrazelluläre Domäne von P0 enthält eine Stelle für Asparagin (N)-ständige Glykosylierung (Ishaque et al., 1980). Die native Zuckerzusammensetzung ist bei P0 sehr heterogen. Das Protein trägt unter anderem das HNK-1-Kohlenhydratepitop und das oligomannosidische L3-Kohlenhydrat (Griffith et al., 1992). N-Glykosylierungen von *Pichia pastoris* finden innerhalb der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr statt, wobei die Oligosaccharidketten nur aus Mannoseeinheiten bestehen (Higgins und Cregg, 1998; Cereghino und Cregg, 2000). N-Glykosidase F spaltet alle Typen von Asparagin-gebundenen N-Glykanen, vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen (Tarentino, 1985). Aufgrund der Reduktion des Molekulargewichts von 5-7 kDa nach Behandlung mit N-Glykosidase F konnte davon ausgegangen werden, dass das P0-Fusionsprotein von der Hefe glykosyliert wurde. Dieses Ergebnis konnte auch durch die NMR-Analyse bestätigt werden. Es konnte aber keine Aussage darüber getroffen werden, welche Aminosäure gykosyliert wurde, und ob nur die native Glykosylierungsstelle von der Hefe verwendet wurde. Eine solche Aussage wäre nur durch eine Markierung der Aminosäuren (z. B. mit N^{15}) und die anschließende Durchführung mehrerer NMR-Analysen möglich gewesen (T. Biet, pers. Mitteilung). *Pichia pastoris* verwendet unter Umständen nicht die gleichen Glykosylierungsstellen wie höhere Eukaryoten. Proteine, die von ihrem nativen Ursprungsorganismus nicht glykosyliert werden, können von *Pichia pastoris* „falsch“ glykosyliert werden (Brierley, 1998). Der Glykosylierungsapparat einiger *Pichia pastoris*-Stämme wurde so modifiziert, dass sie humanisierte N-Glykosylierungen des komplexen Typs durchführen können (Choi et al., 2003; Hamilton et al., 2006). Diese Stämme standen jedoch leider nicht für die vorliegende Arbeit zur Verfügung. Die N-Glykosylierung spielt eine besondere Rolle, da sie sowohl in Faltungsprozesse der Proteine involviert ist als auch die Halbwertzeit der Proteine *in vivo* bestimmen kann und darüber hinaus oft für die Aktivität der Proteine wichtig ist (Helenius und Aebi, 2001; Mitra et al.,

2006). Deshalb ist eine korrekte Glykosylierung besonders beim therapeutischen Einsatz von Proteinen von Bedeutung.

Um zu überprüfen, ob die aufgereinigte extrazelluläre Domäne des wildtypischen P0-Proteins für eine Kristallisation geeignet war, wurde eine DLS-Messung durchgeführt. Mit einer DLS-Messung kann überprüft werden, ob das Protein in monodisperser Form vorliegt, d. h. dass keine Aggregate oder Verunreinigungen vorhanden sind, die den Prozess der Kristallbildung stören könnten (McPherson, 1999). Das aufgereinigte P0-Fusionsprotein hatte einen hydrodynamischen Radius von 10-20 nm. Die Probe enthielt nur sehr wenige Aggregate, die einen hydrodynamischen Radius von 10-100 µm hatten. Die in *E. coli* exprimierte und kristallisierte extrazelluläre Domäne des wildtypischen P0 hatte einen etwas kleineren hydrodynamischen Radius von 7 nm. Das entspricht einem berechneten Molekulargewicht von ca. 20 kDa (Shapiro et al., 1996). Da das in *Pichia pastoris* exprimierte P0 ein etwas höheres Molekulargewicht hatte, entsprach der etwas größere hydrodynamische Radius den Erwartungen.

5.1.3 Kristallisation der extrazellulären Domäne des P0-Proteins

Die extrazelluläre Domäne des wildtypischen P0-Proteins wurde bereits in *E. coli* exprimiert und kristallisiert (Shapiro et al., 1996). Die Kristallisation erfolgte bei einer sehr hohen Proteinkonzentration (45 mg/ml) und einem leicht basischem pH-Wert. Ähnliche Verhältnisse bestehen auch bei der Bildung der *intraperiod line*, die durch die homophile Interaktion der extrazellulären Domäne des P0-Proteins entsteht. P0 ist das hauptsächliche Protein des peripheren Myelins und kommt in sehr hohen Konzentrationen vor. Außerdem bildet sich die *intraperiod line* nur bei einem leicht basischen pH-Wert aus (Inouye und Kirschner, 1988; Kirschner und Blaurock, 1992). Anhand der erhaltenen Daten stellten Shapiro et al. (1996) ein Modell für die Interaktion der einzelnen P0-Protomere untereinander auf. Die analysierten Kristalle bestanden aus mehreren Ebenen. Jede Ebene wurde durch alternierend ausgerichtete zyklische Tetramere gebildet, die aus P0-Protomeren bestanden. Jedes Tetramer war mit vier anderen Tetrameren entgegengesetzter Orientierung assoziiert, so dass sich ein adhäsives Gitter ausbildete. Das in *E. coli* exprimierte P0 war nicht glykosyliert,

aber die potentielle N-Glykosylierungsstelle an Position Asparagin 93 war deutlich zu erkennen. Die Autoren der Studie vermuteten, dass die Zuckerkette einen stabilisierenden Einfluss auf die Interaktion der P0-Protomere haben könnte (Shapiro et al., 1996). Dass die Glykosylierung eine besondere Rolle in der Adhäsion des P0-Proteins spielt, ist schon lange bekannt. So konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der Glykostruktur des P0-Proteins vom komplexen Typ hin zum *high*-Mannose-Typ einen negativen Einfluss auf die homophile Adhäsion hatte (Filbin und Tennekoon, 1991). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass keine Adhäsion mehr möglich ist, wenn die Glykosylierungsstelle im P0 mutiert ist (Filbin und Tennekoon, 1993). Deshalb wäre es von besonderer Bedeutung, den Einfluss der Zuckerkette auf die Interaktion der P0-Protomere innerhalb eines Kristalls zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde die aus *Pichia pastoris* aufgereinigte extrazelluläre Domäne des P0-Proteins für Kristallisationsversuche mit einer Konzentration von 16 mg/ml eingesetzt. 480 verschiedene Kristallisationsbedingungen wurden am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) im Laboratorium für Strukturbiologie von Infektion und Entzündung in Zusammenarbeit mit Dr. Markus Perbandt getestet. Mit einem Roboter Honeybee 961 (Genomic Solutions) wurden die Kristallisationsansätze für klassische Dampfdiffusionsexperimente im Nanolitermaßstab pipettiert. Keine der 480 Kristallisationsbedingungen lieferte jedoch einen Proteinkristall. Ein möglicher Grund könnte die im Vergleich zur Shapiro et al.-Studie geringere Proteinkonzentration gewesen sein. Die in *E. coli* exprimierte extrazelluläre Domäne des P0-Proteins wurde für die Kristallisation mit einer Konzentration von 45 mg/ml eingesetzt. Diese sehr hohe Proteinkonzentration und ein leicht basischer pH-Wert des Puffers waren Voraussetzung für die erfolgreiche Kristallisation (Shapiro et al., 1996). Ein weiteres Hindernis für die erfolgreiche Kristallisation könnte gerade die Glykosylierung des P0-Proteins aus *Pichia pastoris* gewesen sein. Zwei Punkte können die Kristallisation glykosylierter Proteine erschweren: zum einen kann die strukturelle Flexibilität der Zuckerketten den geordneten Einbau der einzelnen Moleküle in das Kristallgitter erschweren, zum anderen kann die aufgereinigte Proteinlösung Mikroheterogenitäten enthalten. In einem solchen Fall haben die einzelnen Moleküle verschiedene Glykosylierungsmuster, stellen also ein Gemisch aus glykosylierten und partiell deglykosylierten Molekülen dar. Dadurch kann eine Kristallisation erschwert werden, da das Protein möglichst in homogener Form

vorliegen sollte (McPherson, 1999). Um größere Proteinmengen für die Kristallisation zu produzieren und aufzureinigen, wurde eine Fermentation im 35 l-Maßstab von unserem Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe von Prof. Dübel (*Department of Biotechnology*, TU Braunschweig), durchgeführt. Die Ausbeute nach der Aufreinigung des Fermentationsüberstandes lag jedoch deutlich unter der im Schüttelkolben erzielten Ausbeute. So konnten aus einem Liter Überstand aus dem Schüttelkolben 1 mg P0-ecd-Myc-His-Fusionsprotein aufgereinigt werden. Aus 35 Litern Fermentationsüberstand konnten hingegen nur 0,69 mg P0-ecd-Myc-His-Fusionsprotein aufgereinigt werden. Die Ausbeute war also drastisch reduziert. Wahrscheinlich verlief die Fermentation nicht optimal. Bei einer Fermentation kann durch die Kontrolle der Parameter wie pH-Wert, Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Medium und Nährstoffversorgung (Kohlenstoffquelle) eine Steigerung der Zellmasse und damit meist auch eine Steigerung der Proteinausbeute erreicht werden (Cereghino et al., 2002). Ein *scale-up* von einer Kultivierung im Schüttelkolben zu einer Kultivierung im Fermenter bedarf daher zwangsläufig einer Optimierung. Da der zur Produktion von rekombinantem P0 verwendete Klon X-33 #4 in dem normalerweise für eine Fermentation verwendeten Minimalmedium keine P0-Expression zeigte, musste die Fermentation in dem Komplexmedium BMGY bzw. BMMY durchgeführt werden. Das Minimalmedium bietet gegenüber dem Komplexmedium den Vorteil, dass es kostengünstiger und wohl definiert ist (Cereghino et al., 2002). Das Komplexmedium hingegen kann durch die Verwendung unterschiedlicher Chargen produktionsbedingten Schwankungen unterliegen. Für eine erfolgreiche Fermentation kann es nötig sein, einzelne Parameter zu variieren. So wurde z. B. anstatt des in dieser Arbeit verwendeten *Fed-batch*-Protokolls ein *mixed-feed*-Protokoll erfolgreich eingesetzt (Sreekrishna et al., 1989; Sreekrishna et al., 1997; Loewen et al., 1997). Während einer Fermentation kann es zu einer erhöhten Konzentration von Proteasen, bedingt durch die Lyse der Zellen bei einer so hohen Zelldichte, kommen. Auch durch einen erhöhten proteolytischen Abbau könnte die Ausbeute des P0-Proteins drastisch reduziert worden sein. Einer Proteolyse des sezernierten Fusionsproteins könnte, z. B. durch das Herabsetzen der Temperatur (Li et al., 2001) oder des pH-Wertes (Brierley, et al., 1998) während der Fermentation, entgegengewirkt werden. Weiterhin könnten auch Caseinhydrolysat und Pepton dem Fermentationsmedium zugesetzt werden, um eine Proteolyse des sezernierten Fusionsproteins zu vermindern (Clare et al., 1991).

Eine solche Optimierung war aber im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Fermenters zeitlich leider nicht mehr möglich.

Für einen *Screen* von 288 Kristallisationsbedingungen wurden verschiedene im 1 l-Maßstab hergestellte Chargen des P0-Fusionsproteins zusammengefasst. Dieser *Screen* wurde ebenfalls am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) im Laboratorium für Strukturbiologie von Infektion und Entzündung in Zusammenarbeit mit Dr. Markus Perbandt angesetzt. Vorher wurde mittels DLS-Messung überprüft, ob alle Chargen den gleichen hydrodynamischen Radius aufwiesen und in monodisperser Form vorlagen. So konnte für diesen *Screen* eine im Vergleich zum vorherigen Versuch erhöhte Proteinkonzentration von 22 mg/ml eingesetzt werden.

5.1.4 Expression und Kristallisation der extrazellulären Domäne des P0-Ile106Leu-Proteins in *Pichia pastoris*

Neben der extrazellulären Domäne des wildtypischen P0-Proteins wurde auch eine mutierte Form der extrazellulären Domäne von P0 in *Pichia pastoris* exprimiert, um den Einfluss der Mutation auf die Struktur des P0-Proteins zu untersuchen. Die mutierte Form enthält einen Aminosäureaustausch an Position 106, dort wurde die Aminosäure Isoleucin gegen Leucin ausgetauscht. Diese Mutation ist eine der möglichen genetischen Ursachen für die Charcot-Marie-Tooth´sche Erkrankung vom Typ 1B (CMT1B) im Menschen. Die Mutation wurde durch gerichtete Mutagenese in das vorhandene pPICZαA-P0-ecd-Plasmid eingeführt. Das erhaltene pPICZA-P0-ecd-mut-Plasmid wurde in die *Pichia pastoris*-Stämme X-33 und SMD1168 transformiert, und positive Klone durch die Analyse der Kulturüberstände mittels *Western Blot* identifiziert. Dabei wurde das Fusionsprotein sowohl mit einem Antikörper gegen den sechsfachen Histidin-*Tag* als auch mit einem gegen das P0-Protein gerichteten Antikörper nachgewiesen. Die Reinigung erfolgt wie beim wildtypischen P0 über die Bindung des sechsfachen Histidin-*Tags* an Ni-NTA-Agarose-*Beads* und wurde zunächst im kleinen Maßstab mit 100 ml Kulturüberstand etabliert. Aufgrund des fehlgeschlagenen Kristallisationsversuchs für das wildtypische P0-Protein wurde vermutet, dass eine sehr hohe Proteinkonzentration für die Kristallisation benötigt werden würde. Dafür wurde wieder eine Fermentation

im 35 l-Maßstab von unserem Kooperationspartner, der Arbeitsgruppe von Prof. Dübel (*Department of Biotechnology*, TU Braunschweig), durchgeführt. Die Ausbeute nach Aufreinigung des P0-Ile106Leu-Proteins aus dem Fermentationsüberstand war deutlich besser als die Ausbeute der Fermentation des wildtypischen P0-Proteins. Aus einem Liter Fermentationsüberstand konnten 440 µg Protein aufgereinigt werden. Zwar liegt die Ausbeute damit immer noch unter der aus der Schüttelkolbenproduktion (1 l-Maßstab) aufgereinigten Menge von 1 mg/l, jedoch könnte die Ausbeute durch eine Optimierung der Fermentationsbedingungen noch gesteigert werden. Hinzu kommt, dass das Aufreinigungsprotokoll erst optimiert werden musste, um überhaupt eine Aufreinigung des P0-Ile106Leu-Proteins zu ermöglichen. Denn zunächst konnte keine Bindung des P0-Ile106Leu-Proteins aus dem Fermentationsüberstand an die Ni-NTA-Agarose-*Beads* beobachtet werden. Für diese Problematik gibt es zwei mögliche Erklärungen: zum einen könnten während der Fermentation Substanzen entstanden sein, die eine Bindung des Fusionsproteins an die *Beads* verhinderten. Zum anderen könnten aber auch Substanzen in einem der Mediumsbestandteile enthalten gewesen sein, die sich bei der Aufreinigung als störend erwiesen haben könnten. Fast 80 % des Proteins befanden sich nach der Aufreinigung in der Durchlauf-Fraktion. Erst eine Dialyse des Fermentationsüberstandes gegen den Lysispuffer machte eine Aufreinigung des Proteins über die Ni-NTA-Agarose-*Beads* möglich.

Auch hier wurde das Protein mit einer hohen Imidazol-Konzentration eluiert und musste für weitere Analysen umgepuffert und konzentriert werden. Wie auch schon beim wildtypischen P0 musste die Membran des *Vivaspin concentrators* (*cut-off* 5 kDa) einer *passivation procedure* (Application Note Satorius) mit 5 % Tween in dd H_2O unterzogen werden, um die Adhäsion des Proteins an die Membran zu verhindern.

Nach dem Aufkonzentrieren mittels *Vivaspin concentrator* konnte eine Proteinpräzipitation beobachtet werden, wodurch sich die Proteinkonzentration von errechneten 22 mg/ml auf 6,6 mg/ml verringerte. Auch in der DLS-Messung wurde eine verstärkte Aggregation des mutierten P0-Proteins beobachtet. Ein Präzipitieren des Fusionsproteins könnte z. B. durch eine Übersättigung der Lösung oder durch andere Faktoren, die die Löslichkeit des Proteins beeinflussen, verursacht worden

sein. Die Löslichkeit eines Proteins kann durch den pH-Wert, die Temperatur und die Ionenstärke der Lösung beeinflusst werden. Die extrazelluläre Domäne des wildtypischen P0-Proteins zeigte bei gleichen Pufferbedingungen und einer ähnlichen Proteinkonzentration keine Präzipitation.

Für die Kristallisation der mutierten extrazellulären Domäne des P0-Proteins wurde ein *Screen* mit 192 verschiedenen Kristallisationsbedingungen angesetzt. Die Proteinkonzentration betrug 6,6 mg/ml. Zum Zeitpunkt des Abschlusses der Dissertation lag noch kein Ergebnis dieser Kristallisation vor.

5.1.5 Untersuchung des Einflusses der Ile106Leu-Mutation auf die Zelloberflächenexpression und die homophile Adhäsion des P0-Proteins

Einige Mutationen im *Mpz*-Gen, welches für P0 codiert, beeinflussen die Struktur des Proteins so stark, dass es nicht mehr an der Zelloberfläche exprimiert wird. Das mutierte Protein befindet sich dann überwiegend im Zytosol (Lee et al., 2008; Konde und Eichberg, 2006). Diese Gruppe von P0-Mutationen wird mit einer frühen Manifestation der CMT-Krankheit in Verbindung gebracht (Shy, 2006). Da die Ile106Leu-Mutation in der transgenen P0sub-Maus auch zu einer frühen Manifestation der Krankheit führt (Rünker et al., 2004), war es wichtig zu überprüfen, ob das mutierte P0 überhaupt die Zelloberfläche erreicht. Dafür wurden zwei P0-Expressionskonstrukte kloniert. Beide enthielten die gesamte kodierende Sequenz des P0-Proteins, wobei in ein Plasmid die Ile106Leu-Mutation mittels gerichteter Mutagenese eingeführt wurde. Beide Expressionskonstrukte wurden anschließend transient in CHO-Zellen transfiziert und die Expression im Gesamtzelllysat mittels *Western Blot* analysiert. Wie im Abschnitt 4.8.3 beschrieben, wurden sowohl das wildtypische als auch das mutierte P0 voller Länge an der Zelloberfläche der transfizierten CHO-Zellen exprimiert. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass das mutierte P0 in der transgenen P0sub-Maus an der Zelloberfläche exprimiert wird und dort einen dominant-negativen Effekt ausübt (*gain of function*). Das Ile106Leu-P0-Protein nimmt also eine neue pathologische Funktion ein (Rünker et al., 2004). Der Phänotyp der P0sub-Maus erklärt sich also

wahrscheinlich nicht dadurch, dass das mutierte P0 im Zytosol der Schwann-Zelle verbleibt und so seine normale Funktion verliert (*loss of function*).

Um zu untersuchen, ob die Ile106Leu-Mutation einen Einfluss auf die homophile Interaktion des P0-Proteins hat, wurden CHO-Zellen mit den Konstrukten pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-wt und pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-mut transfiziert. Anschließend wurde ein Aggregations-*Assay* durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten CHO-Zellen, die mit einem Expressionskonstrukt für das ebenfalls homophil interagierende Zelladhäsionsmolekül L1 transfiziert wurden. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem leeren pcDNA3-Vektor transfiziert wurden (vergleiche 4.8). Zusätzlich wurden alle CHO-Zellen mit dem pcDNA3-EGFP-Vektor transfiziert. Die Zellen exprimierten dadurch als Marker das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) und konnten so von den nicht-transfizierten Zellen unterschieden werden. Filbin et al. (1990) konnten zeigen, dass CHO-Zellen, die das wildtypische P0 voller Länge stabil exprimieren, im Vergleich zu nicht-transfizierten CHO-Zellen nach einer bestimmten Inkubationszeit stärker aggregieren. Dieser Effekt beruht auf der homophilen Interaktion zweier P0-Moleküle in *trans* und nicht auf einer heterophilen Interaktion mit einem beliebigen anderen Molekül. Auch in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten zeigten die CHO-Zellen, die wildtypisches P0 exprimierten, eine stärkere Aggregation als die CHO-Zellen, die das P0-Ile106Leu exprimierten. Die Ile106Leu-Mutation hat also wahrscheinlich einen negativen Effekt auf die homophile Interaktion des P0-Proteins.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die wildtypische als auch die mutierte Form des P0-Proteins in gleichem Maße an der Zelloberfläche transfizierter CHO-Zellen exprimiert werden, und die Zell-Zell-Adhäsion durch die Ile106Leu-Mutation von P0 vermindert wird. Beide Ergebnisse sprechen dafür, dass das mutierte P0 eine neue pathologische Funktion einnimmt und so die schwere und sich früh manifestierende Form der CMT-Krankheit auslöst (Rünker et al., 2004). Trotzdem war der Effekt der Mutation auf die Adhäsion der transfizierten CHO-Zellen nicht so deutlich wie erwartet. So zeigten die L1 exprimierenden CHO-Zellen eine wesentlich stärkere Aggregation als die CHO-Zellen, die die wildtypische Form des P0 exprimierten. Eine mögliche Erklärung ist, dass die homophile Bindung zweier L1-Moleküle

generell stärker ist als die zweier P0-Moleküle. Wahrscheinlich wird die homophile Interaktion des L1 durch alle sechs IgG-Domänen vermittelt (De Angelis et al., 1999). Da das P0 nur über eine IgG-Domäne verfügt, würde das den Unterschied in der Stärke der homophilen Interaktion erklären. Wenn die interzelluläre Adhäsion der CHO-Zellen, die das wildtypische P0 exprimieren, schon relativ gering ist, ist es schwierig, einen signifikanten Einfluss der Ile106Leu-Mutation zu detektieren. In diesem Experiment wurden transient transfizierte CHO-Zellen verwendet, da eine stabile Transfektion innerhalb des vorgegebenen Zeitrahmens nicht durchgeführt werden konnte. In den meisten publizierten Studien, in denen der Einfluss einer P0-Mutation auf die Zelladhäsion mit Hilfe eines Aggregations-*Assays* untersucht wurde, wurden stabil transfizierte CHO-Zellen verwendet (Lee et al., 2008; Zhang und Filbin, 1994). Da in solchen stabil transfizierten Zelllinien alle vorhandenen CHO-Zellen das wildtypische oder das mutierte P0 exprimieren, war die Zell-Zell-Adhäsion insgesamt stärker ausgeprägt, so dass ein Einfluss der jeweiligen Mutation auch deutlicher erkannt werden konnte. Deshalb könnte eine stabile Transfektion von CHO-Zellen mit dem pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-wt oder dem pcDNA3-FLAG/HIS-P0-*full-length*-mut von Vorteil sein. Dann würden ebenfalls alle CHO-Zellen die wildtypische oder die mutierte Form des P0 exprimieren, und der Einfluss der Mutation könnte wahrscheinlich deutlicher detektiert werden.

5.2. Rekombinante Expression, Reinigung und Charakterisierung des neuralen Zellerkennungsmoleküls L1

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die extrazelluläre Domäne des L1-Proteins der Maus (mL1) als Fusionsprotein mit dem TEV-Fc-Fragment rekombinant exprimiert werden. Das Fusionsprotein sollte von den CHO-Zellen als biologisch aktives Protein in den Zellkulturüberstand sezerniert werden.

5.2.1 Expression der extrazellulären Domäne des murinen L1-Proteins (mL1) in CHO-Zellen

Die extrazelluläre Domäne von mL1 wurde mit einem durch TEV-Protease abspaltbaren Fc-*Tag* in CHO-Zellen produziert. Der Fc-*Tag* diente dabei der Aufreinigung mittels Protein A-Affinitätschromatographie. Das Einfügen des TEV-*Linkers* würde den Vorteil bieten, dass die extrazelluläre Domäne von L1 nach TEV-Spaltung und Entfernung des Fc-*Tags* frei von „ektopischen“ Sequenzen vorliegen würde. Das wäre z. B. bei strukturellen Analysen, wie der Kristallisation, von Vorteil. Die cDNA der extrazellulären Domäne von mL1 und die des TEV-Fc-Fragmentes wurden in den pcDNA3-Vektor kloniert. Der pcDNA3-mL1-ecd-TEV-Fc-Vektor wurde zunächst transient in CHO-Zellen transfiziert. Zuerst sollte sichergestellt werden, dass das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein von den CHO-Zellen exprimiert und in den Überstand sezerniert wurde. Das mL1-TEV-Fc konnte sowohl im Zelllysat als auch im Überstand der transfizierten CHO-Zellen durch *Western Blot* nachgewiesen werden, wobei das Molekulargewicht des sezernierten Fusionsproteins etwa um 30-50 kDa höher war. Auch das als Positivkontrolle verwendete mL1-Fc (Chen et al., 1999) hatte ein etwa 30-50 kDa höheres Molekulargewicht als das im Zelllysat detektierte mL1-TEV-Fc (Daten nicht gezeigt). Das mL1-TEV-Fc enthält einige mutmaßliche Glykosylierungsstellen (Lindner et al., 1983; Rathjen und Schachner, 1984) und wird von den CHO-Zellen höchstwahrscheinlich auch glykosyliert. An das sezernierte Fusionsprotein wurden die Zuckerketten bereits angehängt. Dadurch kann sich auch sein Molekulargewicht, im Gegensatz zum teilweise unvollständig glykosylierten Fusionsprotein im Zelllysat, erhöhen. Nachdem nachgewiesen wurde, dass die CHO-Zellen das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein exprimierten und in den Überstand sezernierten, wurde eine stabil exprimierende Zelllinie hergestellt. Unter den 24 mittels G418 selektierten Klonen war ein Klon, bei dem das Fusionsprotein im Überstand nachgewiesen werden konnte. Für weitere Versuche wurde das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein im 1 l-Maßstab produziert und anschließend über eine Protein A-Säule aufgereinigt. Dabei wurde – ausschließlich in der Elutionsfraktion – neben der *full-length* 250 kDa Bande, die ungefähr dem rechnerischen Molekulargewicht entspricht, eine kleinere Bande detektiert. Diese Bande hat ein Molekulargewicht von ungefähr 200-220 kDa

und wurde mit dem polyklonalen α-mL1-Antikörper, jedoch nicht mit dem HRP-gekoppelten polyklonalen Antikörper gegen das humane Fc-Fragment, nachgewiesen. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um ein Abbauprodukt, bei dem das Fc-Fragment durch Proteolyse während der Aufreinigung abgespalten wurde. Dafür spricht, dass es nicht mit dem Antikörper gegen das Fc-Fragment nachgewiesen werden konnte. Auch wenn nach dem Ende der Produktion dem Überstand Complete Proteasen-Inhibitoren-Cocktail-Tabletten (Roche) zugesetzt wurden, ist es durchaus wahrscheinlich, dass das mL1-TEV-Fc von Proteasen angegriffen wurde. Schon während der Produktion könnte eine Proteolyse begonnen haben, die sich dann während der Aufreinigung fortgesetzt haben könnte, da CHO-Zellen neben Matrix-Metalloproteasen auch Cysteinproteasen ins Medium sezernieren (Satoh et al., 1990; Sandberg et al., 2006). Dass das mL1-TEV-Fc trotz des eingefügten TEV-*Linkers* biologisch aktiv ist, wurde durch seinen positiven Effekt auf das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen nachgewiesen. Dass L1 unter anderem das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen fördert, ist schon lange bekannt (Fischer et al., 1986). So konnte auch gezeigt werden, dass die extrazelluläre Domäne des L1, als Fusionsprotein mit dem Fc-Fragment exprimiert, das Neuritenwachstum und das Überleben von Kleinhirnneuronen fördert (Chen et al., 1999).

Nachdem sichergestellt war, dass das mL1-TEV-Fc biologisch aktiv ist, sollte die Spaltung des Fusionsproteins etabliert werden. Für die Spaltungsversuche wurde hauptsächlich die AcTEV Protease (Invitrogen) verwendet. Sie ist stabiler als die ursprünglich aus dem *tobacco etch virus* isolierte und von Invitrogen rekombinant produzierte rTEV Protease (Nayak et al., 2003). Sowohl die rTEV- als auch die AcTEV Protease haben einen sechsfachen Histidin-*Tag* und wurden in *E. coli* produziert. Im ersten Schritt wurde die Spaltung, wie vom Hersteller empfohlen, in einem Tris-Puffer mit verschiedenen Proteasekonzentrationen durchgeführt. Eine erfolgreiche Spaltung würde durch einen *Shift* im Molekulargewicht des Fusionsproteins, der dem Molekulargewicht des Fc-*Tags* entspricht, deutlich werden. Da für den Fc-*Tag* ein rechnerisches Molekulargewicht von 30 kDa ermittelt wurde, wäre eine Reduktion des Molekulargewichtes von 250 kDa auf 220 kDa zu erwarten gewesen. Es wurde jedoch keine Spaltung beobachtet. Zwar wurden von dem α-mL1-Antikörper zwei Banden detektiert. Da beide Banden aber schon im *Input*

vorhanden waren und keine Verstärkung der 220 kDa-Bande zu erkennen war, kann wahrscheinlich nicht von einer Spaltung durch die TEV-Protease, sondern eher von einem unspezifischen Effekt ausgegangen werden. Zusätzlich konnte mit dem Antikörper gegen das humane Fc-Fragment kein abgespaltenes Fc-Fragment detektiert werden (vergleiche Abb. 4-23). Um sicherzustellen, dass beide TEV-Proteasen aktiv sind, wurde eine Spaltung mit einem Kontrollsubstrat (hL1-TEV-Fc-1-3) durchgeführt. Das hL1-TEV-Fc-1-3-Fusionsprotein besteht aus den ersten drei Fibronektin-Domänen des humanen L1, die als Fusionsprotein mit dem TEV-Fc-Fragment in CHO-Zellen exprimiert wurden (Haspel et al., 2000). Das Kontrollsubstrat wurde sowohl von der rTEV als auch von der AcTEV Protease gespalten. Dies konnte einerseits an dem *Shift* im Molekulargewicht des eluierten hL1 von 90 kDa auf 55 kDa, andererseits an der Elution des Fc-Fragmentes nach dem Kochen der Protein A-*Beads* erkannt werden. Dass in der Elutionsfraktion auch das Fc-Fragment detektiert wurde, könnte darauf zurückgeführt werden, dass einige Moleküle des ungespaltenen Fusionsproteins während der enzymatischen Reaktion nicht an die Protein A-*Beads* gebunden, sondern in Lösung vorlagen. Das gespaltene hL1 wurde auch nach dem Kochen der Protein A-*Beads* detektiert. Wahrscheinlich war das hL1 mit dem noch ungespaltenen, an die *Beads* gebundenen hL1-TEV-Fc assoziiert. Da nun davon ausgegangen werden kann, dass beide im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten TEV-Proteasen aktiv waren, ist es wahrscheinlich, dass das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein kein optimales Substrat für die TEV-Protease darstellt. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte, aufgrund der Größe des mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins und einer möglichen ungünstigen sterischen Konformation, der TEV-*Linker* maskiert und so für die TEV-Protease schwer zugänglich sein. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit der Aggregation des mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins, da die extrazelluläre Domäne des L1 homophil interagieren kann (De Angelis et al., 1999). Dies würde eine Spaltung durch die TEV-Protease ebenfalls erschweren. Um den Linker für die Protease besser zugänglich zu machen, wurde das mL1-TEV-Fc an Protein A-*Beads* gekoppelt. Dem lag die Annahme zugrunde, dass durch die Bindung des mL1-TEV-Fc an die Protein A-*Beads* die Tertiärstruktur des Proteins so verändert werden könnte, dass es eine für die Spaltung günstigere sterische Konformation einnimmt. Die Spaltung wurde dann nach der von Haspel et al. (2000) publizierten Vorschrift in einem PBS-Puffer durchgeführt. Zusätzlich wurde die Inkubationszeit verlängert und die Konzentration

der Protease erhöht. Bei einer erfolgreichen Spaltung des mL1-TEV-Fc hätte die extrazelluläre Domäne des mL1 in der jeweiligen Elutionsfraktion immunologisch nachweisbar sein müssen. Zusätzlich würde sich das Molekulargewicht reduzieren, was durch einen *shift* von 250 auf 220 kDa deutlich werden würde. Trotz der optimierten Bedingungen konnte auch in diesem Versuch keine Spaltung beobachtet werden. Im nächsten Experiment wurde den Spaltungsreaktionen Triton X-100 in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Ein Mitarbeiter von Invitrogen empfahl, die Triton X-100-Konzentration zwischen 0,1 % und 1 % zu variieren. Ein nichtionisches Detergenz wie Triton X-100 eignet sich besonders, da es die Löslichkeit des Proteins erhöht, aber in den meisten Fällen nicht denaturierend wirkt (Geckeler und Eckstein, 1998). Daneben wurden zusätzlich zwei Reaktionspuffer verwendet, der Lysispuffer nach Lyapina et al. (2001) und der von Gingras et al. (2005) beschriebene TEV-Puffer. Diese Puffer enthielten ebenfalls Detergenzien und wurden für die erfolgreiche TEV-Spaltung von Fusionsproteinen verwendet. Bei einer Konzentration von 0,5 % Triton X-100 wurde eine L1-immunreaktive Bande in der Elutionsfraktion detektiert. Im Vergleich zum *Input* war aber kein Unterschied im Molekulargewicht zu erkennen. Daher kann eher von einem unspezifischen Effekt ausgegangen werden. Da ein Zusatz von Detergenzien die AcTEV Protease inhibieren könnte (Lundbäck et al., 2008; Mohanty et al., 2003), wurde die Konzentration der Protease erhöht. Doch auch durch diese Optimierung des Protokolls konnte keine Spaltung des Fusionsproteins durch die AcTEV Protease erreicht werden. Alle Versuche, das mL1-TEV-Fc-Fusionsprotein mit der rTEV und der AcTEV Protease zu spalten, blieben bisher erfolglos. In dieser Arbeit wurde das mL1 als Fusionsprotein mit dem TEV-Fc-Fragment am C-Terminus des Proteins exprimiert. Eine Spaltung des Fusionsproteins könnte dadurch ermöglicht werden, dass zwischen dem C-Terminus des mL1 und dem TEV-*Linker* einige zusätzliche Aminosäuren eingeführt werden (Nallamsetty, 2005). Dafür könnte man z. B. einen Polyglycin-, einen Polyhistidin-, oder einen FLAG-*Tag* verwenden. Weiterhin könnte das mL1 mit dem TEV-Fc-Fragment am N-Terminus exprimiert werden, um eine Spaltung durch die TEV-Protease zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die rekombinante Expression und Reinigung der extrazellulären Domänen der neuralen Zellerkennungsmoleküle P0 und L1. Die gereinigten Proteine sollten für Strukturanalysen verwendet werden. Da es sich sowohl bei P0 als auch bei L1 um Glykoproteine handelt, wurde die rekombinante Expression in eukaryotischen Systemen durchgeführt.

Die extrazelluläre Domäne des Zelladhäsionsmoleküls L1 wurde als Fusionsprotein (L1-TEV-Fc) mit einem durch TEV-Protease spaltbaren Fc-*Tag* in CHO-Zellen exprimiert, die das L1-TEV-Fc in den Zellkulturüberstand sezernierten. Das L1-TEV-Fc konnte erfolgreich über eine Protein A-Säule aufgereinigt werden. Seine biologische Aktivität wurde in einem Neuritenwachstums-*Assay* nachgewiesen. Um strukturelle Analysen an der extrazellulären Domäne durchführen zu können, sollte der Fc-*Tag* mit der TEV-Protease abgespalten werden. Obwohl verschiedene Reaktionsparameter wie Temperatur, Inkubationszeit, Konzentration der TEV-Protease und die Konzentration der Detergenzien variiert wurden, war eine Spaltung des L1-TEV-Fc im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Das Zellerkennungsmolekül P0 ist das häufigste Protein im Myelin des peripheren Nervensystems. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte neben der wildtypischen auch eine mutierte Form der extrazellulären Domäne des P0-Proteins in *Pichia pastoris* exprimiert werden. Die mutierte Form des P0-Proteins enthielt einen Aminosäureaustausch an Position 106 von Isoleucin zu Leucin (Ile106Leu), welcher beim Menschen zu einer schweren Form der Charcot-Marie-Tooth'schen Krankheit vom Typ 1B führt. Sowohl die wildtypische als auch die Ile106Leu-Form der extrazellulären Domäne des P0-Proteins konnten in *Pichia pastoris* exprimiert werden, und wurden als Fusionsproteine mit einem Myc- und einem sechsfachen Histidin-*Tag* in den Überstand sezerniert. Die Aufreinigung erfolgte über Ni-NTA-Agarose-*Beads*. Durch eine Fermentation im 35 l-Maßstab konnten beide Fusionsproteine für strukturelle Analysen in größerer Menge produziert und aufgereinigt werden. Eine anschließende Analyse mittels Dynamischer Laserlichtstreuung (DLS) zeigte, dass die Voraussetzungen für die Durchführung

eines Kristallisations*screens* mit 480 Bedingungen gegeben waren. Durch Deglykosylierung mit N-Glykosidase F und 1D-NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass die extrazelluläre Domäne des wildtypischen P0-Proteins aus *Pichia pastoris* glykosyliert ist. Eine Hyperglykosylierung konnte ausgeschlossen werden. Neben dem Einfluss der Ile106Leu-Mutation auf die Struktur der extrazellulären Domäne wurde auch ihr Einfluss auf die homophile Interaktion des P0-Proteins untersucht. In einem Aggregations-*Assay* mit transient transfizierten CHO-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die das wildtypische P0 voller Länge exprimierten, im Verhältnis zu P0-Ile106Leu-exprimierenden Zellen stärker aggregierten. Die Ile106Leu-Mutation wirkt sich also offenbar negativ auf die homophile Interaktion des P0-Proteins aus.

7. Summary

This thesis was focused on the recombinant expression and purification of the extracellular domains of the neural cell adhesion molecules P0 and L1. The purified proteins should be used for structural analyses. As both P0 and L1 are glycoproteins, recombinant expression was carried out in eukaryotic systems.

The L1 extracellular domain was expressed and secreted as a fusion protein (L1-TEV-Fc) with the TEV protease-cleavable Fc tag by CHO cells. The L1-TEV-Fc could be purified using a protein A column. The biological activity of this fusion protein was confirmed by measuring its neurite outgrowth-promoting effect. To perform structural analysis on the extracellular domain of L1, removal of the Fc tag by TEV protease cleavage was required. Although several parameters were variegated in the enzymatic reaction, including incubation time, temperature, protease concentration, and concentration of detergents, no cleavage of L1-TEV-Fc by TEV protease was observed.

The cell recognition molecule P0 is the most abundant protein of peripheral myelin. One aim of the present study was to express both the wild-type and a mutant form of the extracellular domain of P0 in *Pichia pastoris*. The mutant version of the P0 protein carried an amino acid exchange from isoleucin to leucin at position 106 (Ile106Leu) which causes a severe form of Charcot-Marie-Tooth disease type 1B in humans. Both proteins were expressed and secreted as fusion proteins with a myc tag and a six-fold histidin tag. The purification was carried out using Ni-NTA agarose beads. A fermentation in a 35 l scale was performed for each protein, as large amounts of purified protein were needed for structural analyses. After purifying and concentrating, a dynamic laserlight scattering (DLS) was performed to ascertain that both proteins were present in a sufficient form for crystallization. As both the extracellular domain of wild-type P0 and the ectodomain of P0 Ile106Leu fulfilled this condition, a screen of 480 crystallisation conditions could be performed. The extracellular domain of wild-type P0 was further analysed by 1D-NMR spectroscopy and deglycosylation with N-Glycosidase F. Both experiments confirmed that the P0 was glycosylated by *Pichia pastoris*, and a hyperglycosylation by the yeast could be

excluded. Apart from analysing the influence of the Ile106Leu mutation on the structure of the extracellular domain, the present study aimed at studying its influence on the homophilic interaction of P0. Therefore, an aggregation assay with transiently transfected CHO cells was performed. CHO cells expressing the full-length wild-type P0 aggregated more strongly than cells expressing the full-length P0 Ile106Leu. This finding suggests that the Ile106Leu mutation has a negative effect on the homophilic interaction of P0.

8. Literaturverzeichnis

Agrawal, H. C., R. E. Schmidt and D. Agrawal (1983). "In vivo incorporation of [3H]palmitic acid into PO protein, the major intrinsic protein of rat sciatic nerve myelin." J Biol Chem 258(10): 6556-60.

Alberts, P., R. Rudge, I. Hinners, A. Muzerelle, et al. (2003). "Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion." Mol Biol Cell 14(10): 4207-20.

Amaral, D. G. (2000). The Anatomical Organization of the Central Nervous System. In Principles of neural science, E. R. Kandel, J. H. Schwarz and T. M. Jessell eds. (New York McGraw-Hill): 317-336.

Appel, F., J. Holm, J. F. Conscience, F. von Bohlen und Halbach, et al. (1995). "Identification of the border between fibronectin type III homologous repeats 2 and 3 of the neural cell adhesion molecule L1 as a neurite outgrowth promoting and signal transducing domain." J Neurobiol 28(3): 297-312.

Application Note Satorius. McRae, R., C. Naumann, K. Hoehne and R. Zeidler. "Treatment of Vivaspin concentrators for improved recovery of low-concentrated protein samples. "

Arami, S., M. Jucker, M. Schachner and H. Welzl (1996). "The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial learning in rats." Behav Brain Res 81(1-2): 81-7.

Ausrubel, F. M. (1996). Current Protocols in Molecular Biology. (Brooklyn, New York: Greene Publishing Associate, Inc.).

Balice-Gordon, R. J., L. J. Bone and S. S. Scherer (1998). "Functional gap junctions in the schwann cell myelin sheath." J Cell Biol 142(4): 1095-104.

Baron, P., M. Shy, H. Honda, M. Sessa, et al. (1994). "Developmental expression of P0 mRNA and P0 protein in the sciatic nerve and the spinal nerve roots of the rat." J Neurocytol 23(4): 249-57.

Barr, K.A., Hopkins, S.A. and Sreekrishna, K. 1992. Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. Pharm Eng 12: 48−51

Bartsch, U., F. Kirchhoff and M. Schachner (1989). "Immunohistological localization of the adhesion molecules L1, N-CAM, and MAG in the developing and adult optic nerve of mice." J Comp Neurol 284(3): 451-62.

Becker, D. M. and L. Guarente (1991). "High-efficiency transformation of yeast by electroporation." Methods Enzymol 194: 182-7.

Bizzozero, O. A., T. S. Odykirk, J. F. McGarry and M. B. Lees (1989). "Separation of the major proteins of central and peripheral nervous system myelin using reversed-phase high-performance liquid chromatography." Anal Biochem 180(1): 59-65.

Björk, L., and G. Kornvall (1984): "Purification and some properties of Streptococcal protein G, a. novel lgG binding reagent." J Immunol 133: 969-974

Bond J. P., R. A. Saavedra and D. Kirschner (2001). "Expression and Purification of the Extrazellular Domain of Human Myelin Protein Zero." Protein Expr Purif 23: 398-410

Brankamp, R. G., K. Sreekrishna, P. L. Smith, D. T. Blankenship, et al. (1995). "Expression of a synthetic gene encoding the anticoagulant-antimetastatic protein ghilanten by the methylotropic yeast *Pichia pastoris*." Protein Expr Purif 6(6): 813-20.

Bretthauer, R. K. and F. J. Castellino (1999). "Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins." Biotechnol Appl Biochem 30 (Pt 3): 193-200.

Brierley, R. A. (1998). "Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I)." Methods Mol Biol 103: 149-77.

Brodmann, K. (1908). Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. (Ambrosius Barth Verlag)

Bronner-Fraser, M. (1987). "Perturbation of cranial neural crest migration by the HNK-1 antibody." Dev Biol 123(2): 321-31.

Brummendorf, T. and F. G. Rathjen (1995). "Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily." Protein Profile 2(9): 963-1108.

Buchstaller, A., S. Kunz, P. Berger, B. Kunz, et al. (1996). "Cell adhesion molecules NgCAM and axonin-1 form heterodimers in the neuronal membrane and cooperate in neurite outgrowth promotion." J Cell Biol 135(6 Pt 1): 1593-607.

Buckholz, R. G. and M. A. Gleeson (1991). "Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins." Biotechnology (N Y) 9(11): 1067-72.

Burger, D., G. Perruisseau, M. Simon and A. J. Steck (1992a). "Comparison of the N-linked oligosaccharide structures of the two major human myelin glycoproteins MAG and P0: assessment and relative occurrence of oligosaccharide structures by serial lectin affinity chromatography of 14C-glycopeptides." J Neurochem 58(3): 845-53.

Burger, D., G. Perruisseau, M. Simon and A. J. Steck (1992b). "Comparison of the N-linked oligosaccharide structures of the two major human myelin glycoproteins MAG and P0: assessment of the structures bearing the epitope for HNK-1 and human monoclonal immunoglobulin M found in demyelinating neuropathy." J Neurochem 58(3): 854-61.

Burnette, W. N. (1981). ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and

radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem 112(2): 195-203.

Castellani, V., A. Chedotal, M. Schachner, C. Faivre-Sarrailh, et al. (2000). "Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance." Neuron 27(2): 237-49.

Cereghino, J. L. and J. M. Cregg (2000). "Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." FEMS Microbiol Rev 24(1): 45-66.

Cereghino, G. P., J. L. Cereghino, C. Ilgen and J. M. Cregg (2002). "Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*." Curr Opin Biotechnol 13(4):329-32.

Chen, S., N. Mantei, L. Dong and M. Schachner (1999). "Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1." J Neurobiol 38(3): 428-39.

Choi, B. K., P. Bobrowicz, R. C. Davidson, S. R. Hamilton, et al. (2003). "Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*." Proc Natl Acad Sci U S A 100(9): 5022-7.

Clare, J. J., M. A. Romanos, F. B. Rayment, J. E. Rowedder, et al. (1991). "Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies." Gene 105(2): 205-12.

Cohen, N. R., J. S. Taylor, L. B. Scott, R. W. Guillery, et al. (1998). "Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1." Curr Biol 8(1): 26-33.

Colman, D. R. and M. T. Filbin (1999). Cell adhesion Molecules. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. G. J. A. Siegel, Bernard W.; Albers, R. Wayne; Fisher, Stephen K.; Uhler, Michael D.,. Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins.

Couderc R, Baratti J (1980) Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of the alcohol oxidase. Agric Biol Chem 44:2279–2289

Cregg, J. M., K. J. Barringer, A. Y. Hessler and K. R. Madden (1985). "*Pichia pastoris* as a host system for transformations." Mol Cell Biol 5(12): 3376-85.

Cregg, J. M. and K. R. Madden (1989). "Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers." Mol Gen Genet 219(1-2): 320-3.

Cregg, J. M., J. L. Cereghino, J. Shi and D. R. Higgins (2000). "Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*." Mol Biotechnol 16(1): 23-52.

Cribb, R. C., F. T. Haddadin, J. S. Lee and K. Webb (2008). "Baculovirus expression and bioactivity of a soluble 140 kDa extracellular cleavage fragment of L1 neural cell adhesion molecule." Protein Expr Purif 57(2): 172-9.

Crossin, K. L. and L. A. Krushel (2000). "Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily." Dev Dyn 218(2): 260-79.

Dahme, M., U. Bartsch, R. Martini, B. Anliker, et al. (1997). "Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system." Nat Genet 17(3): 346-9.

De Angelis, E., J. MacFarlane, J. S. Du, G. Yeo, et al. (1999). "Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities." Embo J 18(17): 4744-53.

di Guan, C., P. Li, P. D. Riggs and H. Inouye (1988). "Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein." Gene 67(1): 21-30.

Ding, Y. and K. R. Brunden (1994). "The cytoplasmic domain of myelin glycoprotein P0 interacts with negatively charged phospholipid bilayers." J Biol Chem 269(14): 10764-70.

Doherty, P., E. Williams and F. S. Walsh (1995). "A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth." Neuron 14(1): 57-66.

Dow, K. E., S. E. Mirski, J. C. Roder and R. J. Riopelle (1988). "Neuronal proteoglycans: biosynthesis and functional interaction with neurons in vitro." J Neurosci 8(9): 3278-89.

D'Urso, D., P. J. Brophy, S. M. Staugaitis, C. S. Gillespie, et al. (1990). "Protein zero of peripheral nerve myelin: biosynthesis, membrane insertion, and evidence for homotypic interaction." Neuron 4(3): 449-60.

Eckart, M. R. and C. M. Bussineau (1996). "Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast." Curr Opin Biotechnol 7(5): 525-30.

Eichberg, J. (2002). "Myelin P0: new knowledge and new roles." Neurochem Res 27(11): 1331-40.

Fahrig, T., B. Schmitz, D. Weber, A. Kucherer-Ehret, et al. (1990). "Two Monoclonal Antibodies Recognizing Carbohydrate Epitopes on Neural Adhesion Molecules Interfere with Cell Interactions." Eur J Neurosci 2(2): 153-161.

Felding-Habermann, B., S. Silletti, F. Mei, C. H. Siu, et al. (1997). "A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins." J Cell Biol 139(6): 1567-81.

Fernandez, J. M. and J. P. Hoeffler, eds. (1998) Gene expression systems. Using nature for the art of expression. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.

Field, M. C., D. R. Wing, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, et al. (1992). "Detection of multisulphated N-linked glycans in the L2/HNK-1 carbohydrate epitope expressing neural adhesion molecule P0." J Neurochem 58(3): 993-1000.

Filbin, M. T. and G. I. Tennekoon (1990). "High level of expression of the myelin protein P0 in Chinese hamster ovary cells." J Neurochem 55(2): 500-5.

Filbin, M. T. and G. I. Tennekoon (1993). "Homophilic adhesion of the myelin P0 protein requires glycosylation of both molecules in the homophilic pair." J Cell Biol 122(2): 451-9.

Filbin, M. T. and G. I. Tennekoon (1991). "The role of complex carbohydrates in adhesion of the myelin protein, P0." Neuron 7(5): 845-55.

Filbin, M. T., F. S. Walsh, B. D. Trapp, J. A. Pizzey, et al. (1990). "Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule." Nature 344(6269): 871-2.

Fischer, G., V. Kunemund and M. Schachner (1986). "Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1." J Neurosci 6(2): 605-12.

Fransen, E., V. Lemmon, G. Van Camp, L. Vits, et al. (1995). "CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1." Eur J Hum Genet 3(5): 273-84.

Fransen, E., G. Van Camp, R. D'Hooge, L. Vits, et al. (1998). "Genotype-phenotype correlation in L1 associated diseases." J Med Genet 35(5): 399-404.

Friedlander, D. R., P. Milev, L. Karthikeyan, R. K. Margolis, et al. (1994). "The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth." J Cell Biol 125(3): 669-80.

Gabreels-Festen, A. A., J. E. Hoogendijk, P. H. Meijerink, F. J. Gabreels, et al. (1996). "Two divergent types of nerve pathology in patients with different P0 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease." Neurology 47(3): 761-5.

Garcia-Alonso, L., S. Romani and F. Jimenez (2000). "The EGF and FGF receptors mediate neuroglian function to control growth cone decisions during sensory axon guidance in Drosophila." Neuron 28(3): 741-52.

Geckeler, K. E. and H. Eckstein (1998): Bioanalytische und biochemische Labormethoden, Vieweg-Lehrbuch, Springer-Verlag, Berlin

Gingras, A. R., W. H. Ziegler, R. Frank, I. L. Barsukov, et al. (2005). "Mapping and consensus sequence identification for multiple vinculin binding sites within the talin rod." J Biol Chem 280(44): 37217-24.

Gopalkrishnan, R. V., K. A. Christiansen, N. I. Goldstein, R. A. DePinho, et al. (1999). "Use of the human EF-1alpha promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells." Nucleic Acids Res 27(24): 4775-82.

Gouveia, R. M., C. M. Gomes, M. Sousa, P. M. Alves, et al. (2008). "Kinetic analysis of L1 homophilic interaction: role of the first four immunoglobulin domains and implications on binding mechanism." J Biol Chem 283(42): 28038-47.

Gouveia, R. M., V. A. Morais, C. Peixoto, M. Sousa, et al. (2007). "Production and purification of functional truncated soluble forms of human recombinant L1 cell adhesion glycoprotein from Spodoptera frugiperda Sf9 cells." Protein Expr Purif 52(1): 182-93.

Greenfield S., S. Brostoff, E. H. Eylar and P. Morell (1973). "Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. " J. Neurochem. 20: 1207-16.

Griffith, L. S., B. Schmitz and M. Schachner (1992). "L2/HNK-1 carbohydrate and protein-protein interactions mediate the homophilic binding of the neural adhesion molecule P0." J Neurosci Res 33(4): 639-48.

Grinna, L. S. and J. F. Tschopp (1989). "Size distribution and general structural features of N-linked oligosaccharides from the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*." Yeast 5(2): 107-15.

Grumet, M. (1992). "Structure, expression, and function of Ng-CAM, a member of the immunoglobulin superfamily involved in neuron-neuron and neuron-glia adhesion." J Neurosci Res 31(1): 1-13.

Grumet, M. and G. M. Edelman (1988). "Neuron-glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanisms." J Cell Biol 106(2): 487-503.

Grumet, M., D. R. Friedlander and T. Sakurai (1996). "Functions of brain chondroitin sulfate proteoglycans during developments: interactions with adhesion molecules." Perspect Dev Neurobiol 3(4): 319-30.

Hall, H., L. Liu, M. Schachner and B. Schmitz (1993). "The L2/HNK-1 carbohydrate mediates adhesion of neural cells to laminin." Eur J Neurosci 5(1): 34-42.

Hall, H., R. Deutzmann, R. Timpl, L. Vaughan, et al. (1997). "HNK-1 carbohydrate-mediated cell adhesion to laminin-1 is different from heparin-mediated and sulfatide-mediated cell adhesion." Eur J Biochem 246(1): 233-42.

Hamilton, S. R., R. C. Davidson, N. Sethuraman, J. H. Nett, et al. (2006). "Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins." Science 313(5792): 1441-3.

Haspel, J., D. R. Friedlander, N. Ivgy-May, S. Chickramane, et al. (2000). "Critical and optimal Ig domains for promotion of neurite outgrowth by L1/Ng-CAM." J Neurobiol 42(3): 287-302.

Haspel, J. and M. Grumet (2003). "The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes." Front Biosci 8: s1210-25.

Helenius, A. and M. Aebi (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." Science 291(5512): 2364-9.

Higgins, D. R., K. Busser, J. Comiskey, P. S. Whittier, et al. (1998). "Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection." Methods Mol Biol 103: 41-53.

Higgins, D. R. and J. M. Cregg (1998). "Introduction to *Pichia pastoris*." Methods Mol Biol 103: 1-15.

Hohenblum H., B. Gasser, M. Maurer, N. Borth, et al. (2004). "Effects of Gene Dosage, Promoters, and Substrates on Unfolded Protein Stress of Recombinant *Pichia pastoris*." Biotechnol Bioeng 85(4): 367-75.

Horstkorte, R., M. Schachner, J. P. Magyar, T. Vorherr, et al. (1993). "The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth." J Cell Biol 121(6): 1409-21.

Hortsch, M. (2000). "Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one?" Mol Cell Neurosci 15(1): 1-10.

Hynes, R. O. (1992). "Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily." Curr Opin Genet Dev 2(4): 621-4.

Inouye, H. and D. A. Kirschner (1988). "Membrane interactions in nerve myelin. I. Determination of surface charge from effects of pH and ionic strength on period." Biophys J 53(2): 235-45.

Ishaque, A., M. W. Roomi, I. Szymanska, S. Kowalski, et al. (1980). "The P0 glycoprotein of peripheral nerve myelin." Can J Biochem 58(10): 913-21.

Jacob, J., J. Haspel, N. Kane-Goldsmith and M. Grumet (2002). "L1 mediated homophilic binding and neurite outgrowth are modulated by alternative splicing of exon 2." J Neurobiol 51(3): 177-89.

Jayapal K. P., K. F. Wlaschin, W-S hu and M. G. S. Yap. "Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells-20 Years and Counting. CHO Consortium SBE Special Section: 40-47

Johnson, P. W., W. Abramow-Newerly, B. Seilheimer, R. Sadoul, et al. (1989). "Recombinant myelin-associated glycoprotein confers neural adhesion and neurite outgrowth function." Neuron 3(3): 377-85.

Jouet, M., A. Rosenthal and S. Kenwrick (1995). "Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells." Brain Res Mol Brain Res 30(2): 378-80.

Kadmon, G., A. Kowitz, P. Altevogt and M. Schachner (1990). "The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions." J Cell Biol 110(1): 193-208.

Kamiguchi, H. and V. Lemmon (2000). "IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth." Curr Opin Cell Biol 12(5): 598-605.

Kamiguchi, H., K. E. Long, M. Pendergast, A. W. Schaefer, et al. (1998). "The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway." J Neurosci 18(14): 5311-21.

Kamiguchi, H. and F. Yoshihara (2001). "The role of endocytic l1 trafficking in polarized adhesion and migration of nerve growth cones." J Neurosci 21(23): 9194-203.

Kao, F. T. and T. T. Puck (1968). "Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells." Proc Natl Acad Sci U S A 60(4): 1275-81.

Keilhauer, G., A. Faissner and M. Schachner (1985). "Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies." Nature 316(6030): 728-30.

Kemler, R. and M. Ozawa (1989). "Uvomorulin-catenin complex: cytoplasmic anchorage of a Ca2+-dependent cell adhesion molecule." Bioessays 11(4): 88-91.

Kenwrick, S., A. Watkins and E. De Angelis (2000). "Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations." Hum Mol Genet 9(6): 879-86.

Kirschner, D. A. and A. L. Ganser (1980). "Compact myelin exists in the absence of basic protein in the shiverer mutant mouse." Nature 283(5743): 207-10.

Kirschner, D. A., and A. E. Blaurock. 1992. "Organization, phylogenetic variations and dynamic transitions of myelin structure. " In Myelin: Biology and Chemistry. R. E. Martenson, editor. CRC Press, Boca Raton, FL.: 3–78.

Konde, V. and J. Eichberg (2006). "Myelin protein zero: mutations in the cytoplasmic domain interfere with its cellular trafficking." J Neurosci Res 83(6): 957-64.

Kroll, D. J., H. Abdel-Malek Abdel-Hafiz, T. Marcell, S. Simpson, et al. (1993). "A multifunctional prokaryotic protein expression system: overproduction, affinity purification, and selective detection." DNA Cell Biol 12(5): 441-53.

Kruse, J., G. Keilhauer, A. Faissner, R. Timpl, et al. (1985). "The J1 glycoprotein--a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family." Nature 316(6024): 146-8.

Kucherer, A., A. Faissner and M. Schachner (1987). "The novel carbohydrate epitope L3 is shared by some neural cell adhesion molecules." J Cell Biol 104(6): 1597-602.

Kulahin, N., C. Kasper, M. Gajhede, V. Berezin, et al. (2004). "Expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of extracellular modules of the neural cell-adhesion molecules NCAM and L1." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60 (Pt 3): 591-3.

Kulahin, N., C. Kasper, O. Kristensen, J. S. Kastrup, et al. (2005). "Expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of the extracellular Ig modules I-IV and F3 modules I-III of the neural cell-adhesion molecule L1." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 61(Pt 9): 858-60.

Kunz, S., M. Spirig, C. Ginsburg, A. Buchstaller, et al. (1998). "Neurite fasciculation mediated by complexes of axonin-1 and Ng cell adhesion molecule." J Cell Biol 143(6): 1673-90.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-5.

Lagenaur, C. and V. Lemmon (1987). "An L1-like molecule, the 8D9 antigen, is a potent substrate for neurite extension." Proc Natl Acad Sci U S A 84(21): 7753-7.

Law, J. W., A. Y. Lee, M. Sun, A. G. Nikonenko, et al. (2003). "Decreased anxiety, altered place learning, and increased CA1 basal excitatory synaptic transmission in mice with conditional ablation of the neural cell adhesion molecule L1." J Neurosci 23(32): 10419-32.

Lee, Y. C., C. T. Yu, K. P. Lin, M. H. Chang, et al. (2008). "MPZ mutation G123S characterization: evidence for a complex pathogenesis in CMT disease." Neurology 70(4): 273-7.

Lemke, G. (1993). "The molecular genetics of myelination: an update." Glia 7(4): 263-71.

Lemke, G. and R. Axel (1985). "Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin." Cell 40(3): 501-8.

Lemke, G., E. Lamar and J. Patterson (1988). "Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero." Neuron 1(1): 73-83.

Lemmon, V., K. L. Farr and C. Lagenaur (1989). "L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism." Neuron 2(6): 1597-603.

Li, Z., F. Xiong, Q. Lin, M. d'Anjou, et al. (2001). "Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*." Protein Expr Purif 21(3): 438-45.

Lindner, J., F. G. Rathjen and M. Schachner (1983). "L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum." Nature 305(5933): 427-30.

Loers, G., S. Chen, M. Grumet and M. Schachner (2005). "Signal transduction pathways implicated in neural recognition molecule L1 triggered neuroprotection and neuritogenesis." J Neurochem 92(6): 1463-76.

Loewen, M. C., X. Liu, P. L. Davies and A. J. Daugulis (1997). "Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*." Appl Microbiol Biotechnol 48(4): 480-6

Lundback, A. K., S. van den Berg, H. Hebert, H. Berglund, et al. (2008). "Exploring the activity of tobacco etch virus protease in detergent solutions." Anal Biochem 382(1): 69-71.

Lunn, G. and E. B. Sansone (1994). "Degradation and disposal of some enzyme inhibitors. Scientific note." Appl Biochem Biotechnol 48(2): 57-9.

Luthi, A., B. H. Gahwiler and U. Gerber (1994). "Potentiation of a metabotropic glutamatergic response following NMDA receptor activation in rat hippocampus." Pflugers Arch 427(1-2): 197-202.

Lyapina, S., G. Cope, A. Shevchenko, G. Serino, et al. (2001). "Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome." Science 292(5520): 1382-5.

Macauley-Patrick, S., M. L. Fazenda, B. McNeil and L. M. Harvey (2005). "Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system." Yeast 22(4): 249-70.

Mandich, P., G. L. Mancardi, A. Varese, S. Soriani, et al. (1999). "Congenital hypomyelination due to myelin protein zero Q215X mutation." Ann Neurol 45(5): 676-8.

Markwardt, F. (1982). "Approaches for designing synthetic, low molecular weight inhibitors of clotting enzymes." Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch 109(1): 7-15.

Martini, R. and M. Schachner (1986). "Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve." J Cell Biol 103(6 Pt 1): 2439-48.

Matthieu, J. M., J. L. Everly, R. O. Brady and R. H. Quarles (1975). "[35-S]sulfate incorporation into myelin clycoproteins; II. Peripheral nervous tissue." Biochim Biophys Acta 392(1): 167-74.

McPherson, A. (1982). "Crystallization: Vapour diffusion in hanging drops. Preparation and analysis of protein crystals." New York: John Wiley and Sons.: 96-97.

McPherson, A. (1990). "Current approaches to macromolecular crystallization." Eur J Biochem 189(1): 1-23.

McPherson, A. (1999). Crystallization of Biological Macromolecules. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Mechtersheimer, S., P. Gutwein, N. Agmon-Levin, A. Stoeck, et al. (2001). "Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins." J Cell Biol 155(4): 661-73.

Menendez, J., L. Hernandez, A. Banguela and J. Pais (2004). "Functional production and secretion of the *Gluconoacetobacter diazatrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*." Enz Microb Technol 34(5): 446-52.

Mitra, N., S. Sinha, T. N. Ramya and A. Surolia (2006). "N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function." Trends Biochem Sci 31(3): 156-63.

Mohanty, A. K., C. R. Simmons and M. C. Wiener (2003). "Inhibition of tobacco etch virus protease activity by detergents." Protein Expr Purif 27(1): 109-14.

Moos, M., R. Tacke, H. Scherer, D. Teplow, et al. (1988). "Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin." Nature 334(6184): 701-3.

Morales, G., J. M. Sanchez-Puelles, U. Schwarz and E. J. de la Rosa (1996). "Synergistic neurite-outgrowth promoting activity of two related axonal proteins, Bravo/Nr-CAM and G4/Ng-CAM in chicken retinal explants." Eur J Neurosci 8(6): 1098-105.

Morell, P. and R. H. Quarles (1999). Myelin Formation, Structure and Biochemistry. In Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W., Fisher, S. K., Uhler, M. D. (Eds.), Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Philadelphia u. a.: Lippincott-Raven.

Moya, G. E., R. C. Michaelis, L. W. Holloway and J. M. Sanchez (2002). "Prenatal diagnosis of L1 cell adhesion molecule mutations. Capabilities and limitations." Fetal Diagn Ther 17(2): 115-9.

Mugnaini, E., K. K. Osen, B. Schnapp and V. L. Friedrich, Jr. (1977). "Distribution of Schwann cell cytoplasm and plasmalemmal vesicles (caveolae) in peripheral myelin sheaths. An electron microscopic study with thin sections and freeze-fracturing." J Neurocytol 6(6): 647-68.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Biotechnology 24: 17-27.

Nallamsetty, S. and D. S. Waugh (2007). "Mutations that alter the equilibrium between open and closed conformations of Escherichia coli maltose-binding protein impede its ability to enhance the solubility of passenger proteins." Biochem Biophys Res Commun 364(3): 639-44.

Nayak, S., L. Li and J. Lee (2003). "Enhanced TEV Protease extends enzyme stability for long-term activity. " Focus (Zeitschrift der Firma Invitrogen) 25.3: 12-14

North, M.J. (1969) in: Proteolytic Enzymes - A Practical Approach (Beynon, P.J. & Bond, J.S. eds.) IRL press Oxford, pp. 117-119.

Norton, P. A. and C. J. Pachuk (2003). "Methods for DNA introduction into mammalian cells. " in Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells. (ed. Makrides, S. C.) 265-277 (Elsevier Science BV, Amsterdam, 2003)

Owens, G. C. and R. P. Bunge (1991). "Schwann cells infected with a recombinant retrovirus expressing myelin-associated glycoprotein antisense RNA do not form myelin." Neuron 7(4): 565-75.

Parks, T. D., K. K. Leuther, E. D. Howard, S. A. Johnston, et al. (1994). "Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase." Anal Biochem 216(2): 413-7.

Persohn, E. and M. Schachner (1990). "Immunohistological localization of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM in the developing hippocampus of the mouse." J Neurocytol 19(6): 807-19.

Polayes, D.A., A. Goldstein, G. Ward, and A. J. J. Hughes (1994). "TEV protease, recombinant: a site-specific protease for efficient cleavage of affinity tags from expressed proteins". Focus (Zeitschrift der Firma Invitrogen) 16:2-5.

Poltorak, M., R. Sadoul, G. Keilhauer, C. Landa, et al. (1987). "Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuron-oligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction." J Cell Biol 105(4): 1893-9.

Porath, J., J. Carlsson, I. Olsson and G. Belfrage (1975). "Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation." Nature 258(5536): 598-9.

Puck, T. T. (1985). "Development of the Chinese Hamster Ovary (CHO) Cell." Molecular Cell Genetics. M. M. Gottesman. New York, John Wiley and Sons. 1: 37-64

Rautenstrauß, B., J. R. Lupski, V. Timmerman (2000). "Europäische Leitlinien zur molekulargenetischen Diagnostik der Charcot-Marie-Tooth’schen Erkrankung des Typs 1A sowie der tomakulösen Neuropathie." Verlag medizinischegenetik Sonderdruck 7. Auflage Okt. 2001

Rathjen, F. G. and M. Schachner (1984). "Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion." Embo J 3(1): 1-10.

Rathjen, F. G., J. M. Wolff, R. Frank, F. Bonhoeffer, et al. (1987). "Membrane glycoproteins involved in neurite fasciculation." J Cell Biol 104(2): 343-53.

Reichardt, L. F. and K. J. Tomaselli (1991). "Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development." Annu Rev Neurosci 14: 531-70.

Ridder, R., R. Schmitz, F. Legay and H. Gram (1995). "Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*." Biotechnology (N Y) 13(3): 255-60.

Ringold, G., B. Dieckmann and F. Lee (1981). "Co-expression and amplification of dihydrofolate reductase cDNA and the Escherichia coli XGPRT gene in Chinese hamster ovary cells." J Mol Appl Genet 1(3): 165-75.

Riopelle, R. J., R. C. McGarry and J. C. Roder (1986). "Adhesion properties of a neuronal epitope recognized by the monoclonal antibody HNK-1." Brain Res 367 (1-2): 20-5.

Ritchie, R. J. (1984). "A critical assessment of the use of lipophilic cations as membrane potential probes." Prog Biophys Mol Biol 43(1): 1-32.

Romanos, M. A., F. J. Hughes, S. A. Comerford and C. A. Scorer (1995). "Production of a phosphorylated GST::HPV-6 E7 fusion protein using a yeast expression vector and glutathione S-transferase fusions." Gene 152(1): 137-8.

Rosenfeld, S. A., O. H. Ross, M. C. Hillman, J. I. Corman, et al. (1996). "Production and purification of human fibroblast collagenase (MMP-1) expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." Protein Expr Purif 7(4): 423-30.

Runker, A. E., I. Kobsar, T. Fink, G. Loers, et al. (2004). "Pathology of a mouse mutation in peripheral myelin protein P0 is characteristic of a severe and early onset form of human Charcot-Marie-Tooth type 1B disorder." J Cell Biol 165(4): 565-73.

Sadoul, R., T. Fahrig, U. Bartsch and M. Schachner (1990). "Binding properties of liposomes containing the myelin-associated glycoprotein MAG to neural cell cultures." J Neurosci Res 25(1): 1-13.

Saffell, J. L., E. J. Williams, I. J. Mason, F. S. Walsh, et al. (1997). "Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs." Neuron 18(2): 231-42.

Saghatelyan, A. K., A. G. Nikonenko, M. Sun, B. Rolf, et al. (2004). "Reduced GABAergic transmission and number of hippocampal perisomatic inhibitory synapses in juvenile mice deficient in the neural cell adhesion molecule L1." Mol Cell Neurosci 26(1): 191-203.

Sakamoto, Y., K. Kitamura, K. Yoshimura, T. Nishijima, et al. (1987). "Complete amino acid sequence of PO protein in bovine peripheral nerve myelin." J Biol Chem 262(9): 4208-14.

Samaddar, M., J. F. Catterall and R. R. Dighe (1997). "Expression of biologically active beta subunit of bovine follicle-stimulating hormone in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." Protein Expr Purif 10(3):345-55.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition. Cold Spring Habour Laboratory Press, New York.

Sandberg, H., D. Lutkemeyer, S. Kuprin, M. Wrangel, et al. (2006). "Mapping and partial characterization of proteases expressed by a CHO production cell line." Biotechnol Bioeng 95(5): 961-71.

Sanes, J. R. (1989). "Extracellular matrix molecules that influence neural development." Annu Rev Neurosci 12: 491-516.

Satoh, M., S. Hosoi and S. Sato (1990). "Chinese hamster ovary cells continuously secrete a cysteine endopeptidase." In Vitro Cell Dev Biol 26(11): 1101-4.

Schneider-Schaulies, J., A. von Brunn and M. Schachner (1990). "Recombinant peripheral myelin protein P0 confers both adhesion and neurite outgrowth-promoting properties." J Neurosci Res 27(3): 286-97.

Schurmann, G., J. Haspel, M. Grumet and H. P. Erickson (2001). "Cell adhesion molecule L1 in folded (horseshoe) and extended conformations." Mol Biol Cell 12(6): 1765-73.

Seilheimer, B., E. Persohn and M. Schachner (1989). "Neural cell adhesion molecule expression is regulated by Schwann cell-neuron interactions in culture." J Cell Biol 108(5): 1909-15.

Shapiro, L., J. P. Doyle, P. Hensley, D. R. Colman, et al. (1996). "Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin." Neuron 17(3): 435-49.

Shy, M. E., Y. Shi, L. Wrabetz, J. Kamholz, et al. (1996). "Axon-Schwann cell interactions regulate the expression of c-jun in Schwann cells." J Neurosci Res 43(5): 511-25.

Shy, M. E., A. Jani, K. Krajewski, M. Grandis, et al. (2004). "Phenotypic clustering in MPZ mutations." Brain 127(Pt 2): 371-84.

Shy, M. E. (2006). "Therapeutic strategies for the inherited neuropathies." Neuromolecular Med 8(1-2): 255-78.

Silletti, S., F. Mei, D. Sheppard and A. M. Montgomery (2000). "Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment." J Cell Biol 149(7): 1485-502.

Simon, H., S. Klinz, T. Fahrig and M. Schachner (1991). "Molecular Association of the Neural Adhesion Molecules L1 and N-CAM in the Surface Membrane of Neuroblastoma Cells is Shown by Chemical Cross-linking." Eur J Neurosci 3(7): 634-640.

Singh, H. and N. Spritz (1976). "Protein kinases associated with peripheral nerve myelin. 1. Phosphorylation of endogenous myelin proteins and exogenous substrates." Biochim Biophys Acta 448(2): 325-37.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem 150(1): 76-85.

Sreekrishna, K., L. Nelles, R. Potenz, J. Cruse et al. (1989). "High Level Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Human Tumor Necrosis Factor Synthesized in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*." Biochemistry 28(9): 4117-4125.

Sreekrishna, K., R. G. Brankamp, K. E. Kropp, D. T. Blankenship et al. (1997). "Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*." Gene 190, 55–62.

Stanley, P. and L. Siminovitch (1977). "Complementation between mutants of CHO cells resistant to a variety of plant lectins." Somatic Cell Genet 3(4): 391-405.

Suter, U. and S. S. Scherer (2003). "Disease mechanisms in inherited neuropathies." Nat Rev Neurosci 4(9): 714-26.

Takeda, Y., H. Asou, Y. Murakami, M. Miura, et al. (1996). "A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis." J Neurochem 66(6): 2338-49.

Takeichi, M. (1991). "Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator." Science 251(5000): 1451-5.

Tarentino, A. L., C. M. Gomez and T. H. Plummer, Jr. (1985). "Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F." Biochemistry 24(17): 4665-71.

Tjio, J. H. and T. T. Puck (1958). "Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture." J Exp Med 108(2): 259-68.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A 76(9): 4350-4.

Tschopp, J. F., P. F. Brust, J. M. Cregg, C. A. Stillman, et al. (1987). "Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*." Nucleic Acids Res 15(9): 3859-76.

Uyemura, K. and K. Kitamura (1991). "Comparative studies on myelin proteins in mammalian peripheral nerve." Comp Biochem Physiol C 98(1): 63-72.

Van Camp, G., E. Fransen, L. Vits, G. Raes, et al. (1996). "A locus-specific mutation database for the neural cell adhesion molecule L1CAM (Xq28)." Hum Mutat 8(4): 391.

Verostek, M. F. and R. B. Trimble (1995). "Mannosyltransferase activities in membranes from various yeast strains." Glycobiology 5(7): 671-81.

Voller, A., D. E. Bidwell and A. Bartlett (1976). "Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice." Bull World Health Organ 53(1): 55-65.

Weller, S. and J. Gartner (2001). "Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene." Hum Mutat 18(1): 1-12.

Williams, A. F. and A. N. Barclay (1988). "The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition." Annu Rev Immunol 6: 381-405.

Wisco, D., E. D. Anderson, M. C. Chang, C. Norden, et al. (2003). "Uncovering multiple axonal targeting pathways in hippocampal neurons." J Cell Biol 162(7): 1317-28.

Wong, E. V., S. Kenwrick, P. Willems and V. Lemmon (1995). "Mutations in the cell adhesion molecule L1 cause mental retardation." Trends Neurosci 18(4): 168-72.

Wong, M. H. and M. T. Filbin (1996). "Dominant-negative effect on adhesion by myelin Po protein truncated in its cytoplasmic domain." J Cell Biol 134(6): 1531-41.

Wood, P. M., M. Schachner and R. P. Bunge (1990). "Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule." J Neurosci 10(11): 3635-45.

Wurm, F. M. (2004). "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells." Nat Biotechnol 22(11): 1393-8.

Yamasaki, M., P. Thompson and V. Lemmon (1997). "CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease." Neuropediatrics 28(3): 175-8.

Yip, P. M., X. Zhao, A. M. Montgomery and C. H. Siu (1998). "The Arg-Gly-Asp motif in the cell adhesion molecule L1 promotes neurite outgrowth via interaction with the alphavbeta3 integrin." Mol Biol Cell 9(2): 277-90.

Zhang, K. and M. T. Filbin (1994). "Formation of a disulfide bond in the immunoglobulin domain of the myelin P0 protein is essential for its adhesion." J Neurochem 63(1): 367-70.

Zhang, S. M., R. Marsh, N. Ratner and R. Brackenbury (1995). "Myelin glycoprotein P0 is expressed at early stages of chicken and rat embryogenesis." J Neurosci Res 40(2): 241-50.

Zhao, X. and C. H. Siu (1995). "Colocalization of the homophilic binding site and the neuritogenic activity of the cell adhesion molecule L1 to its second Ig-like domain." J Biol Chem 270(49): 29413-21.

10 Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
BME	*Basal Medium Eagle*
BMGY-Medium	*buffered glycerol complex*-Medium
BMMY-Medium	*buffered methanol complex*-Medium
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	*complementary deoxyribonucleid acid*
C-Terminus	Carboxy-Terminus
D_2O	schweres Wasser
dd H_2O	doppelt destilliertes Wasser
DFP	Diisopropylfluorophosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	*deoxyribonucleotide triphosphate*
DTT	Dithiotreitol
E. coli	*Escherischia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et aliter
Fa.	Firma
FCS	*fetal calf serum*
GMEM	*Glasgow`s Minimal Essential Medium*
H_2O	Wasser

HBSS	Hank`s gepufferte Salzlösung
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HNK-1	*human natural killer cell glycan*
HRP	*horseradish peroxidase*
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	*lysogeny broth*
M	Molar
MEM	*Minimal Essential Medium*
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	*molecular weight*
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
p. a.	*pro analysi*
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	*polymerase chain reaction*
Pfu	DNA-Polymerase *Pyrococcus furiosus*
PLL	poly-L-Lysin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIPA-Puffer	*radioimmunoprecipitation*-Puffer
RT	Raumteperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	DNA-Polymerase *Thermus aquaticus*
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TBST	Tris gepufferte Salzlösung-Tween
Tris	Tris-(hydroxyl)-aminomethan

U	*unit*
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	*volume per volume*
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w/v	*weight per volume*
WB	*Western Blot*
x g	*g-force*
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren wurden entsprechend dem Ein-Buchstaben-Code abgekürzt

10.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Bildung des kompakten Myelins im PNS

Abbildung 1-2. Längsschnitt durch ein myelinisiertes Axon im PNS

Abbildung 1-3. Schematische Übersicht über die Subfamilien der neuralen Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie

Abbildung 1-4. Schematische Darstellung des P0-Proteins

Abbildung 1-5. Schematische Darstellung des kompakten Myelins

Abbildung 1-6. Mutationen im offenen Leseraster von P0

Abbildung 1-7. Schematische Darstellung von L1

Abbildung 1-8. Die komplexen Interaktionen des L1-Moleküls

Abbildung 1-9. Die häufigsten N-Glykosylierungen in verschiedenen Spezies

Abbildung 3-1. Proteinkristallisation nach der Dampfdiffusionsmethode

Abbildung 4-1. Schema der Klonierung der cDNA für die extrazelluläre Domäne des murinen P0-Proteins in den Expressionsvektor pPICZαA

Abbildung 4-2. Restriktionsanalyse verschiedener pGEM-t easy-P0-cDNA-Klone

Abbildung 4-3. Restriktionsanalyse des pPICzA-P0-ecd-Plasmids

Abbildung 4-4. Nachweis der Expression des P0-ecd-Myc-His-Fusionsproteins in verschiedenen *Pichia pastoris*-Klonen: SDS-PAGE

Abbildung 4-5. Nachweis der Expression des P0-ecd-Myc-His-Fusionsproteins in verschiedenen *Pichia pastoris*-Klonen: *Western Blot*

Abbildung 4-6. Analyse der Aufreinigung des P0-ecd-Myc-His-Fusionsproteins mittels SDS-PAGE und *Western Blot*

Abbildung 4-7. Deglykosylierung des P0-ecd-Myc-His-Fusionsproteins mit N-Glykosidase F

Abbildung 4-8. Eindimensionales Protonenspektrum (1D-1H-Spektrum)der in *Pichia pastoris* exprimierten extrazellulären Domäne von P0

Abbildung 4-9. Messung der Dynamischen Laserlichtstreuung (DLS)

Abbildung 4-10. Messung der Dynamischen Laserlichtstreuung (DLS) verschiedener P0-Proteinchargen

Abbildung 4-11. Analyse der Reinigung des P0-ecd-Ile106Leu-Myc-His-Fusionsproteins mittels SDS-PAGE (A) und *Western Blot* (B)

Abbildung 4-12. Messung der Dynamischen Laserlichtstreuung (DLS) des P0-Ile106Leu-Proteins

Abbildung 4-13. Schema der Klonierung der murinen P0-cDNA in den pcDNA3-FLAG/HIS-Vektor

Abbildung 4-14. Oberflächenlokalisation von P0 und P0-Ile106Leu in transfizierten CHO-Zellen

Abbildung 4-15. Vergleich der Oberflächenexpression des wildtypischen P0-Proteins und der Ile106Leu-Mutante von P0

Abbildung 4-16. Aggregations-Assay mit transfizierten CHO-Zellen

Abbildung 4-17. Aggregation von CHO-Zellen, die mit Expressionsplasmiden für P0, P0-Ile106Leu und L1 transfiziert wurden

Abbildung 4-18. Schema der Klonierung der extrazellulären Domäne des mL1 und des TEV-Fc-Fragmentes in den pcDNA3-Vektor

Abbildung 4-19. 1 %iges Agarosegel der Restriktionsanalyse verschiedener pcDNA3-mL1-ecd-TEV-Fc Klone

Abbildung 4-20. Expression von mL1-TEV-Fc: Analyse des Kulturüberstandes transient transfizierter CHO-Zellen

Abbildung 4-21. Expression von mL1-TEV-Fc: Analyse der Kulturüberstände stabil transfizierter CHO-Zellen

Abbildung 4-22. Analyse der Reinigung des mL1-TEV-Fc -Fusionsproteins

Abbildung 4-23. Effekt des TEV-Linkers auf das L1-abhängige Neuritenwachstum

Abbildung 4-24. Analyse der hL1-TEV-Fc Spaltung mit der TEV Protease mittels *Western Blot*

Abbildung 4-25. *Western Blot*-Analyse der mL1-TEV-Fc-Spaltung mit der AcTEV und der rTEV Protease

Abbildung 4-26. Analyse der Spaltung des an Protein A-*Beads* gebundenen mL1-TEV-Fc, mit 10 U AcTEV Protease

Abbildung 4-27. Analyse der Spaltung des an Protein A-*Beads* gebundenen mL1-TEV-Fc mit 100 U AcTEV Protease

Abbildung 4-28. Analyse der TEV-Spaltung des an Protein A-*Beads* gebundenen mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins in Anwesenheit verschiedener Detergenzien

Abbildung 4-29. Analyse der TEV-Spaltung des an Protein A-*Beads* gebundenen mL1-TEV-Fc-Fusionsproteins mit verschiedenen Detergenzien

10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1. Vergleich von Expressionssystemen

Tabelle 3-1. Verwendete Antikörper

Tabelle 3-2. Verwendete Zelllinien und Hefestämme

Tabelle 3-3. Verwendete *E. coli*-Stämme

Tabelle 3-4. Verwendete Plasmide

Tabelle 3-5. Verwendete Primer

Tabelle 3-6. Zusammensetzung des Kulturmediums für die CHO-Zelllinie

Tabelle 3-7. Zusammensetzung des Einfriermediums für CHO-Zellen

Tabelle 3-8. Zusammensetzung des Selektionsmediums

Tabelle 3-9. Zusammensetzung des Produktionsmediums für CHO-Zellen

Tabelle 3-10. Zusammensetzung des X-1-Mediums

Tabelle 3-11. Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Isabel Köhlitz
Geburtsdatum	27.05.1979
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig

Schulbildung

1985 – 1989	Grundschule am Müssenredder
1989 – 1998	Abitur am Carl von Ossietzky Gymnasium Hamburg

Studium

Oktober 1998 - Juni 2000	Studium der Verfahrenstechnik an der Technischen Universität Hamburg-Harburg
September 2000 - Februar 2004	Studium der Biotechnologie mit dem Schwerpunkt Mikro- und Molekularbiologie an der Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg Abschluss als Diplom-Ingenieurin Biotechnologie (FH)
März 2004 – August 2008	Promotion im Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

	(ZMNH) der Universität Hamburg bei Frau Prof. Dr. Schachner
	Externe Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Walther, Universität Greifswald
Oktober 2005 - Dezember 2007	Aufbaustudiengang Molekularbiologie an der Universität Hamburg

Danksagung

Bei Frau Professor Dr. Melitta Schachner möchte ich mich für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas sowie für die fachkundige Betreuung während meiner gesamten Doktorarbeit bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. Reinhard Walther bedanke ich mich sehr für die Übernahme der Betreuung und der Begutachtung meiner Doktorarbeit.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Thomas Tilling danke ich dafür, dass er immer ein offenes Ohr bei allen großen und kleinen Schwierigkeiten hatte und mir durch die wissenschaftlichen Diskussionen und seine Ideen immer sehr geholfen hat.

Herrn Dr. Lars Redecke und Herrn Dr. Markus Perbandt danke ich für Ihre ständige Diskussions- und Hilsbereitschaft und für Ihre Hilfe bei der Durchführung der DLS-Messungen und der Kristallisationsversuche.

Herrn Wolfgang Grassl danke ich für die Durchführung der Fermentationen.

Bei Herrn Dr. Thorsten Biet möchte ich mich für die Duchführung und Auswertung der NMR-Analysen bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. Martin Grumet möchte ich mich für die Bereitstellung der rTEV Protease und des hL1-TEV-Fc 1-3-Fusionsproteins bedanken.

Ich möchte mich bei allen Laborkollegen bedanken, von denen ich viel gelernt habe und die stets offen für Diskussionen und Fragen waren. Besonders möchte ich mich bei meinem Labor E 32 für die nette Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und den Spaß den wir immer hatten bedanken. Carina und Daniel danke ich für Ihre Hilfe bei der Präparation der Kleinhirnneurone.

Julia danke ich ganz besonders für das schnelle Korrekturlesen meiner Arbeit.

Claas danke ich ganz besonders für seine unendliche Geduld und seine liebevolle Unterstützung, die mir besonders am Ende der Promotion sehr geholfen hat.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meiner Omi dafür, dass Sie immer an mich geglaubt haben und mich während meines Studiums und der gesamten Zeit der Promotion unterstützt haben.

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, daß ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.