

**Produktion von rekombinantem, humanem Tropoelastin
(Isoform 2) und *in vitro* Hydroxylierung mittels viraler
Prolyl-4-Hydroxylase**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Herrn Mathias Mende

geb. am 24.09.1991 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Priv.-Doz. Dr. Christian Schmelzer
3. Prof. Dr. Dieter P. Reinhardt

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.12.2023

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Mathias Mende, dass ich die vorliegende Arbeit – mit Ausnahme der aufgeführten Personen, Unterlagen bzw. Literaturstellen – selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Mainz, 28.06.2023

Danksagung

Mein Dank richtet sich an die folgenden Personen, ohne die die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Markus Pietzsch für die Möglichkeit danken, das Promotionsthema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen. Bedanken möchte ich mich außerdem für den wissenschaftlichen Diskurs sowie für das Interesse am Fortschritt der Arbeit und die damit verbundenen, regelmäßigen Besprechungstermine. Dr. habil. Christian Schmelzer danke ich ebenfalls für das Teilen seiner wissenschaftlichen Expertise zum Elastin und für die Übernahme des Zweitgutachtens. Professor Dieter Reinhardt danke ich vielmals für die Erstellung des externen Gutachtens.

Großer Dank gilt Tobias Hedtke des Fraunhofer Institutes für Mikrostruktur und Werkstoffe Halle (IMWS) für die Probenvorbereitung, Durchführung der massenspektrometrischen Analysen, Unterstützung bei der Datenauswertung und den fachlichen Diskurs der Ergebnisse. Für die Probenanalyse mittels LC-MS/MS danke ich Dr. Christian Ihling sowie Prof. Dr. Andrea Sinz für die Möglichkeit der Gerätenutzung. Dr. Schierhorn danke ich für die Proteinidentifikation des rekombinanten Tropoelastins. Dr. Malešević danke ich für die Peptidsynthese und die HPLC-Analyse des Tropoelastins. Bei Benjamin Böhme bedanke ich mich für die *E. coli*-Zellen mit der Vektor-DNA. Dr. Ramona Engelhardt möchte ich für die Betreuung während der Anfangsphase meiner Promotion danken. Besonderen Dank möchte ich an Martina Anwand, Andrea Damm und Dr. Martin Wolfram für die Einarbeitung und die Unterstützung im Umgang mit Bioreaktorsystemen richten. Gleiches gilt für Dr. Matthias Jacob und Dr. René Heppner für die Bedienung der Röhrenzentrifugen.

Sehr dankbar bin ich Dr. Franziska Seifert und Dr. Bodo Moritz für den wissenschaftlichen Input bei fachlichen Fragen und Problemstellungen.

Allen Mitarbeitern der AG Pietzsch danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die gegenseitige Hilfsbereitschaft und die sozialen Aktivitäten außerhalb der Labore.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die ständige Unterstützung in allen Lebenslagen des Studiums und für die Ausgestaltung der nicht weniger wichtigen Erholungsphasen, um stets neue Kraft tanken zu können.

Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	2
Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen	4
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungen.....	7
1 Einleitung	9
1.1 Stand des Wissens	9
1.1.1 Tropoelastin – Struktur und Elastogenese	9
1.1.2 Tropoelastin – Herstellung und Bedeutung als Ausgangsstoff für Biomaterialien	14
1.1.3 Prolyl-4-Hydroxylierung	17
1.2 Motivation und Zielsetzung	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien.....	25
2.2 Geräte.....	28
2.3 Puffer	31
2.4 Molekularbiologische Methoden	32
2.4.1 Organismen	32
2.4.2 Primer.....	33
2.4.3 Plasmidisolierung	33
2.4.4 Subklonierung von <i>eln</i> aus pET-3d_TE in pET-28a(+)_ <i>cer</i>	33
2.4.4.1 Kolonie-Polymerasekettenreaktion (K-PCR).....	33
2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.4.6 Insertion von Stop-Codonen.....	34
2.4.7 Chemotransformation von <i>Escherichia coli</i>	35
2.5 Mikrobiologische Methoden	35
2.5.1 Kultivierungsmedien und Zusätze	35
2.5.2 Proteinproduktion im Schüttelkolbenmaßstab	36
2.5.2.1 Überproduktion von TE (IF 2).....	36
2.5.2.2 Überproduktion der His ₁₀ -cvP4H	37
2.5.3 Produktion von TE (IF 2) im Bioreaktormaßstab.....	37
2.5.4 Plasmidstabilitätstest [Vyas et al., 1994].....	39
2.6 Proteinchemische Methoden	39
2.6.1 SDS-PAGE [Laemmli, 1970]	39

2.6.2	Färbung von SDS-PAGE Gelen	39
2.6.2.1	Coomassie-Färbung	39
2.6.2.2	Silberfärbung [Blum et al., 1987]	40
2.6.3	Western-Blot und Antikörpernachweis	41
2.7	Extraktion von TE (IF 2) aus <i>E. coli</i> Biofeuchtmasse	41
2.8	Aufarbeitung von extrahiertem TE (IF 2)	43
2.9	Löslichkeitstest mit gereinigtem TE (IF 2)	44
2.10	Untersuchung des Koazervationsverhaltens von TE (IF 2)	44
2.11	Reinigung von TE (IF 2) nach Extraktion.....	45
2.12	Reinigung der His ₁₀ -cvP4H	45
2.12.1	Immobilisierung über Nickel-Affinitätschromatographie.....	45
2.12.2	Konzentrieren der His ₁₀ -cvP4H und Pufferwechsel	46
2.12.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	46
2.12.3.1	Bradford-Assay [Bradford, 1976].....	46
2.12.3.2	Spektrophotometrie	47
2.13	<i>In vitro</i> Hydroxylierung	47
2.14	Auftragsanalytik.....	49
2.14.1	Flüssigchromatographie	49
2.14.2	Massenspektrometrische Analysen.....	50
2.14.2.1	Proteinidentifikation nach Überproduktion im Schüttelkolben	50
2.14.2.2	TE (IF 2) nach Hydroxylierung und Analyse der Nebenprodukte	50
3	Ergebnisse	52
3.1	Biotechnologische Produktion von humanem TE (IF 2).....	52
3.1.1	Etablierung eines stabilen Expressionssystems	52
3.1.1.1	Subklonierung aus pET-3d_TE in pET-28a(+)_cer.....	52
3.1.1.2	Mutagenese-PCR zur Insertion weiterer Stopcodone	53
3.1.2	Überproduktion von TE (IF 2) im Schüttelkolbenmaßstab	54
3.1.2.1	Induktionstest	54
3.1.2.2	Proteinidentifikation	55
3.1.2.3	Untersuchung der segregativen Plasmidstabilität abhängig von Kanamycin-Zugabe zum Kulturmedium	56
3.1.3	Überproduktion von TE (IF 2) im 12 L und 100 L Bioreaktormaßstab.....	57
3.2	Extraktion von TE (IF 2) aus <i>E. coli</i> Biofeuchtmasse	59
3.3	Aufarbeitung von TE (IF 2) aus acetonhaltigen Überständen	61
3.4	Charakterisierung des extrahierten Tropoelastins.....	64
3.4.1	Löslichkeitstest.....	64
3.4.2	Untersuchung der Proteinreinheit.....	64

3.5	Reinigung des extrahierten Tropoelastins mit Kationenaustauschchromatographie	65
3.5.1	Einfluss der NaCl-Konzentration auf das Koazervationsverhalten von Tropoelastin	65
3.5.2	Reinigungsversuch von TE (IF 2) mittels Kationenaustauschchromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen	66
3.5.3	Reinigung von TE (IF 2) mittels Kationenaustauschchromatographie unter denaturierenden Bedingungen	69
3.5.3.1	Einfluss der TE-Beladungsmenge auf das Elutionsverhalten bei der Kationenaustauschchromatographie	72
3.5.4	Charakterisierung des gereinigten Tropoelastins	74
3.5.4.1	Löslichkeitstest und Bestimmung der Proteinkonzentration	74
3.5.4.2	Bestimmung der Proteinreinheit und Identifikation der Nebenprodukte	74
3.6	<i>In vitro</i> Prolyl-4-Hydroxylierung von Tropoelastin	76
3.6.1	Produktion der His ₁₀ -cvP4H im Schüttelkolbenmaßstab	77
3.6.2	Reinigung der His ₁₀ -cvP4H	78
3.6.3	<i>In vitro</i> Hydroxylierung	80
3.6.4	Identifikation von 4-Hydroxyprolinen in TE (IF 2)	83
4	Diskussion	89
4.1	Produktion und Aufarbeitung von rekombinantem Tropoelastin (Isoform 2)	89
4.1.1	Einfluss der <i>cer</i> -Sequenz auf die segregative Plasmidstabilität	89
4.1.2	Aufarbeitung und Reinigung von Tropoelastin (Isoform 2)	90
4.2	Produktion und Reinigung der His ₁₀ -cvP4H	95
4.3	<i>In vitro</i> Prolyl-4-Hydroxylierung	95
4.3.1	(PAPK) ₅	95
4.3.2	TE (IF 2)	98
5	Zusammenfassung	102
6	Ausblick	104
7	Literatur	105
8	Anhang	113
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	125
	Lebenslauf	128

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
Amp	Ampicillin
AK	Antikörper
BFM	Biofeuchtmasse
BSA	Bovines Serum-Albumin
BTM	Biotrockenmasse
clEX	<i>cation exchange chromatography</i> (Kationenaustauschchromatographie)
CIP	<i>cleaning in place</i> , Reinigung des Chromatographiematerials
cpm	<i>counts per minute</i>
CV	<i>column volume</i> , Säulenvolumen
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Da	Dalton
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBP	Elastinbindeprotein
ECM	<i>extracellular matrix</i> (extrazelluläre Matrix)
ER	endoplasmatisches Reticulum
FMOOC	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
HDH	Hochdruckhomogenisator
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> , Hochdruckflüssigchromatographie
HyP	4-Hydroxyprolin
IF	Isoform
ITPG	Isopropyl-β-D-galactopyranosid
k.A.	keine Angabe
Kan	Kanamycin
K_D	Dissoziationskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LB	<i>lysogeny broth</i>
LOX	Lysyloxidase
MS	Massenspektrometrie
M_r	relative Molekülmasse
mRNA	<i>messenger ribonucleid acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
m. w.	<i>molecular weight</i> (molekulare Masse)
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NCM	Nitrocellulosemembran
P4H	Prolyl-4-Hydroxylase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBCV-1	<i>Paramecium bursaria Chlorella Virus-1</i>
PES	Polyestersulfon
pl	isoelektrischer Punkt

pK _s	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PMSF	Phenylmethylylsufonylfluorid
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RP-HPLC	Umkehrphasenchromatographie
SANS	<i>small angle neutron scattering</i> , Kleinwinkel-Neutronenstreuung
SAXS	<i>small angle X-ray scattering</i> , Kleinwinkel-Röntgenstreuung
SDS-PAGE	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> -Polyacrylamidgelelektrophorese
SL	Stammlösung
SP	Sulphopropyl
TE	Tropoelastin
TFA	Trifluoressigsäure
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit nach Michaelis-Menten-Kinetik
WB	Western-Blot

Englische Fachausdrücke, die keine adäquate deutsche Übersetzung zulassen, sind in dieser Arbeit kursiv geschrieben. Diese werden unter Umständen auch dann benutzt, wenn ein deutsches Äquivalent existiert.

Für biochemische Fachausdrücke werden die international üblichen Abkürzungen verwendet.

1 Einleitung

1.1 Stand des Wissens

1.1.1 Tropoelastin – Struktur und Elastogenese

Tropoelastin (TE) ist das lösliche Vorläuferprotein des extrazellulären Matrixproteins Elastin, das in allen Vertebraten, mit Ausnahme der Rundmäuler (Cyclostomata), vorkommt [Sage, 1982]. Namensgebend sind die durch Elastin vermittelten elastischen Eigenschaften. Es wird in Geweben gebildet, die einer kontinuierlichen Verformung unterliegen, wie z.B. in den Blutgefäßen, der Lunge, Gelenkbändern oder der Haut. Der Anteil des Elastins kann zwischen verschiedenen Geweben stark variieren. Er liegt, bezogen auf das Trockengewicht, in der menschlichen Aorta bei 28 – 32 % [Uitto, 1979a] und in der menschlichen Dermis bei 2 – 8 % [Heinz et al., 2016]. Die Morphologie der elastischen Fasern kann sich dabei zwischen verschiedenen Geweben unterscheiden. Die elastischen Fasern bilden in Arterien konzentrische Ringe oder wabenartige Strukturen in Knorpelgewebe der Ohrmuschel [Mithieux und Weiss, 2005]. Zu den elastogenen Zellen zählen beispielsweise Fibroblasten [Mecham et al., 1985] und glatte Muskelzellen [Narayanan et al., 1976]. Das Maximum der Elastogenese wird bei Säugern, wie z.B. bei Mäusen, in der neonatalen Phase erreicht [Mecham, 2008] und kommt danach weitestgehend zum Erliegen [Davis, 1993; Kelleher et al., 2004; McLean et al., 2005]. Umweltfaktoren wie ultraviolette Strahlung oder Rauchen sowie der Abbau während des intrinsischen Alterungsprozesses führen zur irreversiblen Fragmentierung der dermalen elastischen Fasern. Daraus resultiert u.a. der Verlust der Elastizität der Haut. Diese Fragmentierung konnte durch Untersuchung von aus menschlicher Haut isolierten Elastinfasern elektronenmikroskopisch dargestellt werden [Huertas et al., 2016]. Die TE-Bildung kann zwar nach Schädigung reaktiviert werden, jedoch wird das Elastin nicht mehr im gleichen Maß neu produziert [Bernstein et al., 1994].

Die Erbinformation für TE ist im Menschen auf dem einzelnen *eln*-Gen auf Chromosom 7q11.23 codiert [Fazio et al., 1991]. Die mRNA besteht aus 34 Exons (Abb. 1-1). Exon 1 codiert für das Signalpeptid, welches bei der Translokation des TEs über die Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) in das ER-Lumen abgespalten wird. Charakteristisch für TE sind die sich wiederholenden hydrophoben Domänen (Abb. 1-1, grau) mit einem hohen Anteil an Glycin (G), Alanin (A), Valin (V) und Prolin (P). Diese sind im Wechsel mit hydrophilen Domänen angeordnet, die einen hohen Anteil an Lysin (K) aufweisen und an der Quervernetzung beteiligt sind [Wise und Weiss, 2009]. Bei diesen hydrophilen Domänen kann zwischen KA- und KP-reichen Quervernetzungsdomänen unterschieden werden (Abb. 1-1, hell- bzw. dunkelrot). Das Exon 26A ist ebenfalls auf dem humanen *eln*-Gen vorhanden [Indik et al., 1987] und codiert für eine C-terminale Verlängerung der Domäne 26 um 33 Aminosäuren (GADEGVRRSLSPREGDPSSSQHLPSTPSSPR). Die Domäne 26A weist eine hohe Anzahl an geladenen AS auf. In humanen Fibroblasten wird das Exon nicht exprimiert [Fazio et al., 1988]. Die Domäne wurde jedoch in Elastin der menschlichen Haut nach UV-Bestrahlung nachgewiesen [Chen et al., 2009]. Die Domänen 34 und 35 werden nicht durch das humane

eln-Gen codiert, sondern sind beispielsweise in TE aus Rind oder Huhn enthalten [Schmelzer et al., 2016]. Exon 34 und 35 gingen während der Evolution der Primaten verloren [Szabo et al., 1999]. In Domäne 36 sind das C-terminale RKRK-Motiv sowie die beiden einzigen Cystein-Reste lokalisiert, welche eine intramolekulare Disulphidbrücke bilden [Brown et al., 1992]. Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA können Exons entfernt werden (Abb. 1-1, gelbe Punkte). Abhängig vom alternativen Spleißmuster können insgesamt 13 TE-Isoformen [Reichheld et al., 2019] unterschieden werden (Swiss-Prot Datenbankeintrag: P15502-1 bis P15502-13). Deren Anteil im Gewebe variiert laut mRNA-Abundanz und es liegen gleichzeitig verschiedene Isoformen im menschlichen Gewebe vor [Reichheld et al., 2019]. Mittels Massenspektrometrie wurden in aus menschlicher Haut isoliertem Elastin die meisten Peptide für TE (Isoform 2, P15502-2) gefunden [Hedtke et al., 2019]. In TE (IF 2) wurden Exon 22 (Abb. 1-1, blauer Punkt) und Exon 26A durch Spleißen entfernt. Die Aminosäuresequenz sowie die Domäneneinteilung des TE (IF 2, Genbank Eintrag: AAC98394) sind im Anhang in Abb. 8-4, S. 116 aufgeführt. Die theoretische molekulare Masse von TE (IF 2) ohne das Signalpeptid beträgt 60 kDa.

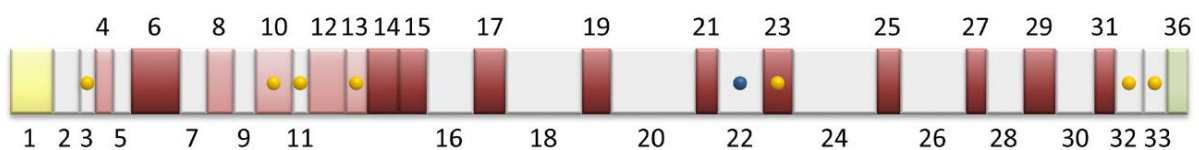


Abb. 1-1 Exon- und Domänenstruktur des humanen Tropoelastins ohne Domäne 26A. Dargestellt sind das N-terminale Signalpeptid (gelb), die hydrophoben Domänen (grau), die KA- (dunkelrot) und KP- (hellrot) Quervernetzungsdomänen sowie die C-terminale Domäne 36 (grün). Mit gelben Punkten sind Domänen markiert, deren Exon durch alternatives Spleißen der mRNA entfernt werden kann. Mit einem blauen Punkt ist Exon 22 markiert, welches bei Isoformen 2 gespleißt wird. Nach [Schmelzer und Duca, 2021].

Der Stand des Wissens zur Elastogenese wurde 2021 von Schmelzer & Duca ausführlich dargestellt [Schmelzer und Duca, 2021]. Im Folgenden wird der komplexe Prozess der Elastogenese übersichtsartig beschrieben, wobei bisher nicht jede Phase restlos aufgeklärt worden ist. Nach der Biosynthese und Abspaltung des N-terminalen Signalpeptides wird das TE im Lumen des ERs durch ein Chaperon (Elastinbindeprotein, EBP) gebunden. Dadurch werden die frühzeitige Aggregation und der proteolytische Abbau des TEs verhindert [Hinek et al., 1995a]. Bei dem EBP handelt es sich um die enzymatisch inaktive Isoform 2 der lysosomalen β -Galactosidase (m. w.: 67 kDa inkl. Glykosylierung, Swiss-Prot Datenbankeintrag: P16278-2). Mehrere Spleißereignisse der mRNA führen zu einer partiellen Deletion in der katalytisch-aktiven Domäne. Weiterhin kommt es zu einer Leserasterverschiebung, wodurch 32 zusätzliche Aminosäuren codiert werden (V32; LPGSCGQVVGSPSAQDEASPLSEWRASYNSA) [Privitera et al., 1998]. Ein Homologiemodell der N-terminalen Hälfte des EBPs (T28 – T238) wurde 2013 publiziert [Blanchevove et al., 2013]. Demnach formen die Aminosäuren V32 (L83 – A113) eine hufeisenförmige Elastinbindestelle an der EBP-Oberfläche, durch welche TE über das VGVAPG in Domäne 24 sowie über andere XGXXPG-Motive gebunden wird. Das XGXXPG-Motiv ist insgesamt 22-mal in TE (IF 2) vorhanden. Die Glykosylierung des EBPs ist nicht essentiell für die TE-Bindung, da unglykosyliertes, durch *in vitro* Proteinbiosynthese produziertes

EBP (m. w.: 60 kDa) an Elastin-Affinitätssäulenmaterial gebunden hat [Privitera et al., 1998]. Das EBP weist weiterhin eine Galactolectinbindestelle (E137) auf [Blanchevoye et al., 2013].

Als posttranslationale Modifikation erfolgt die Hydroxylierung von einzelnen Prolyl-Resten des TEs im Lumen des ERs. Allerdings werden nicht alle der 86 Prolyl-Reste von TE (IF 2, ohne Signalpeptid) modifiziert, von denen sich 54 Prolyl-Reste in hydrophoben Domänen befinden. Massenspektrometrisch wurden 21 Prolyl-Reste (24 % aller Prolyl-Reste) in humanem TE (IF 2) als partiell hydroxyliert identifiziert, d. h. Prolyl-Reste an der gleichen Position wurden sowohl als hydroxyliert als auch als unmodifiziert nachgewiesen [Schmelzer et al., 2016]. Für diese Studie wurde humanes TE aus Haut, Aorta, Bandscheiben und Ohrknorpel untersucht und die partiell hydroxylierten Prolyl-Reste in der Aminosäuresequenz von TE (IF 2) markiert. Die Sequenzabdeckung der identifizierten Peptide lag bei 74 %. Von den 86 Prolyl-Resten wurden insgesamt 81 Prolyl-Reste nachgewiesen. Die 4-Hydroxyproline (HyP) sind hauptsächlich im GXPG-Motiv (X = V, I, L, F) der hydrophoben Domänen lokalisiert. Die entsprechenden Positionen sind in der Aminosäuresequenz von TE (IF 2) im Anhang in Abb. 8-4, S. 116 markiert. Der Hydroxylierungsgrad in TE (IF 2) der menschlichen Haut liegt laut Aminosäureanalyse bei ca. 10 % aller Prolyl-Reste [Hedtke et al., 2019].

Die weiteren Schritte der Elastogenese sind schematisch in Abb. 1-2 dargestellt. Das partiell hydroxylierte TE wird im Komplex mit dem EBP (Abb. 1-2, I) über den Golgi-Apparaten in die extrazelluläre Matrix (ECM) sekretiert. Durch Interaktion des EBPs mit der Neuraminidase-1 (Neu-1; EC 3.2.1.18) und dem protektiven Protein/Cathepsin A (PPCA; EC 3.4.16.1) wird der heterotrimere Elastin-Rezeptor-Komplex an der Zelloberfläche gebildet (Abb. 1-2, II) [Bennasroune et al., 2019]. Das Protein Neu-1 ist eine transmembrane Sialidase, die den terminalen Sialinsäure-Rest der Kohlenhydratketten von Mikrofibrillen in der ECM abspaltet (Abb. 1-2, III). Die Mikrofibrillen sind aus verschiedenen Glykoproteinen, wie z.B. aus Fibrillinen, aufgebaut [Yeo et al., 2011]. Die humanen Mikrofibrillen bestehen hauptsächlich aus Fibrillin-1 (Swiss-Prot Datenbankeintrag: Q75N89), wobei noch zwei weitere Isoformen nachgewiesen wurden. Zur Bildung der Mikrofibrillen werden die einzelnen Fibrillin-Moleküle perlen-schnurartig zusammengebaut [Godwin et al., 2019]. Es wird angenommen, dass das unglykosylierte TE durch Bindung eines zugänglich gewordenen Galactosyl-Restes an der Galactolectinbindestelle des EBPs freigesetzt wird (Abb. 1-2, IV) [Hinek et al., 2006]. Das EBP wird anschließend zurück in das Lumen des ERs transportiert (Abb. 1-2, V) und steht für eine neue Beladung mit TE zur Verfügung [Hinek et al., 1995b]. Es konnte gezeigt werden, dass das freigesetzte TE über das positiv geladene RKRK-Motiv mit dem Zelloberflächenrezeptor Integrin $\alpha_v\beta_3$ interagiert [Bax et al., 2009] und zunächst an der Zelloberfläche in der ECM verbleibt. Mehrere TE-Monomere interagieren über Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Domänen, wodurch größere Agglomerate entstehen (Abb. 1-2, VI). Dieser als „Koazervation“ bezeichnete Prozess ist abhängig von der Temperatur, der Ionenstärke, dem pH-Wert sowie von der TE-Konzentration. Der Einfluss dieser Parameter auf die Koazervation wurde für nicht-hydroxyliertes, rekombinantes TE ($\Delta 22, +26A$; IF 4) *in vitro* über Trübungsmessungen untersucht. Die Optima der Koazervation liegen demnach bei 37 °C, 150 mM NaCl und pH 7 – 8, welche den physiologischen Bedingungen in der ECM entsprechen [Vrhovski et al.,

1997]. Unterhalb der Temperatur, die für die Koazervation benötigt wird (Transitionstemperatur), werden die hydrophoben Domänen zunächst durch Hydrathüllen vor einer Interaktion abgeschirmt. Bei Erreichen der Transitionstemperatur werden die Wasserstoffbrücken zwischen den Molekülen der Hydrathülle gestört, sodass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Domänen ausgebildet werden können [Yeo et al., 2011]. *In vitro* können bei der Koazervation zwei Phasen unterschieden werden: In der reversiblen Anfangsphase bilden TE-Monomere (ca. 15 nm Durchmesser) bei Erreichen der Transitionstemperatur Multimere (ca. 2 – 6 µm Durchmesser), welche durch Absenkung der Temperatur wieder aufgelöst werden können [Clarke et al., 2006]. In der Reifungsphase akkumulieren die Koazervate irreversibel zu größeren Einheiten [Bellingham et al., 2003; Tu et al., 2010]. Die Koazervate werden *in vivo* in die Mikrofibrillen integriert, die als Gerüststruktur für die entstehenden elastischen Fasern dienen. Es erfolgt die intra- und intermolekulare Quervernetzung des TEs über Lysyl-Reste der hydrophilen KP- und KA-Domänen, die durch die Koazervation in räumliche Nähe gebracht wurden (Abb. 1-2, VII). Bei der durch die kupferabhängige Lysyloxidase (LOX, EC 1.4.3.13) oder von LOX-ähnlichen Enzymen katalysierten Reaktion werden Allysine (α -Amino adipin- δ -semialdehyd) durch oxidative Desaminierung der ϵ -Aminogruppe gebildet.

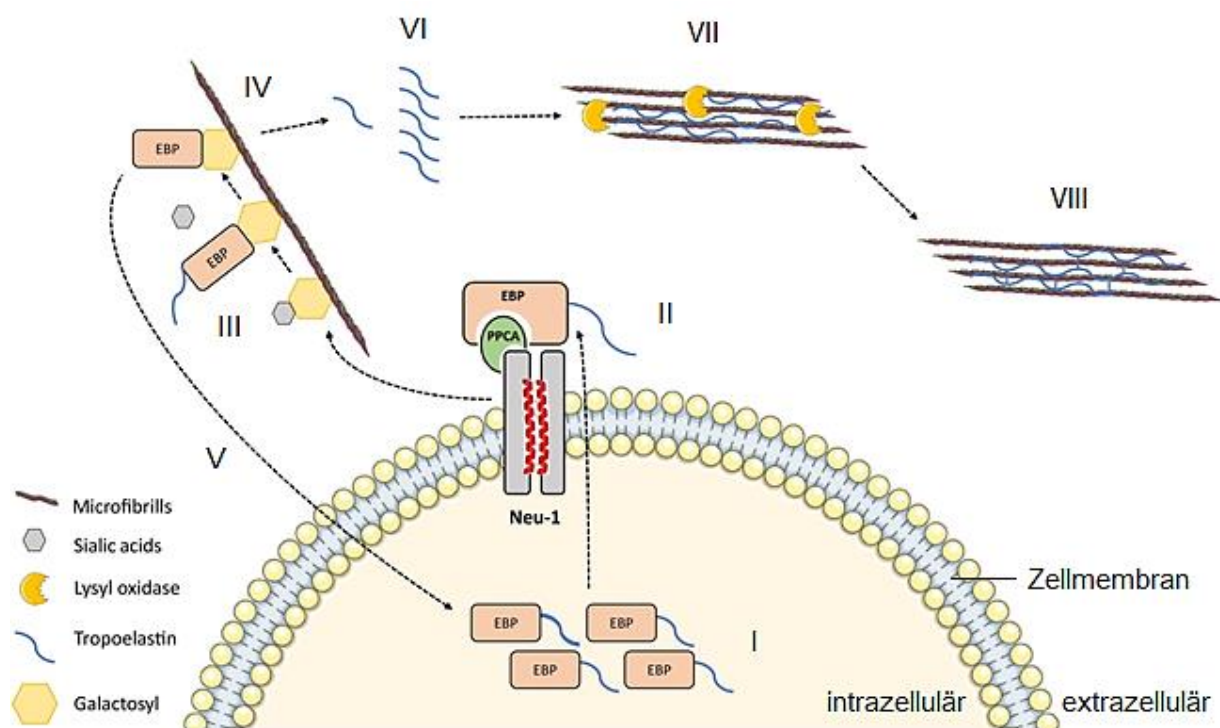


Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Elastogenese nach Biosynthese und Prolyl-4-Hydroxylierung des Tropoelastins. Der Komplex aus Elastinbindeprotein (EBP) und Tropoelastin (TE) (I) wird in den extrazellulären Raum sekretiert. Durch das EBP, die Neuraminidase-1 (Neu-1) und das protektive Protein/Cathepsin A (PPCA) wird der Elastin-Rezeptor-Komplex gebildet (II). Nach Abspaltung der Sialinsäure (III) bindet das EBP am Galactosyl-Rest der Mikrofibrillen, wodurch TE freigesetzt wird (IV). Das EBP wird in der Zelle erneut mit TE beladen (V). Das freigesetzte TE verbleibt an der Zelloberfläche und bildet Koazervate (VI). Die Koazervate werden in die Mikrofibrillen integriert und das TE durch die Lysyloxidase quervernetzt (VII) und die elastische Faser (VIII) gebildet. Modifiziert nach [Bennasroune et al., 2019].

Durch Kondensationsreaktionen reagieren diese mit benachbarten Lysyl-Resten und/oder Allysinen zu multifunktionalen Strukturen, wie z.B. zu tetrafunktionalem Desmosin oder Isodesmosin aus vier Lysyl-Resten [Vrhovski und Weiss, 1998]. An der Ausbildung dieser intermolekularen Vernetzungen sind hauptsächlich die Lysyl-Reste der KA-Domänen involviert, wohingegen von KP-Domänen eher bifunktionale Vernetzungen zwischen zwei Lysyl-Resten ausgehen [Hedtke et al., 2019]. Die Quervernetzungen führen zu einer massiven Unlöslichkeit des Elastins und zu einer hohen Halbwertszeit der elastischen Fasern (Abb. 1 2, VIII) von ca. 74 Jahren in humanem Lungenparenchym [Shapiro et al., 1991].

Bisher ist es nicht gelungen, eine Kristallstruktur des monomeren Volllängen-TEs darzustellen und dessen Tertiärstruktur endgültig aufzulösen. Für in dH₂O gelöstes, rekombinantes Volllängen-TE ($\Delta 22$, $\Delta 26A$; entspricht IF 2) wurde mittels Circular dichroismus bei 20 °C ein Sekundärstrukturanteil von 6 % α -Helix, 23 % β -Faltblatt, 30 % β -Schleife und 39 % anderer Strukturen bestimmt [Toonkool et al., 2001]. Gegenwärtige Publikationen schlagen vor, TE als flexibles Molekül mit einer gewissen Nanostruktur zu betrachten [Tarakanova et al., 2019]. Ein *ab initio* Modell der Form von Volllängen-TE wurde nach Messung mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) bzw. -Neutronenstreuung (SANS) veröffentlicht [Baldock et al., 2011]. Für die Messungen wurde gelöstes, nicht-hydroxyliertes, humanes TE (IF 2) eingesetzt, das in *E. coli* rekombinant hergestellt wurde. Ein atomistisches Modell der Nanostruktur von humanem TE (IF 2) wurde einige Jahre später durch computergestützte Simulationen anhand der Aminosäuresequenz vorhergesagt, welches mit den Ergebnissen der SAXS/SANS-Analyse weitestgehend übereinstimmte (Abb. 1-3) [Tarakanova et al., 2018]. Demnach kann die Tertiärstruktur des TE in eine N-terminale „Knäuelregion“ (KR), eine „Brückenregion“ (BR) und eine C-terminale „Fußregion“ (FR) unterteilt werden.

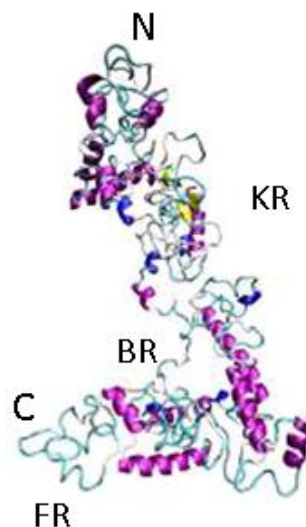


Abb. 1-3 Atomistisches Modell der Tertiärstruktur von rekombinantem, humanem TE (IF 2). Eine Unterteilung kann in die „Knäuelregion“ (KR), die „Brückenregion“ (BR) und die „Fußregion“ (FR) erfolgen. Dargestellt sind die α -Helices der KA-Quervernetzungsdomänen (violett), 3_{10} -Helices (dunkelblau), β -Struktur (gelb), β -Schleifen (türkis) und Knäuel (weiß). Modifiziert nach [Tarakanova et al., 2018].

Diese Unterteilung traf auch auf das Modell der TE-Tertiärstruktur bei 37 °C zu und das TE wurde als Molekül mit einer gewissen „scherenartigen“ Konformationsveränderung der C-terminalen Region beschrieben [Tarakanova et al., 2019]. Die KA-Quervernetzungsdomänen bilden vorrangig α -Helices aus [Tamburro et al., 2006], wohingegen die hydrophoben Domänen β -Schleifen bilden [Baldock et al., 2011]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die hydrophoben Domänen z.T. lösungsmittel exponiert sein müssen und dass TE keinen hydrophoben Kernbereich bildet [Muiznieks und Weiss, 2007].

Beim Menschen sind Krankheitsbilder bekannt, die in Zusammenhang mit dem *eln*-Gen stehen. Bei der Erkrankung *cutis laxa* (OMIM-Eintrag: 123700) bilden sich z.B. überschüssige Hautfalten aufgrund der mangelnden Elastizität [Callewaert et al., 2011]. Weiterhin können Mutationen im *eln*-Gen zu einer Verengung der Aorta oberhalb der Aortenklappe führen (supravalvuläre Aortenstenose, OMIM-Eintrag: 185500) [Micale et al., 2009]. Die Mikrodeletion (1,55 – 1,84 Mbp) des *eln*-Gens und anderer Gene auf dem langen Arm des Chromosoms 7 führt zum Williams-Beuren-Syndrom (OMIM-Eintrag: 194050) [Martens et al., 2008]. Dieses Syndrom ist u.a. durch Veränderungen des Bindegewebes und des Herzkreislaufsystems gekennzeichnet [Morris und Mervis, 2000]. Durch Untersuchung von Gewebeproben konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit dem Williams-Beuren-Syndrom einen signifikant geringeren Elastinanteil von 1,6 % \pm 0,4 % in der Haut aufweisen als gesunde Menschen mit 6,0 % \pm 2,4 % [Heinz et al., 2016]. Dabei war der für die zwei Prolyl-Reste bestimmte Hydroxylierungsgrad bei Elastin von erkrankten Personen um ca. 28 % bzw. 37 % niedriger als bei gesunden Probanden. Weiterhin wurde in der Studie kein Unterschied im Anteil der Quervernetzungsstrukturen Desmosin/Isodesmosin von Erkrankten und Gesunden nachgewiesen.

1.1.2 Tropoelastin – Herstellung und Bedeutung als Ausgangsstoff für Biomaterialien

Verbrennungen oder chronische Hauterkrankungen führen zu einer großflächigen Schädigung der Haut und der Elastinfasern. Zu den chronischen Hauterkrankungen zählen z.B. Unterschenkelgeschwüre (*Ulcus cruris*), Druckgeschwüre (Dekubitus) oder das diabetische Fußsyndrom [Markova und Mostow, 2012]. Bei der Behandlung können traditionelle, moderne, hautersetzende und bioaktive Wundabdeckungen unterschieden werden, die in einem Übersichtsartikel beschrieben wurden [Dhivya et al., 2015]: Traditionelle Wundabdeckungen, wie z.B. Gaze oder Mull aus Baumwolle, sind trocken und schützen die Wunde vor Verunreinigungen. Sie nehmen Wundflüssigkeit auf, können jedoch an der Wunde haften und zu Schmerzen beim Wechsel der Wundabdeckung führen. Moderne Wundabdeckungen zielen darauf ab, die Wunde feucht zu halten und die Wundheilung zu unterstützen. Dazu zählen Hydrogele aus synthetischen Polymeren mit einem Wasseranteil von 70 – 90 % (z.B. Aquaform™). Diese werden u.a. bei Druckgeschwüren und Brandwunden verwendet. Eine lange Anwendung kann jedoch zur Aufweichung der Haut und zu bakteriellem Bewuchs führen. Hautersetzende Matrices imitieren die Hautschicht und enthalten humane Fibroblasten, wodurch die Neubildung von Epithelgewebe gefördert werden soll. Sie werden z.B. zur Behandlung von venösen Geschwüren verwendet. Bioaktive Wundabdeckungen sind proteinbasierte Biomaterialien aus z.B. Kollagen oder Elastin und stammen aus natürlichen Geweben. Eine Auflistung von

Hautersatzprodukten wurde in einem Übersichtsartikel veröffentlicht [Dixit et al., 2017]. Die Ausgangsmaterialien wurden aus gespendeter Haut von Verstorbenen (z.B. Alloderm®) entnommen oder stammen aus Tieren (Rind/Schwein). Hautersatzprodukte können z.T. auch zur Behandlung von chronischen Wunden eingesetzt werden. Bei dem US-Marktprodukt Apligraf®, welches zur Behandlung von venösen Geschwüren zum Einsatz kommt, dient z.B. Rinderkollagen als Matrix für die Zellen. Bei dem Hautersatzprodukt Matriderm® besteht die zellfreie Matrix aus dermalemem Rinderkollagen und hydrolysiertem Rinderelastin.

Aufgrund der besonderen mechanischen Eigenschaften ist Elastin ein vielversprechender Ausgangsstoff für proteinbasierte Biopolymere [DeFrates et al., 2018]. Mit dem wachsenden Interesse an elastinbasierten Biomaterialien steigt gleichzeitig der Bedarf an Elastin. Durch den hohen Vernetzungsgrad ist eine Gewinnung von intaktem Elastin aus tierischem Gewebe, z.B. aus Rindernackenband (*Ligamentum nuchae*), nur schwer möglich und ineffizient. Bestehende Methoden nutzen dafür harsche Bedingungen, wie die Hydrolyse elastischer Fasern mit Oxalsäure bzw. Kaliumhydroxid [Partridge et al., 1955; Yeo et al., 2015]. Die Verfahren führen jedoch nur zu einem heterogenen Produkt aus teilweise vernetztem α -Elastin bzw. κ -Elastin [Yeo et al., 2015]. Moralische und religiöse Überzeugungen, wie z.B. die Ablehnung tierischer Produkte, stehen aus tierischem Gewebe gewonnenen Produkten außerdem kritisch gegenüber [Browne et al., 2013; Miranda-Nieves und Chaikof, 2017]. Als Alternative zur Elastinisolierung aus tierischem Gewebe kann die Bildung von Elastin ausgehend von rekombinantem Tropoelastin (TE) angesehen werden. Die Bereitstellung von löslichem, prolyl-4-hydroxyliertem TE stellt dabei ein entscheidendes technisches Problem dar.

Die erste rekombinante Produktion von TE (inkl. 22, 26A; IF 3) in *E. coli* wurde 1990 veröffentlicht [Indik et al., 1990]. Der Zellaufschluss erfolgte dabei durch Lysozym und mechanisch im Dounce Homogenisator. Die TE-haltige unlösliche Fraktion wurde mit Cyanogenbromid (CNBr) behandelt. CNBr spaltet Proteine selektiv C-terminal nach Methionin [Gross, 1967]. Im Gegensatz zu TE, welches bis auf das N-terminale Methionin kein weiteres Methionin aufweist, wurden methioninhaltige Wirtszellproteine durch CNBr gespalten. Das TE wurde anschließend mit 0,1 M Essigsäure extrahiert und mittels Umkehrphasenchromatographie gereinigt. Die isolierte TE-Menge lag bei 2 – 4 mg/L_{Kulturvolumen}. Später wurden die rekombinante Produktion von synthetischem, humanem TE (IF 4) in *E. coli* und dessen Aufarbeitung angepasst [Martin et al., 1995]. Dabei wurden die *E. coli*-Zellen zunächst im Verhältnis 1:9 in Puffer resuspendiert und durch Lysozym sowie durch wiederholte Gefrier-Tau-Zyklen aufgeschlossen. Serin-Proteasen wurden durch PMSF inhibiert und Wirtszell-DNA mittels DNase I abgebaut. Durch sukzessive Zugabe des 1,5-fachen Volumens der löslichen Fraktion an n-Propanol und des 2,5-fachen Volumens an n-Butanol wurden die Wirtszellproteine präzipitiert und von löslichem TE mittels Zentrifugation getrennt. Nach Trocknung der alkoholischen Fraktion lag die isolierte TE-Menge bei 30 mg/L_{Kulturvolumen}. In einem auf der Methode basierenden Protokoll erfolgten weitere Anpassungen [Vrhovski et al., 1997]. So wurden die Alkohole aus der TE-haltigen Fraktion mittels Rotationsverdampfung abgetrennt. Weiterhin wurden Lipide der *E. coli*-Zellmembran nach vollständiger Trocknung des TEs in einem Waschschrift mit Chloroform entfernt. Das TE wurde anschließend gegen einen 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 5,0) dialysiert und gefriergetrocknet. Außerdem wurden TE-Fragmente in einem anschließenden

Reinigungsschritt mittels Umkehrphasenchromatographie von Vollängen-TE abgetrennt. Die isolierte TE-Menge konnte auf 40 mg – 50 mg/L_{Kulturvolumen} gesteigert werden. Unter nicht näher definierten, verbesserten Expressionsbedingungen und verlängerter Induktionsphase wurde außerdem eine TE-Ausbeute von bis zu 200 mg/L_{Kulturvolumen} angegeben. Der Endotoxingehalt wurde mittels chromogenen LAL-Test (*Limulus* Amöbozytenlysat) auf < 50 EU/g bestimmt [Vrhovski et al., 1997].

Nachteilig bei der alkoholischen Fällung ist, dass sehr große Volumina für die weitere TE-Aufarbeitung entstehen. Abweichend von der grundlegenden Arbeit von Martin bzw. Vrhovski und Kollegen wurde in unpublizierten Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit eine alternative Extraktionsmethode für TE entwickelt. Grundlage für diese alternative Extraktionsmethode war die Patentschrift von Wagner und Kollegen (US3622461A) [Wagner et al., 1969]. Darin wird die Extraktion von rekombinanter Asparaginase aus *E. coli*-Zellen durch Aceton beschrieben. Die Verwendung von Aceton bietet den Vorteil, dass es im Vergleich zum Alkoholgemisch bei 25 °C leicht mittels Rotationsverdampfer von der TE-haltigen, wässrigen Phase abgetrennt werden kann. Basierend auf den unpublizierten Vorarbeiten wurde außerdem die bei -20 °C gelagerte Biofeuchtmasse (BFM) in kurzen Zeitintervallen in einer Mikrowelle auf >70 °C erhitzt, um auf PMSF zur Inaktivierung der Serin-Proteasen verzichten zu können. Als Alternative zum kosten- und zeitintensiven Aufschluss einer größeren Menge BFM mit Lysozym, wurde die Zelldesintegration mittels Hochdruckhomogenisator (HDH) durchgeführt. Wirtszell-DNA wurde dabei durch die wirkenden Scherkräfte degradiert, wodurch auf den Einsatz eines DNA-abbauenden Enzyms verzichtet werden konnte. Als optimaler Aufschlusspuffer für den Zellaufschluss wurde ein 0,01 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 6,7) bestimmt, sodass TE nach der Mikrowellenbehandlung der BFM, dem Zellaufschluss und der Zentrifugation in der unlöslichen Fraktion vorlag. Die Extraktion des TEs aus der unlöslichen Fraktion erfolgte mit einem Gemisch aus 70 % Aceton, 20 % 0,25 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 5,0) und 10 % dH₂O. Die optimale Zeit zur TE-Extraktion wurde im Zeitraum von 1 h – 5 h untersucht und zu 4 h bestimmt. Es wurden insgesamt drei identische Extraktionsschritte durchgeführt.

Das nach dem Verfahren von Martin bzw. Vrhovski und Kollegen produzierte, unhydroxylierte TE (IF 4) wurde bereits zur Herstellung verschiedener Biomaterialien verwendet. Es wurde die Herstellung von Hydrogelen und elektrogesponnenem Material aus rekombinantem TE beschrieben. Dabei wurde angestrebt, die mechanischen Eigenschaften des nativen Elastins zu erreichen. Die hergestellten Materialien wurden deshalb durch Bestimmung des Elastizitätsmodul E mechanisch charakterisiert. Der Elastizitätsmodul E gilt als Kennwert für den proportionalen Zusammenhang zwischen Spannung σ und Dehnung ϵ bei der Verformung fester Körper. Weiterhin wurde untersucht, ob die Materialien als Träger für die Einwanderung von z.B. Fibroblasten dienen und somit als potentieller Hautersatz eingesetzt werden können. Eine vollständige Übersicht zu Elastizitätsmoduln und möglichen Anwendungsgebieten der Biomaterialien wurde von Yeo und Kollegen publiziert [Yeo et al., 2015]. Weiterhin wurden in der Veröffentlichung Methoden zur Herstellung von Hydrogelen oder von Proteinvliesen mittels Elektrosponnen erläutert. Nachfolgend werden einige Materialien erwähnt, die alleinig aus rekombinantem TE hergestellt wurden. Für die Quervernetzung der TE-Monomere wurden chemische Vernetzer wie Bissulfosuccinimidylsuberat (BS3) oder Glutaraldehyd (GA) verwendet.

BS3 vernetzt primäre Amine wie räumlich nahe Lysyl-Reste. GA bildet über die reaktiven Aldehydgruppen kovalente Bindungen zu freien Aminogruppen von Lysyl- und Arginyl-Resten aus. Außerdem wurde die enzymatische Quervernetzung mittels LOX aus *Pichia pastoris* (γ -LOX) durchgeführt. Für die chemisch bzw. enzymatisch vernetzten, feuchten TE-Hydrogele ergaben sich Elastizitätsmoduln von 220 – 280 kPa mit BS3 [Mithieux et al., 2004], 33 ± 5 kPa mit GA [Annabi et al., 2010] bzw. 8 – 12 kPa nach Inkubation mit der LOX aus *Pichia pastoris* [Mithieux et al., 2005]. Für ein elektrogewebtes Material aus rekombinatem TE nach Vernetzung mit GA wurde ein Elastizitätsmodul von 140 – 220 kPa bestimmt [Rnjak-Kovacina et al., 2011]. Es konnte weiterhin als Gerüststruktur zur Einwanderung von Fibroblasten dienen. Eine Lösung mit rekombinatem TE wurde in Formen gegossen, gefriergetrocknet und aggregierte durch Erhitzen auf 160 °C irreversibel [Mithieux et al., 2018]. Ein Einsatz von chemischen oder enzymatischen Quervernetzern zur Stabilisierung des schwammartigen Materials erfolgte dabei nicht. Der Elastizitätsmodul der feuchten, hitzestabilisierten Form („HeaTro“) lag bei 18 ± 1 kPa. Das Material förderte als Implantat die dermale Wundheilung im Tiermodell. Natürlich vernetztes Elastin, isoliert aus Rindernackenband, weist ein Elastizitätsmodul von 600 kPa auf [Fung, 1993; Fung und Sobin, 1981]. Vergleichsweise nah an dem Elastizitätsmodul des nativen Elastins lag das TE-Hydrogel nach Quervernetzung mittels BS3 mit 220 – 280 kPa [Mithieux et al., 2004]. Als Ursache für den deutlich niedrigeren Elastizitätsmodul von 8 – 12 kPa wurde ein geringer, durch die γ -LOX erzeugter Quervernetzungsgrad festgestellt [Mithieux et al., 2005]. Durch massenspektrometrische Analyse wurde ein 25-fach geringerer Desmosinanteil als in isoliertem Elastin aus Pferdenackenband nachgewiesen. Die elastischen Eigenschaften aller Materialien aus rekombinatem TE weichen damit von denen des natürlichen Elastins ab. Dabei ist weiterhin anzumerken, dass es dem gesamten bisher in *E. coli* produzierten TE und damit auch allen daraus hergestellten Biomaterialien an der Prolyl-4-Hydroxylierung mangelt.

1.1.3 Prolyl-4-Hydroxylierung

Bisher ist die genaue biologische Funktion des 4-Hydroxyprolins (HyP) in Tropoelastin (TE) nicht vollständig geklärt. Untersuchungen deuten jedoch auf einen möglichen Einfluss auf das Koazervationsverhalten von TE hin [Urry et al., 1979]. So konnte *in vitro* über Trübungsmessung mit synthetischen Elastin-Polypeptiden (VPGVG)_n mit steigendem HyP-Anteil eine höhere Temperatur zum Auslösen der Koazervation (T_c) nachgewiesen werden. Die T_c lag z.B. bei ca. 30 °C (1 % HyP), 37 °C (10 % HyP) bzw. 65 °C (100 % HyP).

Für synthetische Elastin-Polypeptide (VGVPVPG)₁₀ bzw. (VGVHyPG)₁₀ konnte eine unterschiedliche Morphologie nach Aggregation bei 50 °C gezeigt werden [Bochicchio et al., 2013]. Aufnahmen mittels Transmissionselektronenmikroskopie zeigten für das HyP-freie Peptid eher „filmartige“ Strukturen, während das HyP-haltige Polypeptid traubenartige Strukturen ausbildete.

Weiterhin wurde eine verringerte Anfälligkeit von hydroxylierten Elastin-Polypeptiden für einen proteolytischen Abbau festgestellt [Bochicchio et al., 2013]. Dafür wurden die resultierenden Peptide und Spaltstellen nach Inkubation der Polypeptide mit Pankreaselastase (EC 3.4.21.36) massenspektrometrisch analysiert. Pankreaselastase ist ein Enzym mit geringerer Spezifität, welche auch eher spaltungsresistente Proteine, wie z.B. Elastin, hydrolysiert

[Schmelzer et al., 2012]. Die Anzahl an Peptiden und Spaltstellen nach dem Verdau war bei dem nicht-hydroxylierten Polypeptid höher als bei der hydroxylierten Variante.

Ein hoher Hydroxylierungsgrad von ca. 37 % wurde in Elastin der menschlichen Bandscheiben mittels Aminosäureanalyse nachgewiesen [Mikawa et al., 1986], welche einer hohen Druckbelastung ausgesetzt sind. Eine Reinheit des isolierten Elastins sowie die vorhandene Isoform wurden allerdings nicht angegeben. Der Hydroxylierungsgrad des *Ligamentum flavum* (*yellow ligament*) hingegen war mit 9,8 % deutlich geringer. Ein gewebeabhängiger Unterschied des Hydroxylierungsgrades wurde auch durch Schmelzer und Kollegen festgestellt. Dabei wurde semi-quantitativ der höchste Hydroxylierungsgrad des Prolyl-Restes P-190 (Nummerierung nach Swiss-Prot Datenbankeintrag P15502-2) in Elastin der Bandscheiben (92 ± 4 %) bestimmt. Der entsprechende Hydroxylierungsgrad für Elastin der Haut betrug 71 ± 5 %. Dies lässt einen Zusammenhang zwischen dem Hydroxylierungsgrad und den biomechanischen Eigenschaften des Elastins vermuten [Schmelzer et al., 2016].

Ein wichtiges, strukturgebendes Proteinpolymer und Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix bei Vertebraten ist Kollagen. In der menschlichen Dermis beträgt der Kollagenanteil ca. 70 – 80 % des Trockengewichtes [Weinstein und Boucek, 1960]. Markant für die Primärsequenz sind X-Y-G Motive, bei denen sich an der X- und Y-Position hauptsächlich Prolyl- und 4-Hydroxyprolyl-Reste befinden [Shoulders und Raines, 2009]. Der Hydroxylierungsgrad aller Prolyl-Reste in humanem Kollagen liegt zwischen 42 – 54 % [Chung und Miller, 1974; Uitto, 1979b]. Eine entscheidende Funktion kommt HyP bei der Bildung der Kollagenfasern zu, die für die Zugfestigkeit menschlicher Gewebe verantwortlich sind. Die posttranslationale Modifikation ist essentiell, damit aus drei Kollagensträngen eine bei Körpertemperatur stabile α -Tripelhelix gebildet wird [Berg und Prockop, 1973]. Die Untersuchungen erfolgten an aus Hühnerembryonen isoliertem, nicht-hydroxyliertem Protokollagen und hydroxyliertem Prokollagen. Die Stabilisierung der Tripelhelix erfolgt durch die elektronenziehende Wirkung des Sauerstoffs in HyP und die dadurch veränderte Orientierung des Proteinerückgrates [Gorres und Raines, 2010; Holmgren et al., 1998]. Die Prolyl-4-Hydroxylierung erfolgt, wie bei Tropoelastin, im Lumen des ERs und wird durch die Prolyl-4-Hydroxylase (P4H, EC 1.14.11.2) katalysiert. Wie auch die Hühner-P4H ist die humane P4H (hP4H) ein Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$) mit einer molekularen Masse von ca. 240 kDa [Myllyharju, 2003; Neubauer et al., 2005]. Das katalytisch aktive Zentrum, die Bindedomäne für das Peptidsubstrat sowie die Dimerisierungsdomäne sind in der α -Untereinheit lokalisiert [Koski et al., 2017]. Es sind drei Isoenzyme der hP4H bekannt, die sich in der α -Untereinheit unterscheiden ($\alpha(I)$ – $\alpha(III)$); m. w.: ca. 65 kDa; Swiss-Prot Datenbankeinträge: P13674, O15460, Q7Z4N8) [Annunen et al., 1997; Kukkola et al., 2003]. Das Expressionsmuster variiert zwischen verschiedenen Geweben. Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde u.a. in elastogenen Fibroblasten und glatten Muskelzellen großer Arterien hauptsächlich das Isoenzym $[\alpha(I)]_2\beta_2$ nachgewiesen [Nissi et al., 2001]. Die α -Untereinheit ist ohne die β -Untereinheit (m. w.: 57 kDa; Swiss-Prot Datenbankeintrag: P07237) hochgradig unlöslich [Vuori et al., 1992a]. Die β -Untereinheit fungiert als Chaperon und ist außerdem eine Proteindisulphidisomerase (PDI, EC 5.3.4.1) [Kivirikko und Myllyharju, 1998]. Durch AS-Austausch der Cystein-Reste im CGHC-Motiv der PDI konnte gezeigt werden, dass die PDI-Aktivität nicht für die Tetramerisierung und Aktivität der hP4H entscheidend ist [Vuori et al.,

1992b]. Die β -Untereinheit weist C-terminal ein KDEL-Retentionssignal auf, welches den Verbleib des Enzyms im Lumen des ERs sicherstellt [Vuori et al., 1992a].

Die P4Hs zählen zur Enzymsuperfamilie der Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (EC 1.14.11). Die Superfamilie umfasst 71 Enzyme (Swiss-Prot Datenbank). Die meisten Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus wurden mit dem aus Hühnerembryonen isolierten, homologen Enzym durchgeführt. Die Isolation und Reinigung der Hühner-P4H mittels Poly(L-Prolin)-Affinitätschromatographie wurden beschrieben [Tuderman et al., 1975]. Dabei wurden aus 300 Hühnerembryonen (1 750 g Feuchtmasse) ca. 15 mg P4H isoliert.

Der mutmaßliche Reaktionsmechanismus der Fe(II)- und 2-OG-abhängigen Dioxygenasen ist in Abb. 1-4 dargestellt und kann in eine gekoppelte und eine ungekoppelte Reaktion unterteilt werden [Vasta und Raines, 2018]. Das Fe(II)-Ion wird durch zwei Histidinyl- und ein Aspartyl-Rest koordiniert, sodass drei Positionen für die Interaktion mit dem Co-Substrat α -Ketoglutarat bzw. 2-Oxoglutarat (2-OG) und H_2O vorhanden sind (Abb. 1-4, I). Zunächst bindet das 2-OG direkt am Fe(II)-Ion (Abb. 1-4, I). Infolge der Bindung des Peptidsubstrates wird das H_2O -Molekül verdrängt (Abb. 1-4, II). Nach der Bindung des molekularen Sauerstoffs O_2 (Abb. 1-4, III) wird ein Intermediat gebildet. Dieses greift das Keton des 2-OGs an und bildet ein zyklisches Peroxid-Molekül (Abb. 1-4, IV). Bei dem Zerfall dieses Intermediates wird CO_2 von 2-OG abgespalten und koordinativ gebundenes Succinat gebildet (Abb. 1-4, V). Die hochreaktive Fe(IV)-Oxo-Spezies zieht bei der gekoppelten Reaktion ein Wasserstoffatom des Prolyl-Restes an der C-4-Position (Abb. 1-4, VI).

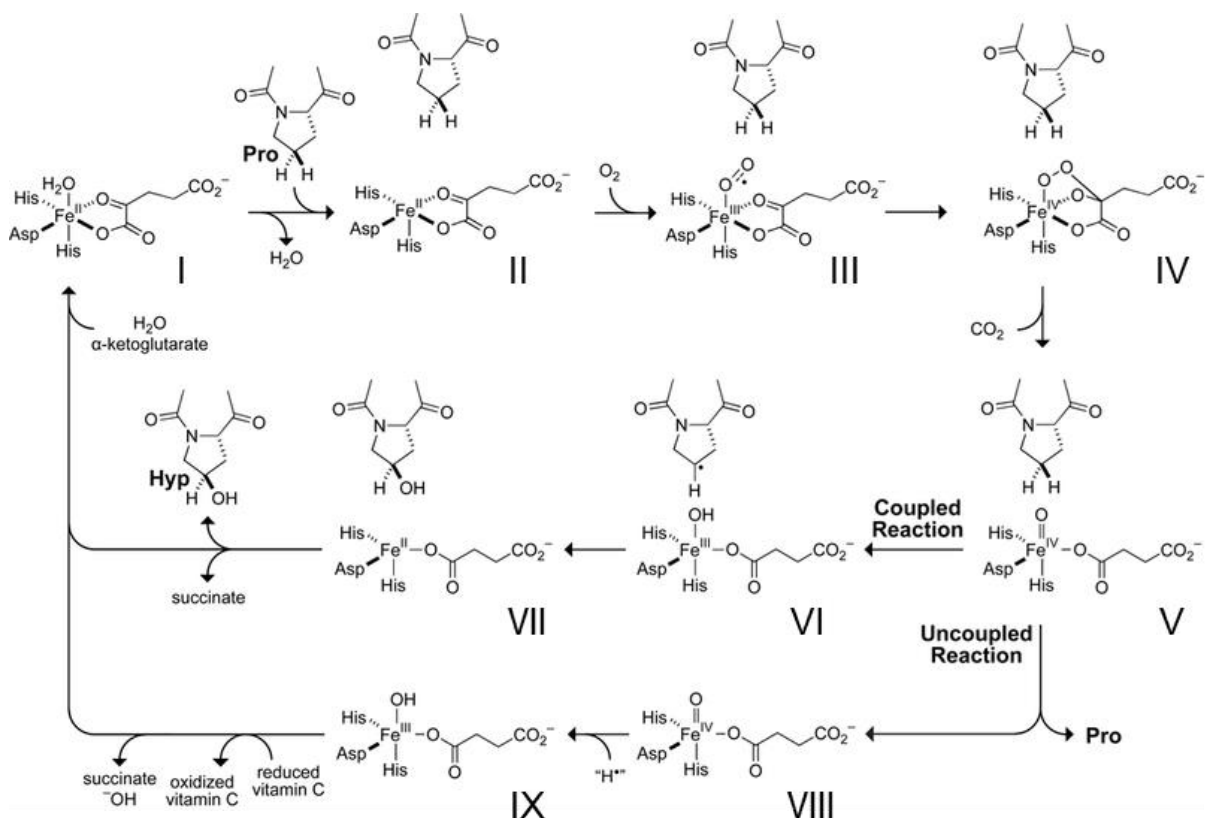


Abb. 1-4 Mutmaßlicher Reaktionsmechanismus der Fe(II)- und 2-OG-abhängigen Dioxygenasen. Modifiziert nach [Vasta und Raines, 2018].

Das Radikal reagiert mit dem Fe(III)-OH-Komplex zu *trans*-4-Hydroxyprolin und das Eisen-Zentrum erreicht ohne Ascorbat den aktiven Fe(II)-Zustand (Abb. 1-4, VII). Je ein Atom des molekularen Sauerstoffs wird in die Hydroxyl-Gruppe des 4-Hydroxyprolins und in das Succinat eingebaut.

Der Mechanismus der ungekoppelten Reaktion ist bisher nicht vollständig aufgeklärt worden. Dabei erfolgt die Decarboxylierung des 2-OGs unter O₂-Verbrauch, allerdings ohne Bildung von 4-Hydroxyprolin im Peptidsubstrat (Abb. 1-4, VIII). Danach geht die hochreaktive Fe(IV)-Oxo-Spezies in den Fe(III)-Zustand über (Abb. 1-4, IX), wobei der Ursprung des Wasserstoff-Radikals noch unbekannt ist. Das Enzym wird dadurch inaktiv. Um das Zentralion in den Fe(II)-Zustand zu überführen, wird Vitamin C (L-Ascorbinsäure) als Co-Substrat benötigt [Myllylä et al., 1984]. Dieses fungiert als Elektronendonator und wird zu Dehydroascorbat oxidiert. Dadurch wird die P4H reaktiviert [De Jong et al., 1982]. Ein Mangel durch eine zu geringe Aufnahme von Vitamin C führt zu einer verminderten Ausbildung von intaktem Kollagen und damit zum Krankheitsbild Skorbut [Vasta und Raines, 2016].

Die Messung der P4H-Enzymaktivität kann indirekt durch die Decarboxylierung von 2-Oxo-[¹⁴C]-glutarat zu [¹⁴C]O₂ erfolgen. In einem diskontinuierlichen Assay wird das freigesetzte [¹⁴C]O₂ aufgefangen und nach Abstoppen der Reaktion mittels Szintillationszähler vermessen. Als Peptidsubstrat dienen dabei kurze synthetische Peptide mit sich wiederholendem PPG-Motiv aus Kollagen. Die spezifische Aktivität der aus Hühnerembryonen isolierten P4H bei Reaktion mit 370 µM (PPG)₅ (K_M : 400 – 500 µM) betrug 0,96 µmol·min⁻¹·mg⁻¹ [Nietfeld und Kemp, 1980]. Die spezifische Aktivität bei der ungekoppelten Reaktion ohne Peptidsubstrat und unter sonst gleichen Bedingungen wurde zu 0,02 – 0,03 µmol·min⁻¹·mg⁻¹ bestimmt [Nietfeld und Kemp, 1980]. Weiterhin wurden 120 µM (PPG)₁₀ eingesetzt (K_M : 15 – 25 µM) [Kivirikko und Myllylä, 1982]. Der Anteil des [¹⁴C]CO₂ bei der ungekoppelten Reaktion ohne Peptidsubstrat entsprach 1 – 4 % des [¹⁴C]CO₂ bei Reaktion mit gesättigter Konzentration an (PPG)₁₀ [Myllylä et al., 1984]. Der Einsatz des kompetitiven Inhibitors Poly(L-Prolin) (M_r 8 000) verdoppelte den Anteil der ungekoppelten Reaktion [Myllylä et al., 1984]. Die Enzymaktivität der Hühner-P4H wurde von Nietfeld und Kemp außerdem über den Sauerstoffverbrauch bestimmt. Die kontinuierliche Messung der Sauerstoffkonzentration im Reaktionsansatz erfolgte mittels Clarke-Typ Elektrode. Die spezifische Aktivität der aus Hühnerembryonen isolierten P4H bei Reaktion mit 370 µM (PPG)₅ betrug 1,1 µmol·min⁻¹·mg⁻¹. Der Wert ist in Übereinstimmung mit der im [¹⁴C]O₂-Assay bestimmten spezifischen Aktivität von 0,96 µmol·min⁻¹·mg⁻¹ [Nietfeld und Kemp, 1980]. Als Peptidsubstrat für die hP4H dient z.B. das synthetische Peptid (PPG)₁₀ mit dem Motiv aus Kollagen (K_M : 15 µM) [Myllyharju und Kivirikko, 1997]. Poly(L-Prolin) (M_r 44 000) stellt einen kompetitiven Inhibitor der hP4H dar [Annunen et al., 1997]. Freies L-Prolin wird durch die hP4H nicht hydroxyliert [Prockop und Juva, 1965].

In die Enzymfamilie der Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen wird beispielsweise auch jene P4H eingeordnet, die den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) hydroxyliert (EC 1.14.11.29) [Epstein et al., 2001]. Dieser Transkriptionsfaktor ist ein Heterodimer (α , β) und ist für die Regulation von Genen in Säugerzellen bei Sauerstoffmangel beteiligt. Bei normaler Sauerstoffversorgung ist die α -Untereinheit (HIF α) an zwei spezifischen Prolyl-Resten

hydroxyliert, wodurch eine Bindestelle für das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein (pVHL, Swiss-Prot Datenbankeintrag: P40337) entsteht. Das pVHL ist Teil des Ubiquitin-Ligase-Komplexes, sodass HIF α ubiquitinyliert und proteasomal abgebaut wird [Kaelin und Ratcliffe, 2008].

Die Bildung von HyP als Proteinmodifikation ist nicht allein auf Vertebraten beschränkt. Homologe P4Hs und HyP wurden auch in Pflanzen, Algen und Viren entdeckt. Ein wichtiger Bestandteil der Zellwand von höheren Pflanzen und Algen sind beispielsweise hydroxyprolinreiche Glykoprotein (HPRGs) [Cassab, 1998]. Monomere P4Hs wurden u.a. in *Arabidopsis thaliana* [Hieta und Myllyharju, 2002] und *Chlamydomonas reinhardtii* [Keskiäho et al., 2007] identifiziert. Diese besitzen mit ca. 29 kDa im Vergleich zur Kollagen-P4H der Vertebraten eine deutlich geringere molekulare Masse und zeichnen sich durch eine andere Substratspezifität aus. So dienen vor allem Prolyl-Reste in Poly(L-Prolin) II Helices als präferiertes Substrat. Der K_M -Wert der P4H aus *C. reinhardtii* für Poly(L-Prolin) (M_r 31 000) liegt z.B. bei 7 μ M [Kaska et al., 1987]. Allerdings konnte auch das synthetische Modellpeptid für Kollagen (PPG)₁₀ mit den beiden Enzymen hydroxyliert werden [Hieta und Myllyharju, 2002; Keskiäho et al., 2007].

Ein Vertreter der viralen P4Hs stammt aus *Paramecium bursaria* Chlorella Virus-1 (PBCV-1). Dieses dsDNA-Virus zählt zur Familie der Phycodnaviridae [Kang et al., 2005]. Es infiziert die einzellige Alge *Chlorella variabilis* NC64A, welche als Endosymbiont im Protisten *Paramecium bursaria* lebt (Abb. 1-5, S. 22). Die ikosaedrische Capsidhülle besteht aus einer äußeren Glycoproteinschicht, welche hauptsächlich aus dem N-glykosylierten Capsomer Vp54 (A430L, m. w.: 54 kDa) aufgebaut ist [Castro et al., 2017]. Das 330 000 Basenpaare umfassende Genom des Virus wurde Mitte der 1990er Jahre schrittweise sequenziert [Kutish et al., 1996; Li et al., 1995; Li et al., 1997; Lu et al., 1996; Lu et al., 1995]. Dabei wurden Proteine unbekannter Funktion mit Abschnitten gefunden, die ein prolinreiches PAPK-Motiv aufweisen (A145R, A246R, A316R, A405R). Für das Protein A384dL (m. w.: 69 kDa) mit diesem Motiv wurde eine mögliche Funktion als Nebencapsomer beschrieben [Dunnigan et al., 2012]. Es wurde gezeigt, dass die prolinreichen PAPK-Wiederholungen als Substrat für ein durch das Virusgenom codiertes Protein (A085R) dienen und somit HyP wahrscheinlich auch in viralen Proteinen vorkommt [Eriksson et al., 1999]. Die AS-Sequenz des Proteins A085R (Swiss-Prot Datenbankeintrag: Q84406) ist außerdem zu 20 % identisch zur C-terminalen Hälfte der α (I)-Untereinheit der humanen P4H (R294 – G504, Nummerierung exkl. 17 AS Signalpeptid), woraus eine Funktion als P4H geschlussfolgert wurde [Eriksson et al., 1999; Helaakoski et al., 1989]. Die genaue biologische Funktion der Prolyl-4-Hydroxylierung im Virus ist bisher jedoch nicht aufgeklärt worden.

Eine um die N-terminale Transmembrandomäne (Y13 – E33) verkürzte Variante der monomeren P4H A085R (E36 – K242) aus PBCV-1 wurde erstmals 1999 rekombinant in *E. coli* produziert und chromatographisch gereinigt [Eriksson et al., 1999]. Die Kristallstruktur dieser verkürzten P4H-Variante wurde von Longbotham und Kollegen veröffentlicht (Abb. 1-5; PDB: 5C5U) [Longbotham et al., 2015]. Dargestellt sind die in der Enzymfamilie hochkonservierten acht β -Faltblätter I-VIII (Abb. 1-5, C, rot). Das Fe²⁺-Ion wird im aktiven Zentrum Häm-unabhängig durch eine Eisen-Bindestelle aus zwei Histidinyln-Resten (His152, His221) und einem Aspartyl-Rest (Asp154) koordiniert (Abb. 1-5, C, türkis). Diese sind in dem Motiv HXD/E...H angeordnet. Das Enzym weist zwei Cysteinpaare auf, die jeweils eine Disulphidbrückenbindung

ausbilden (Abb. 1-5, C, gelb). Die koordinative Bindung des 2-OG Moleküls erfolgt in der Bindetasche durch einen Lysyl-Rest (Lys231).

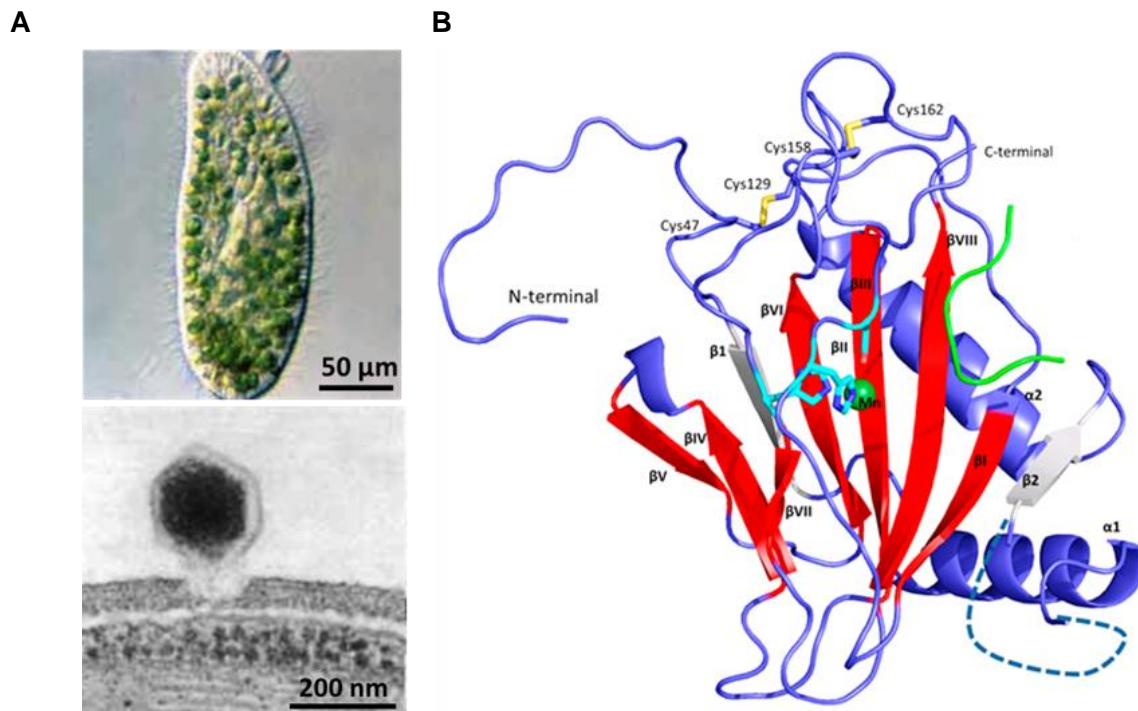


Abb. 1-5 (A) *Paramecium bursaria* mit endosymbiontischer Alge *Chlorella variabilis* (oben) bzw. PBCV-1 an Zellwand der Alge (unten). Modifiziert nach [Kang et al., 2005]. (B) Kristallstruktur der N-terminal verkürzten cvP4H-Variante (E36 – K242) (PDB: 5C5U), Fe²⁺ wurde zur Kristallisation durch Mn²⁺ (grüne Kugel) ersetzt, um ein inaktives Enzym zu bilden [Longbotham et al., 2015].

Enzymkinetische Kenngrößen der P4H aus PBCV-1 (cvP4H) wurden in einem diskontinuierlichen [¹⁴C]O₂-Assay mittels Decarboxylierung von 2-Oxo-[¹⁴C]-glutarat bestimmt. Die K_M -Werte für die Co-Substrate lagen bei 0,4 µM (Fe²⁺), 20 µM (2-OG) bzw. 300 µM (Ascorbat) [Eriksson et al., 1999]. Bei der Reaktion mit dem synthetischen Peptid (PAPK)₅ (K_M : 50 µM) wurde z.B. ein V_{max} von 10 300 cpm/µg ermittelt. Durch N-terminale Sequenzierung des hydroxylierten (PAPK)₅ konnte dabei gezeigt werden, dass der N-terminale Prolyl-Rest nicht und der C-terminale Prolyl-Rest um Faktor 2 – 4 weniger hydroxyliert wurden als interne Prolyl-Reste [Eriksson et al., 1999]. Dieses Ergebnis stimmt mit dem massenspektrometrisch nachgewiesenen Einbau von acht Sauerstoffatomen in das synthetische (PAPK)₅-Peptid überein [Longbotham et al., 2015]. Weiterhin wurden das synthetische (PPG)₁₀-Peptid (K_M : 2,9 mM) und Poly-(L-Prolin) (M_r 40 000, K_M : 100 µM) von der rekombinanten cvP4H hydroxyliert [Eriksson et al., 1999]. In der Reaktion mit dem synthetischen Peptid (PPG)₁₀ (0,2 mM) wurden 5450 cpm [¹⁴C]O₂ gebildet [Eriksson et al., 1999]. Für verschiedene, nicht näher definierte Negativkontrollen wurden hingegen weniger als 500 cpm [¹⁴C]O₂ erzeugt. Dies spricht für einen Anteil der ungekoppelten Reaktion von ca. 10 %. Freies L-Prolin wurde nicht als Substrat für die cvP4H getestet.

Die Hydroxylierung von humanem Kollagen COL(III) A1 (Swiss-Prot Datenbankeintrag: P02461-1, m. w. Präpro-Protein: 139 kDa) mit der cvP4H war durch Coexpression der beiden Proteine in *E. coli* möglich [Shi et al., 2017]. Die Induktion der cvP4H-Produktion erfolgte durch Zugabe von 0,1 mM bzw. 0,5 mM IPTG. Zeitgleich wurde die Produktion des COL(III) A1

mittels Hitzeschock durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf 42 °C bzw. 50 °C induziert. Das 4-Hydroxyprolin wurde massenspektrometrisch nachgewiesen. Der erzeugte Hydroxylierungsgrad in den Peptiden nach tryptischem Verdau (Sequenabdeckung: 63 %) lag bei 35 % (Bedingung C1: 0,1 mM IPTG; 42 °C), 54 % (Bedingung C2: 0,5 mM IPTG; 42 °C) bzw. 73 % (Bedingungen C3: 0,5 mM IPTG; 50 °C) der nachgewiesenen Prolyl-Reste. Weiterhin wurde in nativem und in dem durch die cvP4H hydroxylierten COL(III) A1 das Peakflächenverhältnis von HyP zu Pro mittels Aminosäureanalyse bestimmt [Shi et al., 2017]. Der Hydroxylierungsgrad des nativen Kollagens COL(III) A1 liegt laut HPLC-Analyse der FMOC-derivatisierten Aminosäuren bei 54 % aller Prolyl-Reste [Rutschmann et al., 2014]. In nativem COL(III) A1 lag das Verhältnis bei 105 % und war unter Bedingung C3 der Coexpression mit 87 % am höchsten [Shi et al., 2017]. Demnach war es mit der cvP4H möglich, neben kurzen, synthetischen Peptiden, auch ein Volllängen-Protein mit einem ähnlichen Hydroxylierungsgrad wie in nativem COL(III) A1 zu erzeugen.

Diese Ergebnisse sowie die einfache, monomere Struktur machen die cvP4H zu einem interessanten Kandidaten für die enzymatische Prolyl-4-Hydroxylierung von rekombinantem TE.

1.2 Motivation und Zielsetzung

In Deutschland waren 2015 ca. 0,24 % der Bevölkerung von *Ulcus cruris* („offenes Bein“), Druckgeschwüren und dem diabetischen Fußsyndrom betroffen [Kröger und Jöster, 2018]. Bereits im Zeitraum von 2010 bis 2012 wurde ein zunehmende Häufigkeit von chronischen Hauterkrankungen um 10 % festgestellt [Heyer et al., 2016]. Durch den demografischen Wandel und die steigende Lebenserwartung ist damit zu rechnen, dass die Zahl der Betroffenen weiterhin steigen wird [Diepgen, 2003]. Die Behandlung chronischer Wunden ist zeitaufwendig und stellt eine Belastung des Gesundheitssystems dar [Augustin et al., 2014]. Der Marktanteil der traditionellen, trockenen Wundversorgung in Deutschland nahm von 2016 bis 2018 ab. Im selben Zeitraum stieg der Marktanteil von speziellen Wundversorgungsprodukten um ca. 3 %, die damit an Bedeutung gewinnen. Der Großteil des Absatzes entfiel 2018 auf hydroaktive Wundaufgaben mit einem Umsatz von ca. 145 Mio. Euro [Poersch, 2018].

Durch seine Eigenschaften ist Elastin ein vielversprechender Ausgangsstoff für neue Biomaterialien zur Wundversorgung. Als Vorläuferprotein des Elastins steht dabei Tropoelastin (TE) im Fokus, um geschädigtes Hautgewebe durch elastinhaltige Biopolymere zu ersetzen oder um chronische Wunden zu behandeln. Angestrebt wird dabei, der Haut ähnelnde elastische Eigenschaften zu erzeugen. Dadurch sollen vor allem mechanisch beanspruchte Hautareale, wie z.B. an Füßen und Gelenken, individuell und zielgerichtet besser behandelbar gemacht werden. Ein entscheidender Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften des Elastins könnte dabei dem 4-Hydroxyprolin zukommen. Die Prolyl-4-Hydroxylierung fehlt bisher rekombinant hergestelltem TE und allen daraus erzeugten Biomaterialien. Die mechanischen Eigenschaften könnten durch unterschiedliche Hydroxylierungsgrade modifiziert werden. In einem weiteren Schritt könnte das hydroxylierte TE zukünftig chemisch oder enzymatisch quervernetzt werden und als Wirkstoffträger dienen. Durch unterschiedliche Quervernetzungsgrade könnten wiederum die Eigenschaften des Biopolymers moduliert und daraus innovative Medizinprodukte entwickelt werden.

Aufgrund des hohen Bedarfs an Ausgangsmaterial zur Herstellung von Biopolymeren, ist eine stabile Produktionsstrategie von rekombinatem TE essentiell. Ziel dieser Arbeit war zunächst die Etablierung einer Plattform zur biotechnologischen Produktion von rekombinatem, humanem TE (Isoform 2). Anschließend sollte die Methode der TE-Extraktion und Aufarbeitung entwickelt werden. Angestrebt wurde, TE im Gramm-Maßstab für weiterführende Experimente zur Verfügung zu stellen. Die Proteinreinheit des produzierten TEs sollte analysiert und gegebenenfalls durch einen zweiten Reinigungsschritt erhöht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte weiterhin die virale Prolyl-4-Hydroxylase aus PBCV-1 (cvP4H) rekombinant hergestellt und chromatographisch gereinigt werden. Ziel war es, erstmals rekombinantes TE *in vitro* mit der cvP4H zu hydroxylieren. Die Reaktion sollte indirekt über den Sauerstoffverbrauch in einem kontinuierlichen Assay verfolgt und die Enzymaktivität bestimmt werden. Der direkte Nachweis von 4-Hydroxyprolin sollte anschließend massenspektrometrisch erfolgen, um das erzeugte Hydroxylierungsmuster im rekombinanten TE zu ermitteln und Aufschluss über die Substratspezifität der cvP4H zu erlangen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien sind in Tab. 2-1 zusammengestellt.

Tab. 2-1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9372.3	≥ 99,8 %
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 29:1 (30 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	A124.2	k.A.
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	5210.2	k.A.
Agarose, pEQ GOLD	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)	35-1020	k.A.
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	8076.2	≥ 98 %
Ammoniak-Lösung (25 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	5460.2	reinst
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	7869.2	≥ 97 %
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	K298.2	≥ 99,7 %
Ammoniumeisen(II)-sulfat Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	P728.1	≥ 99 %
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	K029.2	≥ 97 %
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9592.3	≥ 98 %
Anti-PolyHistidin Antikörper, produziert in Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	H1029	k.A.
Anti-Maus-IgG Alkalische Phosphatase Antikörper, produziert in Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	A3562	k.A.
L(+)-Ascorbinsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3525.1	≥ 99 %
BCIP/NBT Blot Solution SERVAColor	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)	15245	k.A.

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	A512.1	k.A.
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	5239.1	≥ 99 %
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3313.1	≥ 99 %
Coomassie-Brillantblau G 250	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	9598.1	k.A.
Dinatrium-EDTA Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	8043.2	≥ 99 %
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	4984.1	≥ 99,5 %
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	8043.2	≥ 99 %
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	103943	≥ 99 %
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3738.2	100 %
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9065.4	≥ 99,8 %
Ethidiumbromid-Lösung (1 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	2218.1	1 %
Formaldehyd-Lösung (23,5 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6742.1	23,5 %
Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6887.5	k.A.
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3783.2	≥ 99,5 %
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	2317.2	≥ 99,5 %
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	2363.2	k.A.
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9105.4	≥ 99,5 %
Imidazol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	X988.4	≥ 99 %
Isopropyl-β-D-galactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	2316.4	≥ 99 %
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6781.1	≥ 99,5 %

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	P018.2	≥ 98 %
Kanamycinsulfat (Kanamycin A)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	T832.3	k.A.
Kobalt(II)-chlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	7095.1	≥ 98 %
Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	102780	≥ 98 %
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	P027.2	≥ 99 %
Mangan(II)-sulfat Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	4487.1	≥ 98 %
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	4227.2	≥ 99 %
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	7342.1	≥ 99,9 %
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	A135.2	≥ 99,5 %
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	P029.4	≥ 99 %
Natriumdithionit Anhydrat	k.A.	k.A.	k.A.
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6771.1	≥ 98 %
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	P034.2	≥ 99,5 %
Ortho-Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9079.2	reinst
2-Oxoglutar säure Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	75892	≥ 98 %
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6367.2	≥ 99 %
PageRuler™ vorgefärbte Proteinleiter (10 – 180 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	26617	-
Pierce™ ungefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	26610	-
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	T910.1	≥ 99,9 %
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	4625.2	37 %

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
ROTI®-Stock 20 % SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	1057.1	20 %
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	6207.1	≥ 99,9 %
Struktol J673	Schill & Seilacher (Ham- burg, Deutschland)	3029673	-
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	2367.3	≥ 99 %
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	4855.3	≥ 99,9 %
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	3051.4	reinst
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	8952.4	k.A.
Tween®-20	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	9127.1	k.A.
Zinksulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)	K301.1	≥ 99,5 %

2.2 Geräte

Sämtliche verwendeten Geräte sind in Tab. 2-2 zusammengestellt.

Tab. 2-2 Übersicht über die verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Autoklav	Varioklav Dampfsteri- lisator	H&P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Brutschrank	KP 196	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Chromatographieanlage	ÄKTA Pure	GE, Hamburg, Deutschland
Chromatographiematerial	Nickel Sepharose Excel	GE, Hamburg, Deutschland
	SP Sepharose® Fast Flow	GE, Hamburg, Deutschland
Dialyseschlauch	Spectra/POR 25 kDa	Spectrum laboratories Inc., Ravensburg, Deutschland
Fermentationsanlage	Biostat C 30 L	B. Braun International GmbH, Melsun- gen, Deutschland
	Biostat D 200 L	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Filterpapier	Whatman®-Papier GB005 (1,5 mm)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Flowbox	Nu-440-400	NuAire Inc., Plymouth, USA

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Flüssigchromatograph	LC 1260 Infinity	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Gefriertrocknungsanlage	Lyovac GT 2-E	Steris, Mentor, USA
Geldokumentationsanlage	G:Box	Syngene, Cambridge, UK
Glucoseanalysator	YSI 2700 Select	YSI Inc., Yellow Springs, USA
Hochdruck-Zellaufschluss-system	APV-2000	APV systems, Albertslund, Dänemark
	OneShot	Constant Systems Ltd., Northants, UK
Inkubationsschüttler	Multitron	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
Leitfähigkeitsmessgerät	Qcond 2200	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mikrowelle	NN-SD452W	Panasonic, Kadoma, Japan
Nano-DSF/Aggregationsoptik	Prometheus NT.48	NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland
	Prometheus NT.48 Series nanoDSF Grade Standard Capillaries	NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland
Nitrocellulosemembran	Amersham TM -Protran TM 0,2 µm NC	GE, Hamburg, Deutschland
Oxytherm+	Version „R“	Hansatech Instruments Ltd., Pentney, UK
Peptidsynthese	SYRO I Multiple Peptide Synthesizer	Multisyntech Scientific Instruments GmbH, Witten, Deutschland
Pipetten	Research Plus 0,5 – 10 µL 2 – 20 µL 20 – 200 µL 100 – 1000 µL 500 – 5000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	FiveEasy	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Photometer	Genesys 10S UV-VIS	Thermo Scientific, Waltham, USA
	Ultrospec2100pro	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
	NanoDrop One ^C	Thermo Scientific, Waltham, USA
Rotationsverdampfer	HeidolPh2	HeidolPh Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Röhrenzentrifuge	CEPA Z61G	Padberg, Lahr, Deutschland
Rührplatte	Variomag Mono	Thermo Scientific, Waltham, USA
SDS-PAGE Kammer mit Zubehör	SE215/245, SE250	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Semi dry Blotting Apparatur	V10-SDB	Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Sterilfilter	Porengröße: 0,22 µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sterilfilter	Steritop™ Millipore Express®Plus (PES; 0,22 µm)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Stromgerät Elektrophorese	EPS 301	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Temperaturmessgerät	Testo 108	Testo SE & Co. KGaA, Titisee-Neustadt, Deutschland
Thermoblock	Thermostat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler	Biometra® Tpersonal	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultrafiltrationseinheit	Amicon Ultra15	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Umlaufkühler	Minichiller	Huber Kältemaschinenbau AG, Offenburg, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ultraturrax	Micra R-T D-1	ART moderne Labortechnik, Mühlheim, Deutschland
Vakuumpumpe	PC 511	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Vortexer	MX-S	Dragon Laboratory Instruments Ltd, Beijing, China
Waage	APX-100	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	BP221S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	572-37	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
	FKB36K0.1	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage (Reinstwasser)	TKA-GenPure	Thermo Scientific, Waltham, USA
Wipptisch	60281-00	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Zentrifugationsverdampfer	SpeedVac Concentrator Setup	Thermo Scientific, Waltham USA
Zentrifuge	Sorvall Lynx 6000	Thermo Scientific, Waltham, USA
	Avanti™ J-30i	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
	Rotor: JA-10	
	Rotor: JA-30.50	
	5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland	

2.3 Puffer

Sämtliche verwendeten Puffer sind in Tab. 2-3 zusammengestellt. Das Einstellen des pH-Wertes erfolgte immer bei RT (20 – 23 °C).

Tab. 2-3 Übersicht über die verwendeten Puffer.

Bezeichnung	Komponente Molarität	pH	Bemerkungen zur Herstellung
TAE-Puffer	40 mM Tris 1 mM EDTA 20 mM Essigsäure	8,5	
Aufschlusspuffer	0,01 M Ammoniumacetat	6,7	Einstellen pH nicht nötig
Ammoniumacetat-Puffer	0,25 M Ammoniumacetat	5,0	pH mit Essigsäure einstellen
Extraktionsmix	70 % Aceton 20 % 0,25 M Ammoniumacetat-Puffer 10 % dH ₂ O	5,0	
Kathodenpuffer (10x)	0,25 M Tris 1,9 M Glycin 1 % SDS	-	vor Verwendung auf 1x verdünnen
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl 13,9 mM SDS	8,8	
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl 13,9 mM SDS	6,8	
SDS-Probenpuffer (1x)	0,22 M Tris/HCl 173 mM SDS 0,746 mM Bromphenolblau 5,43 M Glycerol	6,8	Zugabe von 10 µL/mL β-Mercaptoethanol
SDS-Probenpuffer mit Harnstoff	0,1 M Tris/HCl 86,7 mM SDS 0,746 mM Bromphenolblau 0,865 M Glycerol 6 M Harnstoff	8,0	Zugabe von 10 µL/mL β-Mercaptoethanol
Towbin-Puffer (TB)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol 0,1 % (w/v) SDS	8,3	
TBS	20 mM Tris/HCl 500 mM NaCl	7,5	

Bezeichnung	Komponente Molarität	pH	Bemerkungen zur Herstellung
TBS-T	20 mM Tris/HCl 500 mM NaCl 0,05 % (v/v) TWEEN®-20	7,5	
Binde-/Waschpuffer (cIEX)	50 mM HEPES (1 M Harnstoff)	8,0	Filtriert (0,22 µm) und entgast.
Elutionspuffer (cIEX)	50 mM HEPES 1 M NaCl (1 M Harnstoff)	8,0	Filtriert (0,22 µm) und entgast.
CIP-Puffer (cIEX)	50 mM HEPES 500 mM NaCl 3 M Harnstoff	8,0	Filtriert (0,22 µm) und entgast.
Aufschlusspuffer (IMAC)	20 mM Tris/HCl 500 mM NaCl 20 mM Imidazol 1 mM PMSF	7,9	Filtriert (0,22 µm) und entgast. Zugabe von PMSF direkt vor Zellaufschluss
Binde-/Waschpuffer (IMAC)	20 mM Tris/HCl 500 mM NaCl 20 mM Imidazol	7,9	Filtriert (0,22 µm) und entgast.
Elutionspuffer (IMAC)	20 mM Tris/HCl 500 mM NaCl 500 mM Imidazol	7,9	Filtriert (0,22 µm) und entgast.
Lagerpuffer	20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl	7,9	

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen sind in Tab. 2-4 aufgeführt.

Tab. 2-4 Übersicht über die verwendeten Organismen.

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> BL21-Gold(DE3)	B F- <i>ompT hsdS</i> (_{r_B} - _{m_B} -) <i>dcm</i> ⁺ <i>Tet_r gal</i> λ(DE3) <i>endA Hte</i>
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F- Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 recA1</i> <i>endA1 hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ , <i>mK</i> ⁺) <i>phoA supE44</i> λ- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>

2.4.2 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tab. 2-5 aufgeführt.

Tab. 2-5 Übersicht der verwendeten Primer.

Primer	Nukleotidsequenz
T7 Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 Terminator	5'-CCGCTGAGCAATAACTAGC-3'
TE-Stop forward	5'-GGCCGTAAACGCAAATAATGATGAGGATCCGAATCCGAG CTC-3'
TE-Stop reverse	5'-TCATCATTATTTGCGTTTACGGCCACACGCTTTACCCAGA CA-3'

2.4.3 Plasmidisolierung

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte mit dem GeneJET Plasmid Purification Kit (Thermo Scientific, USA) nach Herstellerangaben. Für eine bessere Ausbeute an Plasmid-DNA wurde der Bindschritt insgesamt dreimal durchgeführt. Die Elution erfolgte in dH₂O. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels NanoDrop One^C (Thermo Scientific, USA).

2.4.4 Subklonierung von *eln* aus pET-3d_TE in pET-28a(+)_cer

Die DNA-Sequenz für Tropoelastin (Isoform 2, GenBank Eintrag: AAC98394, Aminosäure 27–724; Anhang Abb. 8-1, S. 113) wurde in unpublizierten Vorarbeiten zur vorliegenden Arbeit durch die Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH (Regensburg, Germany) für die Codon-Nutzung von *E. coli* angepasst und synthetisiert. In unveröffentlichten Vorarbeiten wurde die DNA-Sequenz über die Schnittstellen *NcoI* und *BamHI* in den Vektor pET-3d (Novagen; Merck KGaA, Deutschland) kloniert. Weiterhin erfolgte die Insertion der *cer*-Sequenz [Summers und Sherratt, 1988] in den Vektor pET-28a(+) (Novagen; Merck KGaA, Deutschland) über die *SphI*-Schnittstelle. Die Insertion wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Benjamin Böhme (geb. Schrank) durchgeführt [Böhme, 2023]. Die Vektor-DNA wurde aus Zellen des *E. coli*-Stammes BL21-Gold(DE3) + pET-28a(+)_cer isoliert.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Subklonierung der DNA-Sequenz aus dem Plasmid pET-3d_TE in den Vektor pET-28a(+)_cer (alias pBS35). Die Restriktion und Insertion erfolgte über die Schnittstellen *NcoI* und *BamHI*. Ein Ausschnitt der Sequenz von pBS35_TE ist im Anhang in Abb. 8-1, S. 113 dargestellt. Das Screening auf Transformanten mit dem Plasmid pBS35_TE (s. Anhang, Abb. 8-2, S. 114) erfolgte mittels Kolonie-Polymerasekettenreaktion. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.4.5) nachgewiesen, ausgehend vom T7 Promoter Primer sequenziert (Eurofins Genomics, Deutschland) und die Sequenz von TE (Isoform 2) verifiziert.

2.4.4.1 Kolonie-Polymerasekettenreaktion (K-PCR)

Zellmaterial einer Kolonie wurde steril in 50 µL steriles dH₂O resuspendiert und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Die freigesetzte DNA der Zellen wurde für die K-PCR eingesetzt. Die

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tab. 2-6 und das Programm der K-PCR ist in Tab. 2-7 aufgeführt.

Tab. 2-6 Reaktionsansatz K-PCR.

Komponente	Volumen [μL]
Taq-Mix 2x (5 U/ μL Taq-Polymerase, Taq-Puffer mit MgCl_2 , dNTPs)	12,5
Template DNA	1
T7 Promoter Primer [12,5 pmol/ μL]	0,5
T7 Terminator Primer [12,5 pmol/ μL]	0,5
dH ₂ O	ad 25

Tab. 2-7 Programm K-PCR.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]
1. Initiale Denaturierung	95	3
2. Denaturierung	95	0,6
3. Primeranlagerung	52	0,6
4. Elongation	72	2,5
- Wiederholung 2. bis 4. für 25 Zyklen		
5. Finale Elongation	72	4
6. Pause	4	

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte in einem 1 %-igem Agarosegel. Dafür wurden 0,35 g Agarose in 35 mL TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und nach Abkühlen 20 μL Ethidiumbromid-Lösung [Stammlösung: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] zugegeben. Nach Gießen und Aushärten des Gels wurden 5 μL des DNA-Größenstandards und 5 μL Probe inkl. 1 μL 6x Loading-dye aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 80 V und 400 mA für 40 – 60 min.

2.4.6 Insertion von Stop-Codonen

Für die Mutagenese-PCR wurde die Plasmid-DNA pET-28a(+)_cer_TE (pBS35_TE) eingesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tab. 2-8 und das Programm der Mutagenese-PCR ist in Tab. 2-9 aufgeführt.

Die Klonierung des Amplifikates in den Vektor pBS35 erfolgte über die Schnittstellen *NcoI* und *BamHI*. Die Plasmid-DNA von Transformanten wurde ausgehend vom T7 Terminator Primer sequenziert (Eurofins Genomics, Deutschland) und die Insertion der zusätzlichen Stop-Codone (TGA TGA) verifiziert.

Tab. 2-8 Reaktionsansatz Mutagenese-PCR.

Komponente	Volumen [μL]
Phusion Reaktionspuffer (10x)	5
25 mM MgSO_4	4
Template DNA [50 ng/ μL]	1
TE-Stop forward Primer [100 pmol/ μL]	1
TE-Stop reverse Primer [100 pmol/ μL]	1
2 mM dNTPs	5
0,3 mM Phusion-Polymerase	1
dH ₂ O	ad 50

Tab. 2-9 Programm Mutagenese-PCR.

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]
1. Initiale Denaturierung	95	5
2. Denaturierung	97	1
3. Primeranlagerung	65	1
4. Elongation	72	4
– Wiederholung 2. bis 4. für 25 Zyklen		
5. Finale Elongation	72	2
6. Pause	4	

2.4.7 Chemotransformation von *Escherichia coli*

Die Transformation des *E. coli*-Stammes BL21-Gold(DE3) bzw. DH5 α mit dem Expressionsvektor pBS35_TE bzw. pET-16b_cvP4H erfolgte mittels Chemotransformation. Die Herstellung von chemokompetenten Zellen erfolgte durch die technische Assistentin der Arbeitsgruppe. 100 μL der bei -80°C gelagerten chemokompetenten Zellen von *E. coli* BL21-Gold (DE3) bzw. DH5 α wurden für 5 min auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von ca. 200 ng Plasmid-DNA für 1 h auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 45 sec im Wasserbad. Die Zellen wurden sofort für 3 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 400 μL M9 Minimalmedium bzw. LB-Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. 100 μL der Zellsuspension von *E. coli*-Zellen mit pBS35_TE wurden auf M9 Minimalmedium-Agar (+50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin) bzw. Zellen mit pET-16b_cvP4H auf LB-Agar (+100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin) ausplattiert und für 16 – 24 h bei 37°C inkubiert.

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Kultivierungsmedien und Zusätze

Die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Zusätze zur Kultivierung von *E. coli* sind in Tab. 2-10 aufgeführt. Alle Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 121°C für 20 min hitzesterilisiert. Die Zusammensetzung des Minimalmediums stammt aus

unpublizierten Arbeiten basierend auf dem Protokoll von Sivashanmugam und Kollegen [Sivashanmugam et al., 2009].

Tab. 2-10 Zusammensetzung der Medien und Zusätze zur Kultivierung von *E. coli*.

Bezeichnung	Komponenten	Bemerkung zur Herstellung
LB-Medium	10 g/L Trypton/Pepton aus Casein 10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt	pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen
LB-Agar	s. LB-Medium 2 % (w/v) Agar-Agar	-
M9-Minimalmedium	8,95 g/L Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 3,4 g/L KH ₂ PO ₄ 0,58 g/L NaCl 2,95 g/L NH ₄ Cl 2 mL/L Spurenelementlösung 1,2 g/L MgSO ₄ x 7 H ₂ O 20 g/L Glucose	Die Spurenelement-, Magnesiumsulfat- und Glucoselösung wurden als hochkonzentrierte SL separat hergestellt, sterilisiert und dem Puffermedium (pH 7,1) direkt vor Verwendung zugesetzt.
Feed-Lösung	s. M9-Minimalmedium 500 g/L Glucose statt 20 g/L Glucose	Das Puffermedium, die Spurenelement- und Magnesiumsulfat-Lösung wurden als hochkonzentrierte SL separat hergestellt, sterilisiert und der Glucoselösung direkt vor Verwendung zugesetzt.
Spurenelementlösung [Jenzsch et al., 2006]	20,3 g/L Na ₂ EDTA 16,7 g/L Fe ₃ Cl x 6 H ₂ O 0,74 g/L CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0,21 g/L CoCl ₂ x 6 H ₂ O 0,18 g/L ZnSO ₄ x 7 H ₂ O 0,1 g/L CuSO ₄ x 5 H ₂ O 0,1 g/L MnSO ₄ x H ₂ O	Sterilfiltration
M9-Minimalmedium-Agar	s. M9-Minimalmedium 2 % (w/v) Agar-Agar	-
Ampicillin-SL	100 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz	Sterilfiltration
Kanamycin-SL	50 mg/mL Kanamycinsulfat	Sterilfiltration
IPTG-SL	1 M IPTG	Sterilfiltration

2.5.2 Proteinproduktion im Schüttelkolbenmaßstab

2.5.2.1 Überproduktion von TE (IF 2)

Für die *E. coli*-Kultivierung zur Überproduktion von TE (IF 2) wurde M9-Minimalmedium verwendet (Tab. 2-10). Zellen von *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE wurden auf einer

Selektivplatte aus M9-Minimalmedium-Agar (+50 µg/mL Kanamycin) ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Für die Vorkultur wurden 20 mL M9-Minimalmedium (+50 µg/mL Kanamycin) mit einer Einzelkolonie der Platte inokuliert. Die Vorkultur wurde für 18 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert (Multitron Infors HAT, Schweiz). Ausgehend davon wurden für die Hauptkultur 100 mL M9-Minimalmedium (+50 µg/mL Kanamycin) auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Diese wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37 °C und 140 rpm schüttelnd inkubiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM). Nach der Induktion wurden die Zellen für weitere 2 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Für das Inokulieren der Hauptkultur ohne Kanamycin wurden das entsprechende Volumen an Zellsuspension der Vorkultur bei 3 220 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert (5810R; Hamburg, Deutschland). Das Zellpellet wurde im gleichen Volumen frischem M9-Minimalmedium (ohne Kanamycin) resuspendiert und die Hauptkultur inokuliert.

2.5.2.2 Überproduktion der His₁₀-cvP4H

Die Anpassung der Codon-Nutzung für *E. coli*, die Gensynthese und die Klonierung des Gens wurden durch die Firma BioCat GmbH (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen zur Überproduktion der His₁₀-cvP4H orientierten sich an Literaturangaben [Eriksson et al., 1999]. Die Zusammensetzung des LB-Mediums ist in Tab. 2-10 aufgeführt. Zellen von *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pET-16b_cvP4H wurden auf einer Selektivplatte aus LB-Agar (+100 µg/mL Ampicillin) ausgestrichen und für 16 h bei 37 °C inkubiert. Mit einer Einzelkolonie dieser Platte wurden 100 mL LB-Medium (+100 µg/mL Ampicillin) angeimpft und für 16 h bei 37 °C und 140 rpm inkubiert (Multitron Infors HAT, Schweiz). Die Hauptkultur aus 500 mL wurde LB-Medium (+100 µg/mL Ampicillin) auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Die Zellen wurden vor dem Inokulieren der Hauptkultur mit frischem LB-Medium gewaschen, um die während der Vorkultur sekretierte β-Lactamase zu entfernen. Die Zellen der Hauptkultur wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C und 80 rpm kultiviert. Zum Induktionszeitpunkt wurde die Hauptkultur im Eisbad auf 28 °C gekühlt und die Zellen nach Induktion mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM) für 3 h bei 28 °C kultiviert.

Nach den gleichen Bedingungen wurde die Biofeuchtmasse produziert, die für die Reinigung der His₁₀-cvP4H eingesetzt wurde. Dabei wurden mehrere Hauptkulturen mit je 500 mL Medium parallel behandelt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 6 000 g und 4 °C für 30 min in der Avanti™ J-30i (Beckman Coulter GmbH, Deutschland). Die Zellen wurden in 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und bei 3 220 g und 4 °C für 15 min in der Zentrifuge 5810R (Eppendorf AG, Deutschland) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bis zur Aufarbeitung der His₁₀-cvP4H bei -20 °C gelagert.

2.5.3 Produktion von TE (IF 2) im Bioreaktormaßstab

Die Überproduktion von TE (IF 2) im 12 L-Bioreaktormaßstab erfolgte im Biostat C 30 L (B. Braun International GmbH, Deutschland). Die Kultivierung im 100 L-Bioreaktormaßstab erfolgte im Biostat D 200 L-System (Sartorius AG, Deutschland). Zur Prozesssteuerung wurden das DCU System des Biostat sowie die Software MFCS/win3.0 verwendet.

Die Kultivierung von *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE wurde in M9-Minimalmedium (Tab. 2-10, ohne Kanamycin) durchgeführt. Die Kultivierungstemperatur lag bei 37 °C. Das M9-Puffermedium für den Batch wurde im Bioreaktor sterilisiert. Die Spurenelement-,

Magnesiumsulfat- und Glucoselösung wurden separat autoklaviert und vor Prozessbeginn in den Bioreaktor überführt. Der pH-Wert wurde mittels 20 % (v/v) H_3PO_4 und 25 % (v/v) NH_3 auf pH 7,0 reguliert. Die anfängliche Begasungsrate im Biostat C 30 L lag bei 4,5 L/min und im Biostat D 200 L-System bei 30 L/min. Der Sollwert für die Konzentration an gelöstem Sauerstoff (pO_2) wurde mittels Regelungskaskade über die Rührerdrehzahl und die Begasungsrate mit Druckluft bei 25 % gehalten. Als Antischaummittel wurde bei Bedarf manuell 20 % (v/v) Struktol J673 über die Peristaltikpumpe zugegeben.

Die Zellanzucht für das Inokulum des Bioreaktors erfolgte in einer 3-stufigen Vorkultur in M9-Minimalmedium (+50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin). Zellen von *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE einer Kryokultur wurden zunächst auf einer Selektivplatte aus M9-Minimalmedium-Agar (+50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin) ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Für die erste Vorkultur wurden 2x 50 mL mit einer Einzelkolonie der Selektivplatte angeimpft und für 18 h bei 37 °C und 140 rpm inkubiert. Aus einer dieser Vorkulturen wurden 2x 100 mL Medium auf eine OD_{600} von 0,15 angeimpft und für 8 h bei 37 °C und 140 rpm inkubiert. Für die dritte Vorkultur wurden 4x 500 mL Medium auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und für 16 h bei 30 °C und 80 rpm inkubiert. Zur Herstellung des Inokulums wurden die Zellen der dritten Vorkultur durch Zentrifugation bei 6 000 g und 4 °C für 15 min geerntet (Sorvall Lynx 6 000, ThermoScientific, USA), in sterilem M9-Puffermedium resuspendiert und zum Prozessstart in die 12 L Medium überführt. Bei der Kultivierung im 100 L-Maßstab wurden 88 L M9-Puffermedium im Reaktor sterilisiert, die Zusätze steril zugefügt und entsprechend 12 L der dritten Vorkultur als Inokulum in den Bioreaktor überführt.

Das Zellwachstum wurde durch halbstündliche Messung der OD_{600} verfolgt (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific, USA). Als Blank diente dH_2O . Für die Korrelation zwischen OD_{600} und der BTM wurde der Faktor 0,3 verwendet. Zur Analyse der Proteinüberproduktion mittels SDS-PAGE wurden 1/ OD -Proben angelegt. Das entsprechende Volumen der Zellsuspension wurde dafür bei 16 000 g für 1 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Zur Messung der Glucose-Konzentration im Medium wurde der Glucoseanalysator YSI 2 700 Select (YSI Inc., USA) verwendet. Um eine Kontamination des Gerätes mit *E. coli*-Zellen zu vermeiden, wurden die Proben der Zellsuspension bei 16 000 g für 1 min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde für die Messung ggf. mit dH_2O verdünnt (Messbereich: 0 – 9 g/L Glucose). Sobald die Glucose-Konzentration im Bioreaktor ca. 5 g/L erreichte, erfolgte die pulsweise Zugabe der Feed-Lösung mit frischem M9-Minimalmedium und zusätzlichen 10 g/L bzw. 5 g/L Glucose. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei einer OD_{600} von ca. 16 durch Zugabe von sterilfiltrierter IPTG-Lösung (Endkonzentration: 1 mM). Die Zellernte erfolgte 2 h nach Induktion durch Zentrifugation bei 6 000 g und 4 °C für 15 min mittels Sorvall Lynx 6 000 (ThermoScientific, USA) oder mittels Röhrenzentrifuge CEPA Z61G (Padberg, Deutschland) bei 17 000 g. Die BFM wurde bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Der Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$ wurde durch Division der in Gramm erzeugten Biotrockenmasse (X) und der verbrauchten Gramm Glucose (S) berechnet. Die Bestimmung der Wachstumsrate in der exponentiellen Phase μ_{max} erfolgte über die Steigung der Geraden im linearen Bereich nach logarithmischer Auftragung ($R^2 > 0,99$). Die Berechnung der Verdopplungszeit t_d erfolgte nach (Gl. 1).

$$\text{(Gl. 1) Verdopplungszeit } t_d[\text{h}^{-1}] = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}$$

mit μ_{\max} Wachstumsrate in exponentieller Phase [h^{-1}]

2.5.4 Plasmidstabilitätstest [Vyas et al., 1994]

Zur Bestimmung der segregativen Plasmidstabilität wurden die zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen Zellproben mit steriler 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung in einer Verdünnungsreihe verdünnt. Je 100 μL der Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} wurden auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. Nach Inkubation für 16 h bei 37 °C wurden je 100 Kolonien mit sterilen Zahnstochern zuerst auf eine LB-Agar-Platte und danach mit dem gleichen Zahnstocher auf eine LB-Selektivplatte übertragen. Die Platten wurden für 16 h bei 37 °C inkubiert und die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Das Verhältnis der Kolonienanzahl der Selektivplatte zur jener der Agar-Platte entspricht der segregativen Plasmidstabilität.

2.6 Proteinchemische Methoden

2.6.1 SDS-PAGE [Laemmli, 1970]

Die Komponenten für die Herstellung der Trenn- und Sammelgele sind in Tab. 2-11 aufgeführt. Die Zusammensetzung der jeweiligen Gelpuffer, des Kathodenpuffers und des SDS-Probenpuffers ist Tab. 2-3 zu entnehmen. Die zu trennenden Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 99 °C bzw. für 10 min bei 95 °C bei TE-haltigen Proben inkubiert. Die aufgetragenen Probenvolumina sind den jeweiligen Bildunterschriften der vorliegenden Arbeit zu entnehmen. Die diskontinuierliche Elektrophorese wurde bei einem Gel bei 300 V und 40 mA für 6 min (Stufe 1) bzw. bei 300 V und 30 mA für 45 min (Stufe 2) durchgeführt.

Tab. 2-11 Komponenten der Trenn- bzw. Sammelgele (Dicke: 1 mm).

Komponente	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (4,5 %)
Gelpuffer	1,25 mL	0,625 mL
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung (30 %)	2,1 mL	0,75 mL
dH ₂ O	1,65 mL	1,5 mL
TEMED	5 μL	5 μL
APS (gesättigte Lösung in dH ₂ O)	10 μL	4 μL

2.6.2 Färbung von SDS-PAGE Gelen

2.6.2.1 Coomassie-Färbung

Zur Detektion der aufgetrennten Proteine wurden die SDS-PAGE Gele entweder für mehrere Stunden in der Färbelösung auf einem Wipptisch inkubiert oder mittels Mikrowelle in Intervallen von 30 sec bis zum Sieden erhitzt. Nach Entfernen der Färbelösung wurden die Gele für

1 h mit Entfärbelösung und danach bis zum maximalen Kontrast in dH₂O entfärbt. Die verwendeten Reagenzien sind in Tab. 2-12 aufgeführt. Die Nachweisgrenze für Coomassie-Brillantblau G 250 liegt bei 0,5 µg Protein.

Tab. 2-12 Reagenzien für Coomassie-Färbung.

Bezeichnung	Komponenten	Bemerkung zur Herstellung
Färbelösung	1 g Coomassie-Brillantblau G 250 20 % (v/v) 2-Propanol 10 % (v/v) Essigsäure	Coomassie-Brillantblau in 700 mL dH ₂ O unter Rühren lösen, Zugabe der anderen Komponenten, Filtrieren
Entfärbelösung	20 % 2-Propanol 10 % Essigsäure	Komponenten mischen und ad 1 L mit dH ₂ O

2.6.2.2 Silberfärbung [Blum et al., 1987]

Die Silberfärbung weist im Vergleich zur Coomassie-Färbung eine 100-fach höhere Sensitivität auf. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 µg bis 1 ng Protein. Um Kontaminationen mit Proteinen möglichst zu minimieren, wurde sämtliches Material beim Herstellen der SDS-PAGE Gele mit Ethanol gereinigt. Die Durchführung der Silberfärbung ist in Tab. 2-13 beschrieben.

Tab. 2-13 Protokoll der Silberfärbung. Je 100 mL der aufgeführten Lösungen wurden pro SDS-PAGE Gel eingesetzt.

Schritt	Lösung	Zeit
1. Fixieren	500 mL Methanol 120 mL Essigsäure (100 %) 0,78 mL Formaldehyd (23,5 %) ad 1 L mit dH ₂ O	2 h
2. Waschen	50 % (v/v) Ethanol	3x 20 min
3. Sensitivieren	0,2 g/L Na ₂ S ₂ O ₃	1 min
4. Waschen	dH ₂ O	3x 20 s
5. Färben	0,5 g AgNO ₃ 295 µL Formaldehyd (23,5 %) ad 250 mL mit dH ₂ O	30 min
6. Waschen	dH ₂ O	2x 20 s
7. Entwickeln	15 g Na ₂ CO ₃ 197 µL Formaldehyd (23,5 %) 5 mL Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung. (0,2 g/L) ad 250 mL mit dH ₂ O	bis zum gewünschten Färbungsgrad (3 – 5 min)
8. Stoppen	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure	10 min
9. Waschen	50 % (v/v) Methanol	1 min

2.6.3 Western-Blot und Antikörpernachweis

Für den spezifischen Nachweis der cvP4H mit N-terminalem His₁₀-tag wurden die zu analysierenden Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.6.1, S. 39). Als Molmassenstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (PageRuler Prestained, Thermo Scientific) verwendet. Die Proteine wurden mittels Western-Blot (*semi dry*-Verfahren) vom ungefärbten SDS-PAGE Gel auf eine Nitrocellulosemembran (NCM) transferiert. Dafür wurden das PA Gel, die NCM und das WhatmanTM-Filterpapier separat für 15 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 20 % (v/v) MeOH, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) äquilibriert. Für den Western-Blot wurden ausgehend von der Anode der Apparatur drei Lagen WhatmanTM-Filterpapier, die NCM, das PA Gel und drei weitere Lagen WhatmanTM-Filterpapier luftblasenfrei übereinandergeschichtet. Der Proteintransfer erfolgte bei 250 mA und 20 V für 1 h. Alle folgenden Schritte wurden bei RT auf einem Wipptisch durchgeführt. Die NCM wurde einmal für 10 min mit 15 mL TBS-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl) gewaschen und für 16 h in 10 mL Blocklösung (3 % bovines Serumalbumin (BSA) (w/v) in TBS) inkubiert. Die NCM wurde danach zweimal 10 min mit je 15 mL TBS-T-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) TWEEN[®]-20) gewaschen. Der primären Anti-PolyHistidin-Antikörper (Sigma-Aldrich, produziert in Maus) wurde in 10 mL Blocklösung (Verdünnung 1:3.000) auf die NCM gegeben. Nach 1 h wurde die NCM für jeweils 10 min dreimal mit 15 mL TBS-T gewaschen. Der sekundäre Antikörper Anti-Maus IgG-Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich, produziert in Ziege) wurde in 10 mL Blocklösung (Verdünnung 1:10.000) auf die NCM gegeben. Nach Inkubation für 1 h folgten vier Waschschrte für je 10 min mit je 15 mL TBS-T und ein Waschschrte mit TBS. Für den kolorimetrischen Nachweis wurde die NCM abgedunkelt in 10 mL einer auf RT vorgewärmten BCIP/NBT-Lösung (SERVA, Deutschland) inkubiert. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde die NCM zweimal mit je 20 mL dH₂O gewaschen.

2.7 Extraktion von TE (IF 2) aus *E. coli* Biofeuchtmasse

Die Extraktion des TE (IF 2) aus *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE ist im Prozessschema unter Abb. 2-1 dargestellt. Je 100 g der bei -20 °C gelagerten Biomasse wurden zur Inaktivierung der Proteasen in einer Mikrowelle bei 1 000 Watt für 4x 15 sec auf ca. 70 °C erhitzt. Nach jedem Schritt wurde die Biomasse mit einem Glasstab verrührt, um ein gleichmäßiges Erwärmen zu gewährleisten. Die Temperatur wurde mittels Tempermessgerät Testo 108 (Testo SE & Co. KGaA, Deutschland) überprüft. Die erhitzte Biomasse wurde danach in 300 mL kalten Aufschlusspuffer (0,01 M Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,7) resuspendiert. Vor dem Zellaufschluss wurde die Zellsuspension mittels Ultraturrax Micra R-T D-1 (ART moderne Labortechnik, Deutschland) bei 10 000 rpm homogenisiert, um Zellaggregate aufzulösen. Der Hochdruckhomogenisator APV-2000 (APV systems, Dänemark) wurde mit dH₂O und Aufschlusspuffer gespült. Die Zellsuspension wurde für eine Passage ohne Druckaufbau und für drei Passagen bei einem Druck von 1 000 bar durch das System geleitet, ohne den Probenzylinder während des Druckaufbaus vollständig zu entleeren. Um der Wärmeentwicklung entgegen zu wirken, wurde der Probenbecher auf Eis gekühlt. Zum Beenden des Prozesses wurde der Druckaufbau gestoppt und das System zur Rückgewinnung der Probe mit 50 mL Aufschlusspuffer gespült.

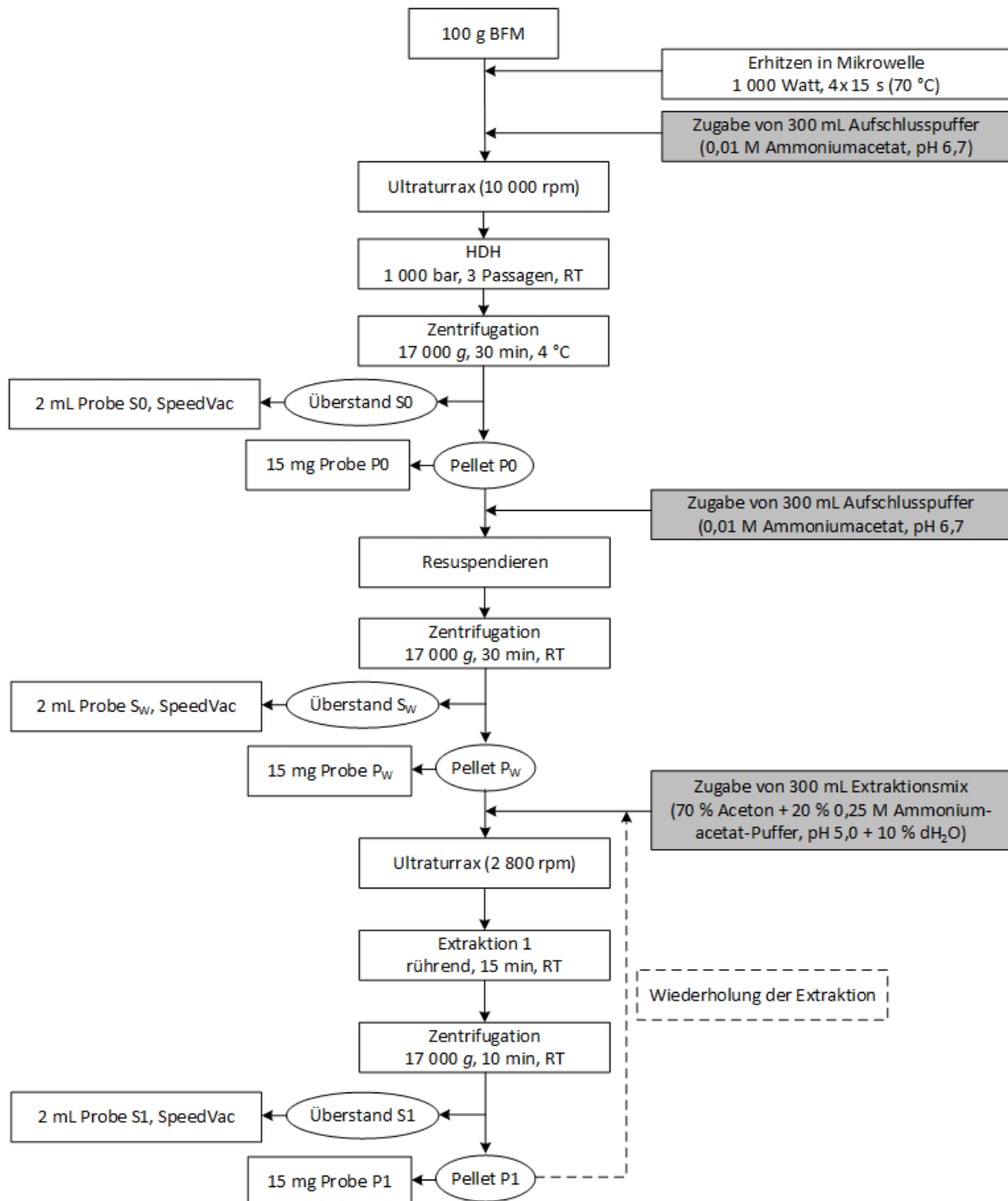


Abb. 2-1 Prozessschema der Extraktion von TE (IF 2) aus 100 g *E. coli* Biofeuchtmasse

Zur Reinigung und Dekontamination wurden durch das System unter mehrmaligem Druckaufbau dH_2O und 70 % Ethanol geleitet. Zur Trennung der löslichen und unlöslichen Fraktion wurde das Zellysate bei 17 000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand S0 wurde sofort danach dekantiert. Um Wirtszellproteine und Verunreinigungen zu entfernen, wurde die unlösliche Fraktion P0 in 300 mL kaltem Aufschlusspuffer (0,01 M Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,7) resuspendiert. Die Resuspension wurde bei 17 000 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert und die Fraktionen Pw und Sw sofort durch vorsichtiges Dekantieren getrennt. Zur Extraktion des TE wurden 300 mL Extraktions-Mix zu der unlöslichen Fraktion Pw gegeben und diese

mittels Ultraturrax (Minimalstufe: 2 800 rpm, 30 sec) resuspendiert. Danach wurde die Resuspension in einem mit Aluminiumfolie abgedeckten Becherglas für 15 min bei RT unter einem Abzug rührend inkubiert. Nach Zentrifugation bei 17 000 g und RT für 10 min wurden der acetonhaltige Überstand S1 und das Pellet P1 getrennt. Der Extraktionsschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die acetonhaltigen Überstände S1, S2 und S3 wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei RT gelagert.

Für die Analyse mittels SDS-PAGE wurden von allen Überständen je 2 mL Probe vollständig im SpeedVac Concentrator Setup (Thermo Scientific, USA) eingetrocknet. Von den Pellets wurden je ca. 15 mg entnommen. Alle Proben wurden bis zur SDS-PAGE bei -20 °C gelagert. Zur Probenvorbereitung wurden zu 15 mg der Pellets P0 – P3 je 200 µL harnstoffhaltigem SDS-Probenpuffer (Tab. 2-3, S. 31) zugegeben. Zu den getrockneten Rückständen der Überstände S0 und S_w wurde je 1 mL des Probenpuffers hinzugegeben. Die Rückstände der Überstände S1 – S3 in je 400 µL harnstoffhaltigem SDS-Probenpuffer resuspendiert.

2.8 Aufarbeitung von extrahiertem TE (IF 2)

Das Prozessschema zur Aufarbeitung des TEs aus den acetonhaltigen Überständen ist in Abb. 2-2 dargestellt. Die TE-haltigen Überstände S1, S2 und S3 wurden vereinigt und zunächst im Rotationsverdampfer HeidolPh2 (HeidolPh Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland) eingeeengt. Ziel war es, das Aceton von der wässrigen Phase zu trennen und gleichzeitig das Volumen für die weitere Aufarbeitung des TEs zu reduzieren. Als Wasserbadtemperatur wurden 25 °C gewählt, um eine Koazervation des TEs möglichst zu vermeiden. Der Druck wurde mittels Vakuumpumpe PC 511 (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Deutschland) von 280 mbar schrittweise bis auf 15 mbar abgesenkt. Das kondensierte Aceton wurde separat aufgefangen und dessen Volumen gemessen. Vor der Dialyse wurde die TE-Probe für 30 min bei 17 000 g und RT zentrifugiert, um unlösliche Anteile abzutrennen. Die TE-Lösung wurde danach zweimal für je 3 h gegen Reinstwasser bei RT dialysiert. Dazu wurde die Lösung in Dialyseschläuche aus regenerierter Cellulose (cut-off: 25 kDa, Spectra/POR, Spectrum laboratories Inc., Deutschland) gefüllt, diese mit Dialyseklammern verschlossen und im Dialysegefäß mit Glasstäben fixiert. Die Gesamtverdünnung lag bei 1:10⁴. Die Leitfähigkeit wurde testweise mit dem Qcond 2200 conductivity meter (VWR International GmbH, Deutschland) gemessen. Nach der Dialyse wurde die TE-Probe für 10 min bei 17 000 g und RT zentrifugiert, um unlösliche Anteile vor der Gefriertrocknung abzutrennen. Die TE-Lösung wurde nach der Dialyse für 16 h bei -20 °C eingefroren. Die Probengefäße wurden mit perforierter Aluminiumfolie abgedeckt und in die Kammer der Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT 2-E (Steris, USA) eingebracht. Durch eine Vakuumpumpe wurde ein Druck von 0,2 mbar eingestellt. Bei diesem Druck ging das Lösungsmittel H₂O direkt vom festen in den gasförmigen Aggregatzustand über (Sublimation) und kondensiert an der Kondensatorspindel. Nach vollständiger Trocknung der TE-Proben wurde die Masse des Lyophilisats bestimmt, dieses aliquotiert und bis zur Verwendung luftdicht bei -20 °C gelagert.

Zur Analyse des Präzipitats, welches beim Abtrennen des Acetons und während der Dialyse entstand, wurde dieses nach Zentrifugation mit Chloroform gewaschen und in ein 1,5 mL Eppendorf-Tube überführt. Nach Zentrifugation für 1 min bei 16 000 g wurden Pellet P5 und Überstand S5 bzw. P6 und S6 (Abb. 2-2) getrennt und vollständig im

Zentrifugationsverdampfer SpeedVac Concentrator Setup (Thermo Scientific, USA) getrocknet. Die Proben P5 bzw. P6 wird in 1 mL und Proben S5 bzw. S6 in 100 μ L harnstoffhaltigem SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95 °C inkubiert.

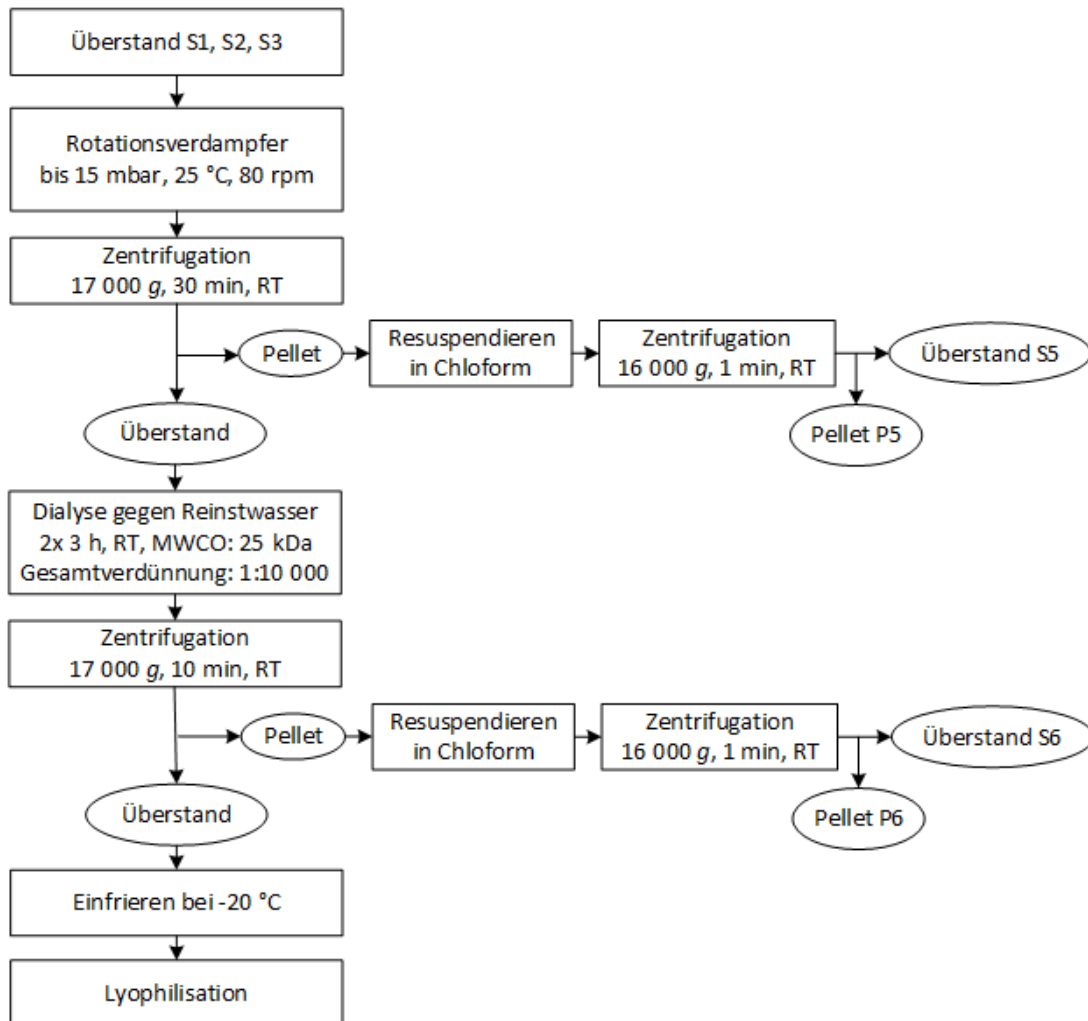


Abb. 2-2 Prozessschema Aufarbeitung TE (IF 2) aus acetonhaltigen Überständen

2.9 Löslichkeitstest mit gereinigtem TE (IF 2)

Für den Löslichkeitstest wurde das lyophilisierte Protein in dH_2O in einer Konzentration von 5 mg/mL bzw. in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) in einer Konzentration von 50 mg/mL gelöst. Das Lyophilisat wurde dazu mittels Analysenfeinwaage APX-100 (Sartorius, Deutschland) ($d = 0,1$ mg) abgewogen und mit dem Lösungsmittel versetzt. Mögliche unlösliche Aggregate wurden durch Zentrifugation bei 16 000 g für 10 min sedimentiert und die Bildung eines Bodenkörpers makroskopisch bewertet.

2.10 Untersuchung des Koazervationsverhaltens von TE (IF 2)

Zur Untersuchung des Koazervationsverhalten des TE (IF 2) wurde die Aggregationsoptik des Prometheus NT.48 verwendet (NanoTemper Technologies GmbH, Deutschland). In der Messkammer befindet sich ein horizontales, verspiegeltes Heizelement. In die sich darüber

befindliche Probenhalterung wurden die mit der Probe befüllten Kapillaren (Füllvolumen: 15 μL) aufgelegt. Das lyophilisierte TE wurde in einer Konzentration von 10 mg/mL bzw. 20 mg/mL in Bindepuffer (cLEX) ohne bzw. mit 1 M Harnstoff (Tab. 2-3, S. 31) gelöst und die angegebene NaCl-Konzentration durch Zugabe einer Stammlösung eingestellt. Beginnend von 20 °C wurde die Temperatur mit 0,5 °C/min bis zur angegebenen Temperatur erhöht. Simultan dazu bewegt sich in der Messkammer ein Anregungs-LED (Wellenlänge: ca. 400 – 500 nm, laut Hersteller) senkrecht über die Kapillaren. Die Lichtstreuung als Maß für Aggregation kann durch die Rückreflexion aus dem Verhältnis der Intensitäten aus einfallendem und reflektiertem Licht ermittelt werden (Gl. 2). Der Partikeldurchmesser muss dafür laut Hersteller > 25 nm betragen. Die Transitionstemperatur, ab der die Koazervation einsetzt, wurde über den Beginn (*onset*) der Lichtstreuungszunahme bestimmt.

$$\text{(Gl. 2)} \quad E = -\log(I/I_0)$$

mit	E	Extinktion
	I_0	Intensität des einfallenden Lichtes [W m^{-2}]
	I	Intensität des transmittierten Lichtes [W m^{-2}]

2.11 Reinigung von TE (IF 2) nach Extraktion

Die Reinigung des extrahierten TEs wurde mittels Kationenaustauschchromatographie (cLEX) an der ÄKTA Pure (GE, Deutschland) durchgeführt. Das lyophilisierte TE wurde in einer Konzentration von 2 mg/mL bzw. 0,2 mg/mL in Bindepuffer (cLEX) ohne bzw. mit 1 M Harnstoff (Tab. 2-3, S. 31) gelöst. Zur Abtrennung unlöslicher TE-Aggregate wurde die Lösung mittels Steritop™ Millipore Express®Plus (Merck KgaA, Deutschland) filtriert. Das Retentat wurde im gleichen Volumen in frischem Bindepuffer aufgenommen. Die TE-Lösung wurde mittels Superloop auf die SP Sepharose FastFlow-Säule (XK16/20, CV: 12 mL) mit einer Flussrate von 2 mL/min appliziert. Es folgte ein Waschschriff mit Bindepuffer (cLEX) (5 CV). Die Elution der Proteine erfolgte in einem linearen Gradienten bis zur angegebenen NaCl-Konzentration mit Elutionspuffer (cLEX) ohne bzw. mit 1 M Harnstoff (Tab. 2-3, S. 31). Die Säule wurde mit dH₂O (2 CV) und mit 50 mM HEPES (pH 8,0), 500 mM NaCl, 3 M Harnstoff (3 CV) in umgekehrter Flussrichtung gereinigt (*cleaning in place*, CIP). Die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm sowie die Leitfähigkeit wurden durch die verbauten Detektoren verfolgt. Alle Schritte wurden bei RT (ca. 20 °C) durchgeführt. Für die weitere Aufarbeitung wurden die Elutionsfraktionen mit dem Volllängen-TE vereinigt. Um den Großteil des Harnstoffes, des Natriumchlorids und der HEPES-Puffersubstanz zu entfernen, wurde die TE-Lösung dialysiert. Die Dialyse erfolgte wie unter 2.8, S. 43 beschrieben. Es wurde jedoch dreimal für 3 h gegen 10 mM Ammoniumacetat (pH 5,0) in einer Gesamtverdünnung von 1:10⁶ dialysiert. Die Gefriertrocknung wurde, wie unter 2.8, S. 43 beschrieben, durchgeführt und das Lyophilisat bei -20 °C gelagert.

2.12 Reinigung der His₁₀-cvP4H

2.12.1 Immobilisierung über Nickel-Affinitätschromatographie

Die Reinigung der His₁₀-cvP4H wurde mittels Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an der ÄKTA Pure (GE, Deutschland) durchgeführt. Als Trägermaterial diente

Nickel Sepharose Excel (GE, Deutschland). Die Bindekapazität des Chromatographiematerials liegt laut Hersteller bei 10 mg eines His₆-markierten Proteins je mL Säulenmaterial. Angaben über die Bindekapazität für ein His₁₀-markiertes Protein wurden durch den Hersteller nicht geliefert. Die Zusammensetzung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer orientiert sich an Literaturangaben [Eriksson et al., 1999].

Zum Aufschluss von Zellsuspension kleiner Volumina bis 8 mL wurde das Hochdruck-Zellaufschlusssystem OneShot (Constant Systems Ltd., UK) verwendet. Die Probenkammer wurde zunächst mit Binde/Waschpuffer (IMAC) (Tab. 2-3, S. 31) äquilibriert. Die bei -20 °C gelagerte Biofeuchtmasse wurde im gleichen Puffer im Verhältnis 1:7 resuspendiert und der Proteaseinhibitor PMSF zugegeben (Endkonzentration: 1 mM). Der Zellaufschluss von *E. coli* erfolgte nach Herstellerangaben durch einen Druckaufbau auf 20 kpsi (1 378 bar). Das Zelllysate wurde entnommen, das Gerät unter Druckaufbau mehrmals mit dH₂O gespült und mit 70 % Ethanol dekontaminiert. Die Proben wurden jederzeit auf Eis gehalten. Das Zelllysate nach Zellaufschluss wurde zunächst für 30 min bei 38 000 g und 4 °C zentrifugiert [Eriksson et al., 1999]. Die lösliche Fraktion wurde mittels Superloop auf die Ni-Sepharose Excel-Säule (XK16/20, CV: 8,6 mL) mit einer Flussrate von 3 mL/min appliziert. Es folgte ein Waschschriff mit Binde-/Waschpuffer (IMAC) (Tab. 2-3, S. 31) für 10 CV. Die Elution der His₁₀-cvP4H erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 – 100 % Elutionspuffer (IMAC) (Tab. 2-3, S. 31) für 5 CV. Alle Fraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Zur Analyse wurde das Pellet der unlöslichen Fraktion im gleichen Volumen der löslichen Fraktion resuspendiert. Zur Reinigung der Säule (CIP) wurde diese mit dH₂O (2 CV), 1 M NaCl (3 CV), dH₂O (2 CV), 1 M NaOH (3 CV), dH₂O (2 CV) und 20 % Ethanol (2 CV) in umgekehrter Flussrichtung gespült.

2.12.2 Konzentrieren der His₁₀-cvP4H und Pufferwechsel

Die Ultrafiltrationseinheit Amicon Ultra15 (cut-off: 10 kDa; Merck KGaA, Deutschland) wurde zum Konzentrieren (Faktor 14) und Umpuffern der gereinigten His₁₀-cvP4H verwendet und zunächst mit Lagerpuffer (Tab. 2-3, S. 31) äquilibriert. Die Elutionsfraktionen mit der His₁₀-cvP4H wurden vereinigt. Imidazol wurde durch den wiederholten Wechsel von Zentrifugation bei 3 220 g in 15 min Intervallen und Befüllen des Amicons mit frischem Lagerpuffer fast vollständig entfernt. Das Filtrat wurde verworfen. Eine Probe der konzentrierten His₁₀-cvP4H-Lösung wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt (2.12.3). Die übrige Enzymlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.12.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.12.3.1 Bradford-Assay [Bradford, 1976]

Zur Herstellung der Bradford-Farbreagenz wurden 100 mg Coomassie-Brillantblau G-250 in 50 mL 95 %-igem Ethanol gelöst und 100 mL 85 %-ige Phosphorsäure zugesetzt. Nach dem Auffüllen auf 600 mL mit dH₂O wurde die Lösung filtriert, 100 mL Glycerol zugegeben und auf 1 L mit dH₂O aufgefüllt. Das Reagenz konnte nach Lagerung für 24 h zur Bestimmung der Proteinkonzentration eingesetzt werden. Dafür wurden je 975 µL Bradford-Reagenz mit 25 µL Proteinlösung gemischt. Nach 2 min wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert am Ultrospec2100pro (Amersham, Schweden) ermittelt. Die Kalibrierung erfolgte mit BSA

(0,05 – 0,5 mg/mL) gelöst in Lagerpuffer (Tab. 2-3, S. 31). Die Vermessung sämtlicher Proben erfolgte jeweils in einer Dreifachbestimmung. Das Diagramm mit der Kalibriergeraden ist im Anhang in Abb. 8-11, S. 123 dargestellt. Anhand der Mittelwerte wurde die Geradengleichung $y = 1,6392 \cdot x$ ($R^2 = 0,997$) erstellt und zur Berechnung der Proteinkonzentration der viralen Prolyl-4-Hydroxylase verwendet.

2.12.3.2 Spektrophotometrie

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung aus gereinigtem TE (IF 2) erfolgte durch Absorptionsmessung der aromatischen Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm. Dazu wurde das Nanodrop One^C (Thermo Scientific, USA) mit Baseline-Korrektur bei 340 nm genutzt. Zur Herstellung der Lösung wurden 5 mg des Lyophilisats in dH₂O gelöst und auf 1 mg/mL verdünnt. Als Leerprobe diente dH₂O. Die Stoffmengenkonzentration c wurde über das Lambert-Beer-Gesetz berechnet (Gl. 3). Der molare Extinktionskoeffizient ε für TE (Isoform 2, ohne Signalpeptid) bei 280 nm beträgt $22\,350\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (s. Anhang, Abb. 8-3, S. 115). Die Schichtdicke d beträgt bei dem verwendeten Gerät 1 cm.

$$\text{(Gl. 3)} \quad E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

mit	E	Extinktion
	ε	molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$]
	c	Stoffmengenkonzentration [mol L^{-1}]
	d	Schichtdicke der durchstrahlten Flüssigkeit [cm]

2.13 *In vitro* Hydroxylierung

Alle Versuche zur *in vitro* Hydroxylierung wurden im Oxytherm+ (Version R „*respiration*“, Hansatech Instruments Ltd., UK) durchgeführt, um die Reaktionen indirekt anhand des O₂-Verbrauchs darstellen zu können. Die Messung basiert auf Redoxprozessen an einer Platin- und Silberelektrode, die eine Clarke-Elektrode bilden. Den Boden der temperier- und verschließbaren Reaktionskammer bildet die Kuppel mit der zentralen Platin-Elektrode der Elektroden-Disc (S1 Clarke-Typ). Diese wird durch eine O₂-durchlässige PTFE-Membran von der Reaktionskammer getrennt und über eine KCl-Brücke mit der Silber-Elektrode verbunden. Das Reaktionsvolumen kann laut Hersteller 0,2 mL – 2,5 mL betragen. Die kontinuierliche Durchmischung des Reaktionsansatzes wurde durch den eingebauten Magnetrührer (Rührgeschwindigkeit: Stufe 15) gewährleistet. Zur Steuerung des Gerätes und zur Datenaufzeichnung wurde die Software OxyTrace+ verwendet (Version 1.0.48, Hansatech Instruments Ltd., UK). Vor der Messung erfolgt die Kalibrierung des Gerätes nach Herstellerangaben mit O₂-gesättigtem und O₂-freiem dH₂O bei der entsprechenden Reaktionstemperatur. Zur Herstellung von O₂-freiem dH₂O wurde dH₂O in eine Serumflasche gefüllt und in das Wasser zunächst für 6 h N₂-Gas eingeleitet. Zur Reduktion des verbliebenen Sauerstoffes wurde das dH₂O mit 5 mM Natrium-dithionit versetzt. Die Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit v_0 erfolgte über den Geradenanstieg nach linearer Anpassung an die Progresskurven (Intervall $\Delta t = 1 - 2$ min). Dafür wurde das Programm Origin[®] 2019 genutzt. Die O₂-Konzentrationen zum Startzeitpunkt der Reaktion wurden für die Darstellung der Progresskurven jeweils auf 100 % normiert. Die lineare Anpassung an die Progresskurve ist im jeweiligen Diagramm im Inset-Zoom

dargestellt. Ausgehend von der initialen Reaktionsgeschwindigkeit ($\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) wurde die spezifische Enzymaktivität der His₁₀-cvP4H in Units/mg bestimmt (1 Unit = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$). Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Standardabweichung der Grundgesamtheit wurde berechnet (Gl. 4).

$$\text{(Gl. 4) Standardabweichung } \sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

mit	x_i	Einzelwerte
	\bar{x}	arithmetisches Mittel der Einzelwerte
	N	Grundgesamtheit

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und Zielkonzentrationen der Komponenten sind in Tab. 2-14 aufgeführt. Die Konzentrationen der Co-Substrate, des Peptidsubstrates (PAPK)₅ und der His₁₀-cvP4H orientierten sich an Longbotham und Kollegen, die nach 16 h Reaktionszeit eine vollständige Hydroxylierung von 100 μM (PAPK)₅ massenspektrometrisch nachweisen konnten [Longbotham et al., 2015]. Aufgrund der Sauerstoff-Limitierung im Reaktionsansatz wurde die (PAPK)₅-Konzentration auf 12,5 μM reduziert. Die Synthese des Peptids (PAPK)₅ erfolgte durch Dr. M. Malešević (AG Pietzsch). Statt 15 mM 2-OG wurden, wie bei Eriksson und Kollegen, 0,5 mM 2-OG eingesetzt und die Reaktionszeit auf maximal 30 min verkürzt [Eriksson et al., 1999].

Da das Oxytherm+ sehr sensitiv ist und die Zugabe größerer Volumina zu einer erheblichen Messschwankung der O₂-Konzentration führte, wurden die Stammlösungen möglichst hoch konzentriert, sodass nur geringe Volumina pipettiert werden mussten. Das Reaktionsvolumen lag bei 1 mL. Als Reaktionstemperatur wurden, wie in der Literatur, 37 °C gewählt [Eriksson et al., 1999; Longbotham et al., 2015]. Vor der Messung wurde O₂-gesättigtes dH₂O im Thermostat plus (Eppendorf AG, Deutschland) für 10 min auf die Reaktionstemperatur vortemperiert. Die Stammlösungen der Co-Substrate und der Peptidsubstrate wurden frisch hergestellt und auf Eis gelagert. Das Ammoniumeisen(II)-sulfat wurde zum Schutz vor Oxidation in 200 μM HCl gelöst.

Tab. 2-14 Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur *in vitro* Hydroxylierung. Als Peptidsubstrat wurde entweder das synthetische Peptid (PAPK)₅ oder das chromatographisch gereinigte Tropoelastin (TE) (cIEX) eingesetzt. Die Co-Substrate und Peptidsubstrate wurden, wenn nicht anders angegeben, in kaltem dH₂O gelöst. Das (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ x 6 H₂O wurde in 200 μM HCl gelöst.

Konzentration	Komponente
50 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
0,16 mM	L-Ascorbinsäure
0,5 mM	2-Oxoglutarinsäure (Dinatriumsalz)
1 μM	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O
12,5 μM	(PAPK) ₅
83 μM (5,0 mg/mL)	TE (IF 2) nach cIEX
4 μM (0,1 mg/mL)	His ₁₀ -cvP4H
ad 1 mL	dH ₂ O (O ₂ -gesättigt)

Zu Beginn der Messung wurde zunächst das entsprechende Volumen an O₂-gesättigtem dH₂O und 100 µL 0,5 M Tris/HCl (pH 7,5) Puffer in der Reaktionskammer vorgelegt. Die Lösung wurde für ca. 10 min rührend vortemperiert, bis sich das Messsignal der O₂-Konzentration stabilisiert hatte. Zum Reaktionsgemisch wurden nacheinander 10 µL einer 16 mM L-Ascorbinsäurelösung, 10 µL einer 0,1 mM Ammoniumeisen(II)-sulfatlösung, 22 µL der His₁₀-cvP4H-Enzymlösung und das Peptidsubstrat gegeben. Von dem synthetischen Peptid (PAPK)₅ wurden 2,5 µL einer Stammlösung (10 mg/mL) bzw. von dem gereinigten TE (IF 2) wurden 100 µL einer Stammlösung (50 mg/mL) zugegeben. Bei der Reaktion ohne Peptidsubstrat wurde das Volumen entsprechend mit dH₂O ergänzt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 10 µL einer 50 mM 2-Oxoglutaratlösung. Die Reaktionskammer wurde danach luftdicht durch einen Kolben mit Dichtungsmanschetten verschlossen. Die Reaktion wurde nach der angegebenen Reaktionszeit durch Zugabe von eiskalter 0,25 % (v/v) Essigsäure (pH 3) im Volumenverhältnis 1:1 gestoppt und die Probe bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Für die Harnstoffbehandlung wurde das chromatographisch gereinigte TE in einer Konzentration von 100 mg/mL in 50 mM HEPES (pH 8,0) + 1 M Harnstoff gelöst. Direkt vor der Reaktion wurde die Lösung mit dH₂O auf eine Konzentration von 50 mg/mL verdünnt und zum Reaktionsansatz gegeben. Die theoretische Endkonzentration während der Reaktion lag bei 50 mM Harnstoff. Für die Kontrollreaktion mit dem synthetischen Peptid (PAPK)₅ wurde die gleiche Harnstoffkonzentration mit 50 mM HEPES (pH 8,0) + 1 M Harnstoff eingestellt.

2.14 Auftragsanalytik

2.14.1 Flüssigchromatographie

Für die Bestimmung der Proteinreinheit des isolierten Tropoelastins (TE) wurde ein binärer Flüssigchromatograph (LC) 1260 Infinity (Agilent Technologies Inc., USA) verwendet. Verbaut waren eine binäre Pumpe (G1312B), ein Probennehmer (G1329B), ein Säulenbauteil (G1316A), ein UV-Detektor (VWD, G1314B; $\lambda = 220$ nm) und ein Quadropol-LC/MS 6120. Als Säule wurde Vydac Proteine & peptide C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, 300 Å (MZ Analysetechnik GmbH, Mainz, Deutschland) bei 30 °C verwendet. Die Analyse wurde von Dr. M. Malešević (AG Pietzsch) durchgeführt. Die zu analysierende TE-Probe wurde in 0,25 % (v/v) Essigsäure (pH 3,0) in einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst und 20 µL Probe appliziert. Als Lösungsmittel A wurde 0,1 % TFA/H₂O bzw. als Lösungsmittel B 0,1 % TFA/ACN verwendet. Die Flussrate lag bei 1 mL/min. Für die Auftrennung erfolgte ein isokratischer Lauf mit 5 % Lösungsmittel B für 3 min, gefolgt von einem linearen Gradienten auf 100 % Lösungsmittel B in 22 min sowie in 0,1 min auf 5 % Lösungsmittel B und 3 min mit 5 % Lösungsmittel B. Die Datenaufzeichnung sowie die Bestimmung der Proteinreinheit erfolgten mit der Software Open LAB CDS (Rev C.01.07, Agilent Technologies Inc., USA). Zur Identifikation der Nebenprodukte im TE nach Acetonextraktion wurde die Fraktion von 14,1 – 14,5 min Retentionszeit manuell aufgefangen und massenspektrometrisch untersucht.

2.14.2 Massenspektrometrische Analysen

2.14.2.1 Proteinidentifikation nach Überproduktion im Schüttelkolben

Zur Identifikation des überproduzierten Proteins wurde eine Proteinbande aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten. Die anschließende Probenvorbereitung und Analyse wurde von Frau Dr. Schierhorn (Serviceeinheit Massenspektrometrie, Nat.-Fak. I, Institut für Biochemie/Biotechnologie, Kurt-Mothes-Str. 3, 06120 Halle) durchgeführt. Die Probe wurde zunächst in 100 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer mit 10 mM DTT für 45 min bei 50 °C inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurde 55 mM Iodacetamid zugegeben und die Probe für weitere 45 min lichtgeschützt behandelt. Die Probe wurde dreimalig mit ddH₂O, zweimalig mit 100 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer und einmalig mit 100 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer in 50 % Acetonitril gewaschen. Nach Trocknung der Proben erfolgte der Verdau durch Trypsin (Promega, Madison, USA) für 24 h bei 37 °C in 50 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer (pH 8,0).

Für die Nano-HPLC wurden die aus dem Gel extrahierten Peptide über das nanoACQUITY UPLC System (Waters Co., Eschborn, Deutschland) injiziert. Als Laufmittel dienten 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ddH₂O (A) bzw. 0,1 % (v/v) Ameisensäure in Acetonitril (B). Die Auftrennung erfolgte im Gradienten von 3 – 33 % Laufmittel B über 15 min. Die Entsalzung erfolgte auf der Vorsäule Symmetry C18 180 µM x 20 mm (Water Co., Milford, USA). Als Hauptsäule diente RP 1,7 µM BEH 130 C18 100 µM x 100 mm, C18, 2 µM, 100 Å (Waters Co. Milford, USA). Die Analyse mittels ESI-QTOF-MS/MS wurde am SYNAPT® G2 MS (Waters Co., Milford, USA) durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software BiopharmaLynx (Version 1.3.2, Waters Co., Milford, USA). Für den Datenbankabgleich wurde der humane Teil der Swiss-Prot-Datenbank genutzt.

2.14.2.2 TE (IF 2) nach Hydroxylierung und Analyse der Nebenprodukte

Die Tropoelastinprobe nach *in vitro* Hydroxylierung mit der His₁₀-cvP4H sowie die von TE nach der Acetonextraktion abgetrennten Nebenprodukte wurden von Tobias Hedtke (Fraunhofer IMWS, Walter-Hülse-Straße 1, 06120 Halle) analysiert. Für den Verdau wurden die Proben entweder mit der Pierce™ Trypsin Protease (MS Grade, Thermo Scientific, USA) im Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:100 (w/w) versetzt und bei 37 °C und 350 rpm für 24 h inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 0,5 % Trifluoressigsäure (TFA) abgestoppt. Die verdauten TE-Proben wurden mittels C18-ZipTips (Merck KGaA, Deutschland) nach Herstellerangaben entsalzt. Die Analyse erfolgte mittels Massenspektrometrie-gekoppelter Umkehrphasenchromatographie (HPLC). Die HPLC erfolgte am EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland). Als Laufmittel dienten 0,1 % (v/v) Ameisensäure in ddH₂O (A) bzw. 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B). Als Vorsäule diente eine Acclaim PepMap 100, 75 µM x 150 mm, C18, 3 µM, 100 Å (Thermo Fisher Scientific) und als Trennsäule eine EASY-Spray column, 75 µM x 500 mm, C18, 2 µM, 100 Å (Thermo Fisher Scientific). Die Auftrennung erfolgte im Gradienten von 5 – 40 % Laufmittel B über 60 min mit einer Flussrate von 300 nL/min. Die massenspektrometrische Analyse wurde am Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) in der Arbeitsgruppe von Prof. Andrea Sinz von Dr. Christian Ihling (Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Die Ionisierung erfolgte mittels Nano-Elektronensprayionisation (1,8 – 2,5 V). Gemessen wurde im „Full-Scan“-Modus von *m/z* 400 bis *m/z* 2000. Die zehn abundantesten Vorläuferionen (Top 10-

Modus) wurden für die Fragmentierung über kollisionsinduzierte Dissoziation (*collision induced dissociation*, CID) ausgewählt, bei der nur b- und y-Fragmentionen entstehen. Die Kollisionsenergie (*collision energy*, NCE) lag bei 28 % normalisierter Kollisionsenergie.

Für die Peptidsequenzierung wurde die Software PEAKS Studio X (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, ON, Kanada) genutzt. Der Datenbankabgleich erfolgte mit dem humanen Teil der Swiss-Prot-Datenbank. Manuell wurden die Sequenzen von TE (IF 2) ohne Signalpeptid zugefügt. Die Fehlertoleranz für die Selektion der Vorläuferionen wurde auf 10 ppm festgesetzt. Als Protease wurden Trypsin (TR) gewählt. Es wurde die Option „unspezifisch“ im *digest mode* gewählt, sodass auch nicht-tryptische Schnittstellen berücksichtigt wurden. Als maximale Anzahl an ungespaltenen Positionen C-terminal von Lysin (K) und Arginin (R) wurde 3 festgelegt. Als variable, posttranslationale Modifikationen wurden Hydroxyprolin (+15,99 Da) und die Deamidierung von Asparagin/Glutamin (+0,98) ausgewählt. Für die Auswertung wurde die FDR (*false discovery rate*) basierend auf der Anzahl der *peptide spectrum matches* (PSM) auf 1 % festgesetzt. Der $-10\lg P$ -Wert gibt die „scoring significance“ eines PSMs an und wurde auf ≥ 20 festgesetzt. Nach dem Datenbankabgleich erfolgte die manuelle Überprüfung der unprozessierten Fragmentspektren der nachgewiesenen Peptide. In der vorliegenden Arbeit wurden nur jene Hydroxyprolyl-Reste berücksichtigt, die durch b- und/oder y-Fragmentionen abgedeckt waren und deren Massendifferenz direkt aus zwei benachbarten Ionen errechnet werden konnte. Um die Abundanz der Hydroxylierung darzustellen, wurden für jeden identifizierten HyP-Rest die Anzahl der belastbaren Spektren sowie die daraus folgende Anzahl identifizierter HyP-Peptide gezählt. Außerdem wurde der prozentuale Anteil der HyP-Peptide in Bezug auf die Gesamtzahl der Peptide, die für den jeweiligen Prolyl-Rest nachgewiesen wurden, berechnet.

Zur Identifikation der abgetrennten Nebenprodukte des TEs nach Acetonextraktion erfolgte ein Abgleich der resultierenden Peptide gegen das *E. coli*-Proteom.

3 Ergebnisse

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Protokolls zur biotechnologischen Produktion von rekombinantem, humanem TE (TE, Isoform 2) sowie dessen Aufarbeitung und Reinigung. Das produzierte TE sollte anschließend *in vitro* an Prolyl-Resten hydroxyliert werden. Dazu sollte in dieser Arbeit eine virale Prolyl-4-Hydroxylase getestet werden. Nach rekombinanter Produktion und Reinigung des Enzyms sollte die Hydroxylierung *in vitro* durchgeführt werden und die Reaktion kontinuierlich verfolgt werden. Mittels Massenspektrometrie sollte eine qualitative Aussage zur *in vitro* Hydroxylierung des TEs getroffen und das Hydroxylierungsmuster analysiert werden.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde TE (IF 2) in *E. coli* im Schüttelkolben- und im Bioreaktormaßstab produziert. Es wurde ein reproduzierbares Protokoll zur Extraktion und Aufarbeitung von TE im Gramm-Maßstab etabliert sowie eine Methode zur weiteren Reinigung des TEs entwickelt.

Im zweiten Teil wurde die virale Prolyl-4-Hydroxylase aus *Paramecium bursaria* Chlorella Virus-1 in *E. coli* im Schüttelkolbenmaßstab überproduziert und chromatographisch gereinigt. Die O₂-Konzentration im Reaktionsansatz während der *in vitro* Hydroxylierung wurde gemessen. Die spezifische Aktivität des Enzyms ohne Peptidsubstrat, mit dem synthetischen (PAPK)₅-Peptid und mit TE (IF 2) wurde bestimmt. Der Erfolg der *in vitro* Hydroxylierung von TE wurde massenspektrometrisch belegt. In der vorliegenden Arbeit gelang es damit erstmals rekombinantes, humanes TE *in vitro* an Prolyl-Resten zu hydroxylieren.

3.1 Biotechnologische Produktion von humanem TE (IF 2)

3.1.1 Etablierung eines stabilen Expressionssystems

3.1.1.1 Subklonierung aus pET-3d_TE in pET-28a(+)_cer

Um Tropoelastin Isoform 2 (TE, IF 2) im Gramm-Maßstab produzieren zu können, ist ein stabiles Expressionssystem unerlässlich. Mit einem vorhandenen *E. coli*-Stamm BL21-Gold(DE3) + pET-3d_TE (Amp^R) wurde in Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit ein drastischer Plasmidverlust nach Induktion der Proteinproduktion festgestellt. Die DNA-Sequenz des Plasmides für TE (IF 2) wurde vor Beginn der vorliegenden Arbeit für die Codon-Nutzung in *E. coli* angepasst und durch eine Gensynthesefirma synthetisiert (2.4.4, S. 33). Die transformierten Zellen wurden in Komplexmedium bei 37 °C kultiviert (2.5.2.1, S. 36). Proben für den Plasmidstabilitätstest (2.5.4, S. 39) wurden zum Zeitpunkt der Induktion und 2 h nach Induktion entnommen. Die segregative Plasmidstabilität lag zum Zeitpunkt der Induktion bei 100 % und 2 h nach Induktion bei 0 %. Eine mögliche Ursache dafür könnte die Multimerisierung der Plasmide während der Replikation sein, sodass nach Zellteilung eine ungleiche Plasmidanzahl in den Tochterzellen vorhanden war. Eine weitere Ursache kann der Transport der Plasmid-DNA aus der Zelle sein. Das *bla*-Gen auf dem Vektor pET-3d codiert für eine β -Lactamase (Swiss-Prot Datenbankeintrag: P62593-1; EC 3.5.2.6). Sobald das Ampicillin durch die von den Zellen in das Periplasma sekretierte β -Lactamase abgebaut wurde, kann der Selektionsdruck nicht aufrechterhalten werden [Korpimäki et al., 2003; Studier, 2018].

Zur Erhöhung der segregativen Plasmidstabilität erfolgte eine Subklonierung der optimierten Gensequenz für TE (IF 2) aus dem Plasmid pET-3d_TE in den Vektor pET-28a(+) inkl. der *cer*-Sequenz aus dem Plasmid ColE1 [Summers und Sherratt, 1988] (2.4.4, S. 33). Dieser Vektor wird fortan als pBS35 bezeichnet. Die auf dem Vektor pBS35 codierte *cer*-Sequenz (s. Anhang, Abb. 8-1, S. 113) verhindert durch Rekrutierung der XerCD-Rekombinase eine Multimerisierung der Plasmide während der Replikation (*dimer catastrophe*) [Summers und Sherratt, 1988]. Dadurch wird bei der Zellteilung eine gleichmäßige Verteilung der Plasmide auf die Tochterzellen gewährleistet. Weiterhin soll es möglich sein, durch Nutzung der *cer*-Sequenz auf die Zugabe von Antibiotika in das Kultivierungsmedium zu verzichten [Peubez et al., 2010]. Der Vektor pBS35 weist zusätzlich das Kanamycin-Resistenzgen *aphI* auf. Die Resistenz beruht auf der Produktion der Aminoglykosid-(3´)-Phosphotransferase APH(3´) I (EC 2.7.1.95), welche die Phosphorylierung von intrazellulärem Kanamycin A an der 3´-Hydroxygruppe katalysiert [Wright und Thompson, 1999]. Durch die verringerte Bindungsaffinität kann das Kanamycin nicht mehr an der ribosomalen 30 S-Untereinheit binden und die Translation inhibieren. Da Kanamycin im Gegensatz zu Ampicillin im Kulturmedium nicht abgebaut wird, kann der Selektionsdruck dauerhaft aufrechterhalten werden.

Die Plasmid-DNA wurde aus Zellen des *E. coli*-Stammes BL21-Gold(DE3) + pBS35 isoliert (2.4.3, S. 33). Die Subklonierung der Gensequenz für TE (IF 2) erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* (2.4.4, S. 33). Das Screening auf Transformanten mit dem Plasmid pBS35_TE erfolgte mittels Kolonie-PCR (2.4.4.1, S. 33). Bei einem der Transformanten konnte ein PCR-Produkt von ca. 2300 bp nachgewiesen werden, welches der Gensequenz des TEs (IF 2, 2100 bp) inklusive der T7-Promoter und T7-Terminatorregion entspricht. Die Sequenzierung der inserierten Gensequenz mittels T7 Promoter Primer lieferte eine 100 %ige Übereinstimmung über ca. 1200 bp. Die Subklonierung der Gensequenz für TE (IF 2) in den Vektor pBS35 war somit erfolgreich.

3.1.1.2 Mutagenese-PCR zur Insertion weiterer Stopcodone

Der Vektor pBS35 kodiert für einen C-terminalen His₆-tag. Die Subklonierung der Gensequenz für TE (IF 2) über die *BamHI*-Schnittstelle erzeugt jedoch eine Leserasterverschiebung, so dass C-terminal die Aminosäuresequenz GSEFELRRQACGRTRAPPPPLRSGC kodiert wird. In Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit wurde diese Aminosäuresequenz bei rekombinant produziertem TE massenspektrometrisch nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein einzelnes Stopcodon während der Translation überlesen wird liegt bei 10⁻⁵ [Baggett et al., 2017]. Um ein „Überlesen“ (*read-through*) durch die Ribosomen zu verhindern, wurden zusätzlich zum Stopcodon „TAA“ der Gensequenz zwei weitere Stopcodone „TGA“ mittels Mutagenese-PCR inseriert (2.4.6, S. 34). Das Amplifikat wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.4.5, S. 34) nachgewiesen und die korrekte Insertion in den Vektor pET-28a(+)_{cer} (alias pBS35) über Sequenzierung der aus den Transformanten gewonnenen Plasmid-DNA überprüft. Das Sequenzierergebnis verifizierte die erfolgreiche Insertion der beiden zusätzlichen Stopcodone auf DNA-Ebene. Die Plasmidkarte des finalen Konstruktes pBS35_TE (inkl. TGA TGA) ist dem Anhang zu entnehmen (Abb. 8-2, S. 114).

3.1.2 Überproduktion von TE (IF 2) im Schüttelkolbenmaßstab

3.1.2.1 Induktionstest

Nach erfolgreicher Subklonierung der DNA-Sequenz für Tropoelastin (TE, Isoform 2) in den Vektor pBS35 sollte die Überproduktion des Proteins im Schüttelkolbenmaßstab getestet werden. Dazu wurde der Überproduktionsstamm *E. coli* BL21-Gold(DE3) mit dem Plasmid pBS35_TE transformiert (2.4.7, S. 35). Als Kultivierungsmedium wurde zu jeder Zeit M9 Minimalmedium gewählt, um eine frühzeitige Induktion der Proteinproduktion durch Induktor-ähnliche Substanzen im Komplexmedium zu verhindern. Die Medienzusammensetzung ist unter 2.5.1, S. 35 aufgeführt. Die Vor- und Hauptkultur wurden, wie unter 2.5.2.1, S. 36 beschrieben, angefertigt. Die Hauptkultur wurde zum Zeitpunkt der Induktion geteilt und die Überproduktion des TEs bei einer Kultur mit 1 mM IPTG induziert. Zum Induktionszeitpunkt bzw. alle 30 min nach Induktion wurden 1/OD-Proben entnommen und diese mittels SDS-PAGE (2.6.1, S. 39) analysiert. Die Wachstumskurven der induzierten und nicht induzierten Kulturen sowie das Coomassie-gefärbte Gel der SDS-PAGE sind in Abb. 3-1 dargestellt.

Die Zellen der induzierten Kultur zeigten nach Induktion im Vergleich zu jenen der nicht induzierten Kultur ein verlangsamtes Wachstum, was auf eine erhöhte metabolische Last durch die Proteinüberproduktion schließen lässt (Abb. 3-1, A). In Übereinstimmung damit konnte ab 0,5 h nach Induktion eine Proteinbande bei ca. 60 kDa nachgewiesen werden, deren Intensität während der Induktionsphase zunimmt (Abb. 3-1, B; Bahn 2 – 6). Dies entspricht der theoretischen molekularen Masse des TEs (IF 2) mit 60 kDa (s. Anhang, Abb. 8-3, S. 115).

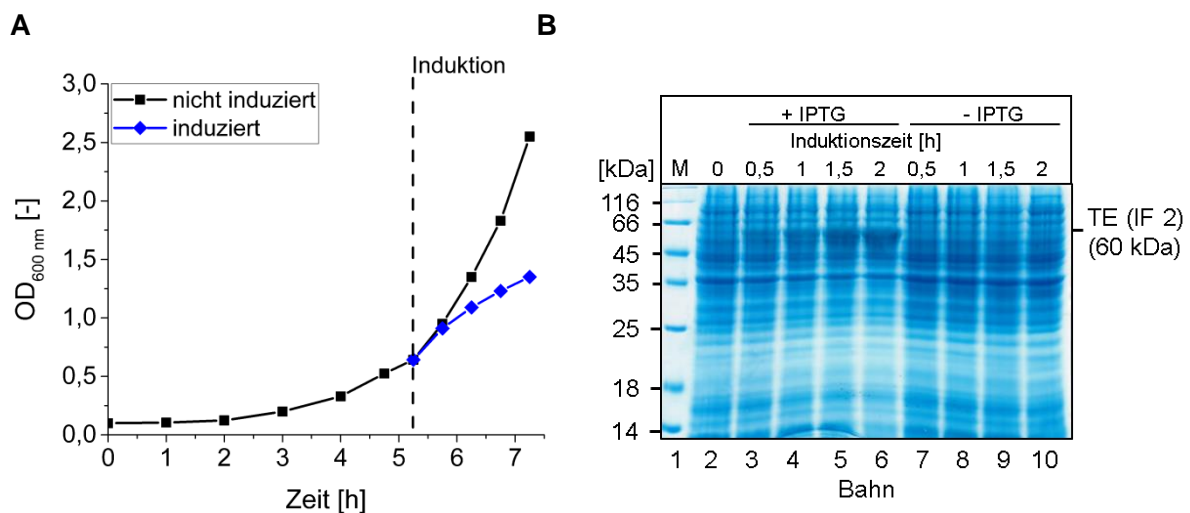


Abb. 3-1 (A) Wachstumskurve *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE, (B) zeitlicher Verlauf der Überproduktion von TE (IF 2). Die Kultivierung erfolgte in 100 mL M9 Medium + 50 µg/mL Kanamycin bei 37 °C und 140 rpm ausgehend von einer OD₆₀₀ von 0,1. Angegeben sind die Mittelwerte der optischen Dichte nach Doppelbestimmung gegen einen Blank (dH₂O). Bei einer OD₆₀₀ von 0,7 wurde die Kultur zu je 50 mL geteilt. Bei einer Kultur wurde die Proteinüberproduktion mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert (blau) und beide Kulturen unter den gleichen Bedingungen für 2 h inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 1/OD-Proben angelegt, die Zellen in 50 µL Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Bahn 1: Marker (5 µL); Bahn 2: 0 h; Bahn 3 – 6: 0,5 h bis 2 h mit IPTG; Bahn 7 – 10: 0,5 h bis 2 h ohne IPTG; je 10 µL Probe.

Die Überproduktion von TE (IF 2) in *E. coli* BL21-Gold(DE3) im Schüttelkolbenmaßstab war demnach vermutlich erfolgreich. Da der Unterschied der Bandenintensität zwischen 1,5 h und 2 h nach Induktion in der SDS-PAGE minimal erschien, wurde auf eine Verlängerung der Induktionsphase über 2 h hinaus verzichtet. Unter den gewählten Bedingungen wäre vermutlich nur mit einer geringfügig höheren Ausbeute an TE (IF 2) zu rechnen gewesen. Die Zellen der nicht induzierten Kultur zeigten nach Zugabe von IPTG erwartungsgemäß kein stagnierendes Wachstum und es konnte im Coomassie-gefärbten Gel keine Proteinüberproduktion nachgewiesen werden (Abb. 3-1, B, Bahn 7 – 10). Demnach kann eine frühzeitige Induktion der Proteinüberproduktion ausgeschlossen werden.

3.1.2.2 Proteinidentifikation

Zur eindeutigen Identifikation des in 3.1.2.1 überproduzierten Proteins wurde die Bande der 2 h-Probe bei 60 kDa (Abb. 3-1, B; Bahn 6) mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert (2.14.2, S. 50). Das Alignment der nachgewiesenen Peptide (Tab. 8-1, S. 118) gegen die AS-Sequenz des TEs (IF 2, ohne Signalpeptid) ist in Abb. 3-2 dargestellt. Dabei wurde eine Übereinstimmung mit 92 % der humanen Tropoelastin-Sequenz (Isoform 2, ohne Signalpeptid) nachgewiesen (gelb markiert). Das in 3.1.2.1 überproduzierte Protein mit einer molekularen Masse von ca. 60 kDa wurde somit eindeutig als TE (IF 2) identifiziert. Weiterhin wurde bestätigt, dass das N-terminale N-Formylmethionin abgespalten wurde, sodass der N-Terminus dem des nativen TE (IF 2) entspricht. Peptide der potentiellen Aminosäuresequenz GSEFELRRQACGRTRAPPPPLRSGC wurden nicht nachgewiesen. Die Sequenz „UAA UGA UGA“ auf mRNA-Ebene reicht demnach aus, die Translation vor Ablesen der Codone der 26 Aminosäuren zu terminieren. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Aminosäuresequenz des produzierten TEs der Zielsequenz entspricht. Die Sequenz wurde außerdem nachfolgend mittels LC-MS/MS bestätigt (3.6.4, S. 83).

```
Met GGVPGAIPGGVPGGVFYPGAGLGLGALGGALGPGGKPLKVPVPGGLA
GAGLGAGLGAFFAVTFPGALVPGGVADAAAAYKAAKAGAGLGGVPGV
GGLGVSAGAVVPQPGAGVKPGKVPVGLPGVYPGGVLPGARFPVGVV
LPGVPTGAGVKPKAPGVGGAFAGIPGVGPFGGPQPGVPLGYPIKAPKL
PGGYGLPYTTGKLPGYGGVAGAAAGKAGYPTGTGVGPQAAAAAAA
KAAAKFGAGAAGVLPVGGAGVPGVPGAIPGIGGIAGVGTAAAAAAA
AAAAKAAKYGAAAGLVPGGPGFGPGVVGVPGAGVPGVPGAGIPVV
PGAGIPGAAVPGVVSPEAAKAAKAAKYGARPGVGVGGIPTYGVGA
GGFPGFVGVGIPGVAGVPSVGGVPGVGGVPGVGSPEAQAAAAAK
AAKYGVGTPAAAAKAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPG
VGLAPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGIGPGGVAAAAKSAAKVAAKAQLR
AAAGLGAGIPGLGVGVVPLGLVGAGVPLGLVGAGVPGFPAVPGALA
AAKAAKYGAAVPGVLGGLGALGGVGIPGGVVGAGPAAAAAAKAAK
AAQFGLVGAAGLGLGLGVVPLGVVGGVGGVGGVGGVGGVGGVGGV
GGVLLGGAGQFPLGVVAARPGFGLSPIFPGGACLGKACGRKRK Stop Stop
Stop GSEFELRRQACGRTRAPPPPLRSGC
```

Abb. 3-2 Aminosäuresequenz von TE (IF 2) ohne Signalpeptid mit möglichem C-terminalen tag nach Insertion von zwei zusätzlichen Stopcodonen durch Mutagenese-PCR. Die Übereinstimmung der mit ESI-MS nachgewiesenen Peptide mit der Sequenz ist gelb markiert; 92 % Sequenzabdeckung.

3.1.2.3 Untersuchung der segregativen Plasmidstabilität abhängig von Kanamycin-Zugabe zum Kulturmedium

Das Antibiotikum Kanamycin A zählt zu den Aminoglykosiden und passiert die bakterielle Zellwand u.a. durch passive Diffusion. Durch die Anlagerung an die 30 S-Untereinheit membranassoziierter Ribosomen wird die Proteinbiosynthese der Bakterien inhibiert. Kanamycin kann durch Sterilisation bei 121 °C nicht vollständig inaktiviert werden (Zersetzungstemperatur: > 250 °C). Kanamycin-haltige Überstände müssen deshalb gesondert entsorgt werden. In Vorbereitung auf die Produktion von TE im Bioreaktormaßstab sollte deshalb zunächst untersucht werden, ob auf eine Zugabe von Kanamycin zur Hauptkultur verzichtet werden kann. Damit könnte ein großes Volumen an Kanamycin-haltigem Medium vermieden werden. Fraglich war, ob der fehlende Selektionsdruck zum Plasmidverlust der Zellen führt oder ob dieser durch die *cer*-Sequenz [Peubez et al., 2010] des Vektors pBS35 kompensiert werden kann.

Der Induktionstest (3.1.2.1, S. 54) wurde unter den beschriebenen Bedingungen wiederholt. Es wurden jedoch zwei separate Hauptkulturen aus der gleichen Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,1 angeimpft. Einer der beiden Kulturen wurde kein Kanamycin zugesetzt. Um den Eintrag von Kanamycin durch das Inokulieren zu minimieren, wurden die Zellen der Vorkultur geerntet, in frischem M9-Medium resuspendiert und zur Hauptkultur gegeben (2.5.2.1, S. 36). Erneut wurden das Wachstumsverhalten sowie die Änderung der Proteinbandenmuster während der Kultivierung analysiert (Abb. 3-3). Zusätzlich wurden Proben zum Induktionszeitpunkt bzw. 2 h nach Induktion entnommen und im Plasmidstabilitätstest (2.5.4, S. 39) eingesetzt.

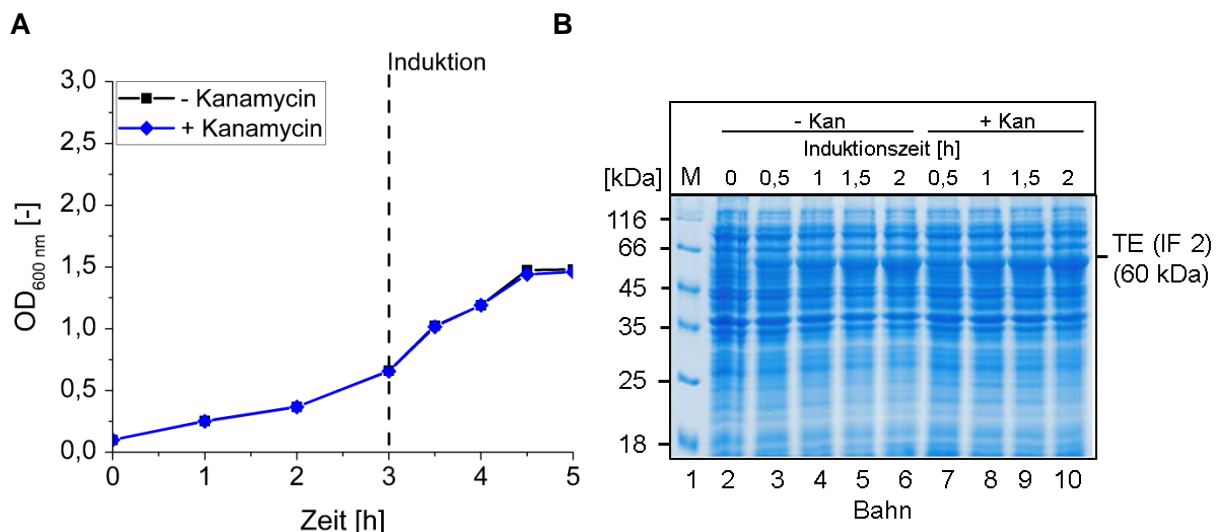


Abb. 3-3 (A) Wachstumskurve *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE, (B) zeitlicher Verlauf der Überproduktion von TE (IF 2) in Abhängigkeit von Kanamycin-Zugabe zur Kultur. Die Kultivierung erfolgte in jeweils 100 mL M9 Medium ohne Kanamycin bzw. mit 50 µg/mL Kanamycin (blau) bei 37 °C und 140 rpm ausgehend von einer OD_{600} von 0,1. Angegeben sind die Mittelwerte der optischen Dichte nach Doppelbestimmung gegen einen Blank (dH₂O). Bei einer OD_{600} von 0,7 wurde die Proteinüberproduktion mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert und beide Kulturen unter den gleichen Bedingungen für 2 h inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 1/OD-Proben angelegt, die Zellen in 50 µL Probenpuffer resuspendiert und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Bahn 1: Marker (5 µL); Bahn 2 – 6: Kultur ohne Kanamycin, 0 h bis 2 h ohne Induktion; Bahn 7 – 10: Kultur mit Kanamycin, 0,5 h bis 2 h nach Induktion; je 10 µL Probe.

Ein Unterschied im Wachstumsverhalten der Zellen in Abhängigkeit von der Kanamycin-Zugabe in das Kulturmedium war nicht nachweisbar. Die Wachstumskurven verliefen nahezu identisch (Abb. 3-3, A). Unabhängig von der Kanamycin-Zugabe konnte eine Proteinbande mit zunehmender Intensität bei ca. 60 kDa detektiert werden, welche TE (IF 2) entspricht (Abb. 3-3, B; Bahn 3 – 10). Die segregative Plasmidstabilität lag vor bzw. 2 h nach Induktion bei jeweils 100 %. Die *cer*-Sequenz konnte demnach einen möglichen Plasmidverlust trotz des fehlenden Selektionsdrucks durch das Antibiotikum vermeiden.

3.1.3 Überproduktion von TE (IF 2) im 12 L und 100 L Bioreaktormaßstab

Nach erfolgreicher Produktion von TE (IF 2) im Schüttelkolbenmaßstab sollte diese auf den Bioreaktormaßstab übertragen werden. Vorteilhaft bei der Produktion im Bioreaktor ist die Möglichkeit, Prozessparameter wie Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck pO_2 während der Kultivierung messen und gezielt steuern zu können. Die Produktion erfolgte im Biostat C Reaktor mit einem Startvolumen von 12 L M9 Minimalmedium und 20 g/L Glucose als Hauptkohlenstoffquelle im Batch. Die gewählten Bedingungen zur Überproduktion von TE (IF 2) im Bioreaktormaßstab sind unter 2.5.3, S. 37 aufgeführt. Die Prozessdaten sind im Anhang unter Abb. 8-6, A, S. 117 dargestellt. Die Zellen zum Inokulieren wurden in einer 3-stufigen Vorkultur in M9 Medium (+ 50 µg/mL Kanamycin) kultiviert. Das Medium im Bioreaktor enthielt hingegen kein Antibiotikum. Die Induktion der TE-Überproduktion erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) bei einer OD_{600} von ca. 16. Die Induktionszeit betrug 2 h. Vor bzw. alle 30 min nach Induktion wurden 1/OD-Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Messung der Glucose-Konzentration erfolgte halbstündlich. Die pulsweise Zugabe an Feed-Lösung (M9 Medium + 500 g/L Glucose) mit zusätzlichen 10 g/L Glucose erfolgte, sobald die Glucose-Konzentration ca. 5 g/L erreichte. Diese Zugabe entsprach einem Volumen von 0,24 L Feed-Lösung.

In Abb. 3-4, A sind die Zunahme der Biotrockenmasse (BTM) sowie die Glucose-Konzentration während einer solchen Fermentation exemplarisch dargestellt. Erwartungsgemäß zeigte sich das *E. coli*-typische Wachstumsverhalten mit lag-Phase und exponentieller Phase. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} wurde zu $0,62 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Nach Induktion zeigten die Zellen ein verlangsamtes Wachstum, vermutlich verursacht durch die metabolische Last der TE-Überproduktion. Das Coomassie-gefärbte Gel der SDS-PAGE zur Analyse der 1/OD-Proben ist in Abb. 3-4, B dargestellt. Dabei konnte eine Bande zunehmender Intensität ab 0,5 h nach Induktion bei ca. 60 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3-4, B, Bahn 3 – 6). Die Überproduktion von TE (IF 2) im Bioreaktormaßstab war somit erfolgreich.

Proben für den Plasmidstabilitätstest (2.5.4, S. 39) wurden 1,5 h vor Induktion und zum Prozessende entnommen. Die segregative Plasmidstabilität lag zu beiden Zeitpunkten bei 100 %. Demnach kann die *cer*-Sequenz auch im Bioreaktormaßstab den Verlust der Plasmide in Abwesenheit des Antibiotikums verhindern.

Das Kulturvolumen zum Zeitpunkt der Zellernte lag bei ca. 14 L. Es wurden ca. 500 g BFM geerntet ($8,74 \text{ g}_{BTM}/\text{L}_{Kulturvolumen}$). Diese wurde bis zur Aufarbeitung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Der Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$ lag bei $0,27 \text{ g}_{BTM}/\text{g}_{Glucose}$.

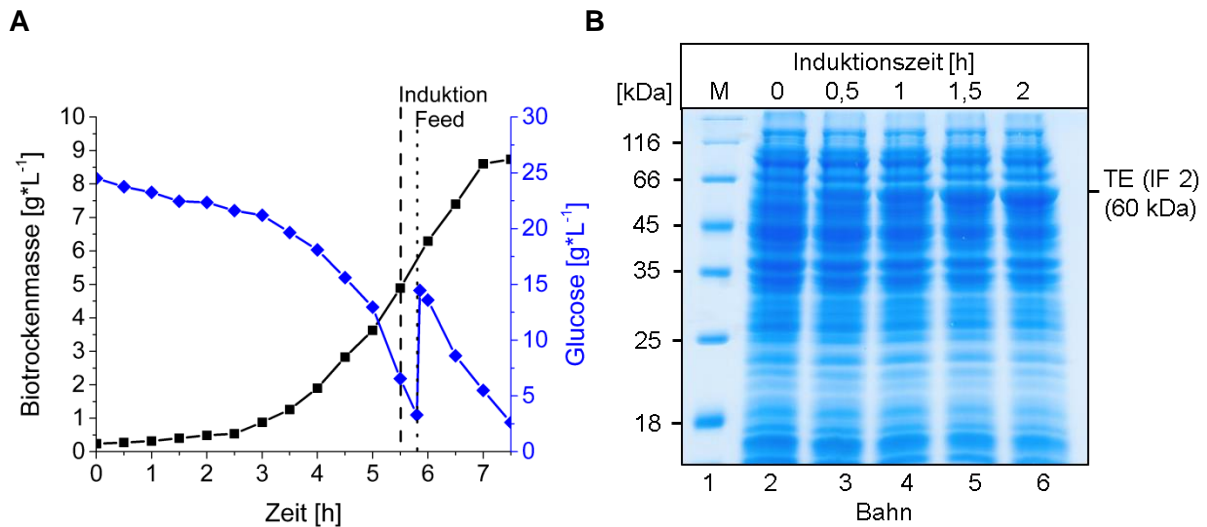


Abb. 3-4 (A) Wachstumskurve und Glucose-Konzentration während Fermentation zur Produktion von TE (IF 2) in *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE, (B) zeitlicher Verlauf der Überproduktion von TE (IF 2). Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in einem Startvolumen von 12 L M9 Minimalmedium (pH 7) ohne Kanamycin. Die Induktion erfolgte nach 5,5 h mit 1 mM IPTG. Die pulsweise Zugabe der Feed-Lösung erfolgte nach 5,8 h. Der pO_2 -Wert wurde auf 25 % geregelt. Zur Analyse der TE-Bildung wurden zu den angegebenen Zeitpunkten 1/OD-Proben angelegt. Bahn 1: Marker (5 μL); Bahn 2 – 6: 0 h bis 2 h nach Induktion; je 10 μL Probe.

Der Maßstab für die biotechnologische TE-Produktion sollte im Weiteren vergrößert werden, um die Ausgangsmenge an BFM für die TE-Aufarbeitung zu erhöhen. Dafür wurde die Kultivierung im Fermentationssystem Biostat D 200 L-System in einem Kulturvolumen von 100 L durchgeführt (2.5.3, S. 37). Die Prozessdaten sind im Anhang unter Abb. 8-6, C, S. 117 dargestellt. Das Startvolumen lag bei 88 L M9-Minimalmedium, dem kein Kanamycin zugegeben wurde. Das Medium wurde mit 12 L Vorkultur inokuliert, welche 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin enthielt. Die Konzentration an Kanamycin in 100 L Medium lag nach dem Inokulieren theoretisch bei ca. 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Alle anderen Parameter wurden, wenn nicht anders angegeben, wie bei der Kultivierung im 12 L-Maßstab gewählt. Die pulsweise Zugabe der Feed-Lösung erfolgte mit 10 g/L und 5 g/L, was einem Volumen von 2 L bzw. 1 L Feed-Lösung entsprach.

Die Wachstumskurve, der Verlauf der Glucose-Konzentration sowie das Coomassie-gefärbte Gel der SDS-PAGE zur Analyse der TE-Überproduktion sind in Abb. 3-5 dargestellt. Das Wachstumsverhalten der Zellen im 100 L-Maßstab zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kultivierung im 12 L-Maßstab. Die maximale Wachstumsrate μ_{max} lag bei 0,64 h^{-1} . Mittels SDS-PAGE konnte eine Proteinbande zunehmender Intensität bei ca. 60 kDa nachgewiesen werden, welche dem TE zugeordnet werden kann (Abb. 3-5, B; Bahn 3 – 6).

Nach Zentrifugation der Zellsuspension konnten insgesamt 4,18 kg BFM geerntet werden. Das Kulturvolumen zum Zeitpunkt der Zellernte lag bei ca. 103,5 L. Es wurde im Vergleich zur Produktion im 12 L-Maßstab eine leicht höhere Ausbeute von 9,9 $\text{g}_{\text{BTM}}/\text{L}_{\text{Kulturvolumen}}$ erzielt. Diese Erhöhung kann durch eine spätere Induktion der TE-Überproduktion bei einer OD_{600} von 18,6 statt 16 erklärt werden. Der Ertragskoeffizient $Y_{\text{X/S}}$ lag bei 0,28 $\text{g}_{\text{BTM}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$.

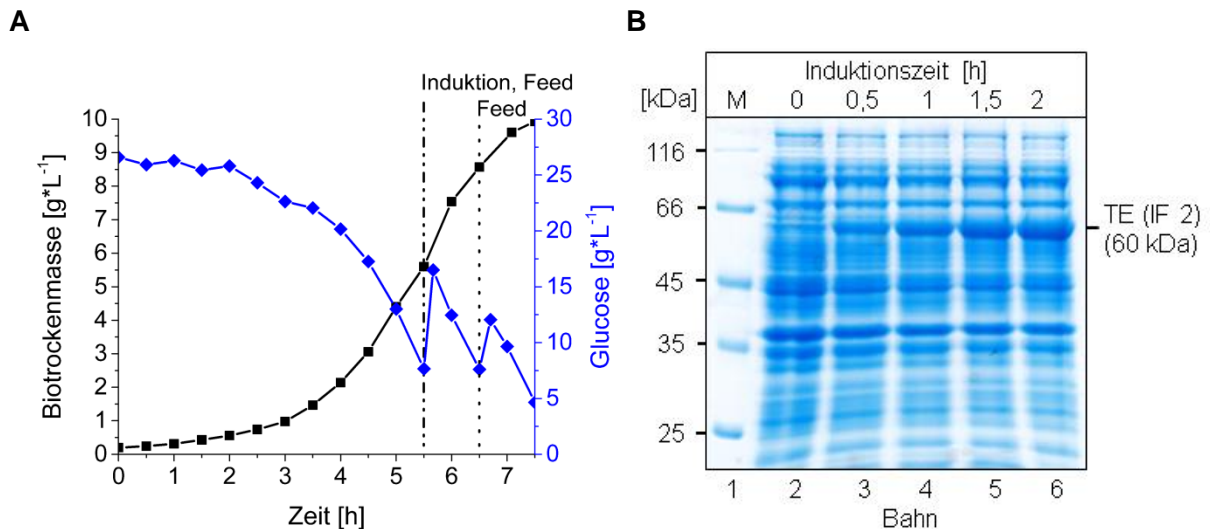


Abb. 3-5 (A) Wachstumskurve und Glucose-Konzentration während Fermentation im 100 L-Maßstab zur Produktion von TE (IF 2) in *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE, (B) zeitlicher Verlauf der Überproduktion von TE (IF 2) im 100 L-Maßstab. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in einem Startvolumen von 100 L M9-Minimalmedium (pH 7) ohne Kanamycin. Die Induktion erfolgte nach 5,5 h mit 1 mM IPTG. Die pulsweise Zugabe der Feed-Lösung erfolgte nach 5,5 h mit 10 g/L und nach 6,5 h mit 5 g/L. Der pO₂-Wert wurde auf 25 % geregelt. Zur Analyse der TE-Bildung wurden zu den angegebenen Zeitpunkten 1/OD-Proben angelegt. Bahn 1: Marker (5 µL); Bahn 2 – 6: 0 h bis 2 h nach Induktion; je 10 µL Probe.

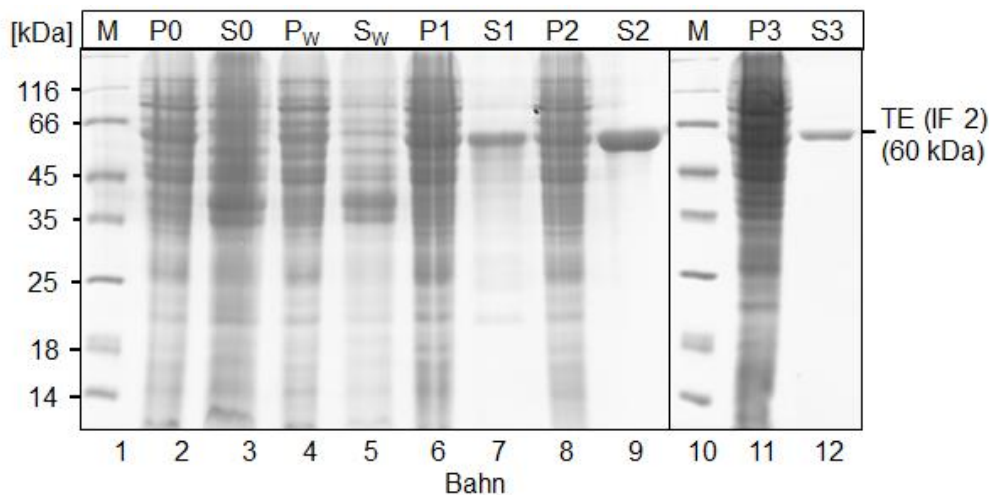
3.2 Extraktion von TE (IF 2) aus *E. coli* Biofeuchtmasse

Grundlage für die Extraktion und Aufarbeitung von rekombinantem Tropoelastin Isoform 2 (TE IF 2) aus *E. coli*-Biofeuchtmasse (BFM) waren publizierte Verfahren von Martin bzw. Vrhovski und Kollegen [Martin et al., 1995; Vrhovski et al., 1997]. Der Stand des Wissens zur TE-Reinigung wurde in der Einleitung der vorliegenden Arbeit (1.1.2, S. 14) beschrieben. Für die Extraktion von TE (IF 2) aus der generierten BFM (3.1.3, S. 57) wurde in der vorliegenden Arbeit ein Protokoll genutzt, das auf einer Masterarbeit [Ahmed, 2012] basiert. Die Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit angepasst. Das endgültige Fließschema zur Extraktion von TE (IF 2) ist in Abb. 2-1, S. 41 dargestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse einer solchen TE-Extraktion ausgehend von 100 g BFM nach Produktion im 100 L-Bioreaktormaßstab exemplarisch erläutert. Die Unterschiede zu der TE-Extraktion aus BFM, die im 12 L-Bioreaktormaßstab generiert wurde, werden anschließend erläutert.

Proben aller Fraktionen wurden nach der Extraktion mittels SDS-PAGE (2.6.1, S. 39) analysiert. Die eingetrockneten Rückstände der Überstände wurde in je 400 µL bzw. die Pelletproben in je 200 µL harnstoffhaltigem SDS-Probenpuffer resuspendiert und erhitzt. Ausgenommen davon sind die Rückstände der Überstände S₀ und S_w, da diese aufgrund der hohen Proteinkonzentration nur nach Zugabe von 1 mL Probenpuffer hinreichend flüssig waren, um auf das SDS-PA Gel aufgetragen zu werden. Bezogen auf das Volumen bei S₁ – S₃ entspricht dies einem 2,5-fach höherem Volumen an Probenpuffer. Das Coomassie-gefärbte Gel ist in Abb. 3-6, A dargestellt. Nach Erhitzen und Resuspension der BFM erfolgte der Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator (HDH). Nach der ersten Passage wies das Zelllysate eine sehr hohe Viskosität auf, die mit zweiter und dritter Passage abnahm. Das überproduzierte TE (m. w.: 60 kDa) war nach Zentrifugation des Zelllysates in der unlöslichen Fraktion P₀

lokalisiert (Abb. 3-6, A; Bahn 2). Die lösliche Fraktion S₀ war braun, stark trüb (Abb. 3-6, B) und enthielt hauptsächlich Wirtszellproteine (Abb. 3-6, A; Bahn 3). Nach dem Waschschrift war das TE weiterhin nur in der unlöslichen Fraktion P_W nachweisbar (Abb. 3-6, A; Bahn 4). Der Überstand S_W war hellbraun, trüb (Abb. 3-6, B) und enthielt Wirtszellproteine (Abb. 3-6, A; Bahn 5). Die unlösliche Fraktion P_W wurde im Extraktionsmix resuspendiert und rührend für 15 min bei RT inkubiert. Wirtszellproteine wurden dabei präzipitiert und TE aus der unlöslichen Fraktion extrahiert. Der enthaltene 50 mM Ammoniumacetat-Puffer erzeugte einen stabilen pH-Wert und lieferte die nötige Ionenstärke, um die bei pH 5,0 dissoziierten Aminosäuren im TE (pI: 10,37) mit Acetat- bzw. Ammonium-Ionen abzusättigen. Ein weiterer Vorteil dieses Salzes ist dessen Volatilität, sodass überschüssiges Ammoniumacetat während der Gefrier-trocknung unter Vakuumdruck als Essigsäure bzw. Ammoniak entfernt werden kann. Nach dem ersten Extraktionsschritt wurden die gefällten Proteine durch Zentrifugation abgetrennt. Die SDS-PAGE Analyse der Fraktionen P1 und S1 zeigte, dass sich in beiden Fraktionen TE befand (Abb. 3-6, A; Bahn 6 und 7). In der Fraktion S1 konnten neben dem TE außerdem unbekannte Proteine bei ca. 20 kDa – 60 kDa detektiert werden. Nach dem zweiten Extraktions-schritt konnte sowohl in der Fraktion P2 als auch in S2 TE nachgewiesen werden (Abb. 3-6, A; Bahn 8 und 9). Im Vergleich zu S1 enthielt S2 nur noch sehr wenige schwache Proteinbanden bei einer molekularen Masse von 45 kDa – 60 kDa und mehr Vollängen-TE.

A



B

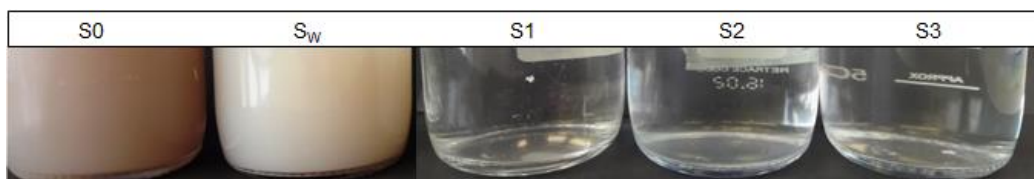


Abb. 3-6 (A) 12,5 %ige SDS-PAGE Fraktionen einer Extraktion von TE (IF 2) aus *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE. Bahn 1 und 10: Marker (5 μ L); Bahn 2: unlösliche Fraktion; Bahn 3: lösliche Fraktion in 1:2,5 Verdünnung; Bahn 4: unlösliche Fraktion nach Waschschrift; Bahn 5: lösliche Fraktion nach Waschschrift in 1:2,5 Verdünnung; Bahn 6, 8 und 11: Präzipitat nach Acetonfällung des 1. – 3. Extraktionsschrittes; Bahn 7, 9 und 12: acetonhaltiger Überstand des 1. – 3. Extraktionsschrittes; je 2,5 μ L Probe. (B) Überstände S₀ – S₃ einer Extraktion von TE (IF 2).

Nach dem dritten Extraktionsschritt konnte in den Fraktionen P3 und S3 TE nachgewiesen werden (Abb. 3-6, A; Bahn 11 und 12). Im Überstand S3 wurde nur Vollängen-TE detektiert. Es ist zu erkennen, dass die dreistufige Extraktion nicht vollständig war, da in P3 noch TE nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-6, A; Bahn 11). Die Pellets P1, P2 und P3 wiesen eine feste Konsistenz auf. Die TE-haltigen Überstände S1, S2 und S3 waren klar und farblos/schwach gelblich (Abb. 3-6, B) und wurden bis zur Aufarbeitung des TEs bei RT gelagert. Die Extraktion von TE aus *E. coli* BFM war somit erfolgreich.

Basierend auf unpublizierten Vorarbeiten [Ahmed, 2012] gab es bei der TE-Extraktion aus BFM, die im 12 L Bioreaktormaßstab generiert wurde, Unterschiede zum oben beschriebenen Protokoll. Extraktion 1 und 3 wurden für je 4 h bzw. Extraktion 2 für 16 h ü.N. durchgeführt. Eine Resuspension der Pellets mittels Ultraturrax erfolgte dabei nicht. Die festen Pellets wurden stattdessen mit einem Glasstab grob zerkleinert und rührend im Extraktionsgemisch inkubiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass eine Extraktionszeit länger als 15 min pro Extraktionsschritt zu keiner Steigerung der extrahierten TE-Menge führte (s. Anhang, Abb. 8-7, S. 120). Laut SDS-PAGE Analyse der Überstände war die TE-Bandenintensität nach 15 min bzw. 4 h Extraktionszeit gleich. Deshalb wurde die Extraktionszeit in der vorliegenden Arbeit bei der TE-Aufarbeitung aus der im 100 L-Maßstab produzierten BFM von 4 h auf 15 min verkürzt (Abb. 2-1, S. 41). Zur effizienteren Resuspension der Pellets P_w, P1 und P2 (3.2, S. 59), wurde außerdem ein Ultraturrax auf Minimalstufe (2 800 rpm) verwendet. Eine Fragmentierung des TEs durch die wirkenden Scherkräfte konnte ausgeschlossen werden, da im SDS-PAGE Gel kein Unterschied zum Bandenmuster der Proben nach Resuspension durch Schütteln mittels Vortexer nachgewiesen wurde (s. Anhang, Abb. 8-7, S. 120).

3.3 Aufarbeitung von TE (IF 2) aus acetonhaltigen Überständen

Das nächste Ziel war die Aufarbeitung des Tropoelastins (TE) aus den acetonhaltigen Überständen S1, S2 und S3 der Extraktion (3.2, S. 59). Das Prozessschema ist in Abb. 2-2, S. 44 dargestellt und unter 2.8, S. 44 beschrieben. Im Weiteren wird die Aufarbeitung des TE (IF 2) aus den vereinigten Überständen S1, S2 und S3 exemplarisch erläutert.

Zunächst wurde das Aceton mittels Rotationsverdampfer von der wässrigen Phase abgetrennt und gleichzeitig das Volumen für die weitere Aufarbeitung des TEs reduziert. Dabei wurde eine Wasserbadtemperatur von 25 °C gewählt, um eine TE-Aggregation bei höheren Temperaturen und zunehmender Proteinkonzentration möglichst zu vermeiden. Der Vakuumdruck wurde schrittweise von 280 mbar bis auf 15 mbar abgesenkt, bis kein Lösungsmittel mehr kondensierte. Von ca. 900 mL der vereinten Überstände S1 – S3 entsprechen theoretisch 630 mL Aceton. Das Volumen des abgetrennten Acetons wurde testweise nach dessen Kondensation bestimmt. Es wurden insgesamt 600 mL abgetrennt, was ca. 95 % des enthaltenen Acetons entspricht. Bereits nach Abtrennen von ca. 10 Vol.-% Aceton setzte eine Trübung der anfänglich klaren Lösung ein. Diese Trübung wurde mit abnehmendem Volumen zunehmend stärker.

Durch Zentrifugation des eingeeengten Überstandes bildete sich ein bräunliches Pellet, das vom Überstand durch Dekantieren getrennt werden konnte.

Bei dem publizierten Verfahren zur TE-Aufarbeitung von Vrhovski und Kollegen wurde das TE mit Chloroform gewaschen [Vrhovski et al., 1997]. Dadurch wurden Lipide entfernt, die während der Butanolfällung solubilisierten. Nach Trocknung der chloroformhaltigen Waschfraktion verblieb ein öliger, gelber Rückstand. Dieser wurde gaschromatographisch analysiert und darin Fettsäuren nachgewiesen. Dazu zählten überwiegend Palmitin- und Oleinsäure. Das in der vorliegenden Arbeit bei der TE-Aufarbeitung erzeugte bräunliche Pellet wurde deshalb teilweise ebenfalls mit Chloroform gewaschen (Abb. 2-2, S. 44). Dabei war eine Entfärbung des Pellets erkennbar. Der gelbe, chloroformhaltige Überstand S5 wurde von dem Pellet abgetrennt und beide Fraktionen vollständig getrocknet. Die Analyse mittels SDS-PAGE ergab, dass beide Fraktionen TE enthielten (Abb. 3-7, A; Bahn 2 und 3). Die Trockenmasse des Pellets P5 ergab einen TE-Verlust von ca. 7 % bezogen auf die Gesamtausbeute an lyophilisiertem TE. Ein erneutes Lösen des präzipitierten TEs im Extraktionsmix war nicht möglich.

Die wässrige TE-Lösung wurde anschließend bei RT gegen dH₂O mit einer Gesamtverdünnung von 1:10⁴ dialysiert (2.8, S. 43). Die Leitfähigkeit betrug zum Dialyseende konstant ca. 10 µS/cm. Um nur lösliches TE mittels Lyophilisation zu trocknen, wurde das Dialyseprodukt erneut zentrifugiert. Dabei bildete sich bei einigen Aufarbeitungen ebenfalls ein schwach bräunliches Pellet, welches mit Chloroform gewaschen wurde (Abb. 2-2, S. 44). Die Analyse mittels SDS-PAGE identifizierte das Pellet P6 als TE (Abb. 3-7, A; Bahn 4). Es ergab sich ein TE-Verlust von ca. 8 % bezogen auf die Gesamtausbeute an lyophilisiertem TE. Der zentrifugierte Überstand nach der Dialyse war klar bis schwach trüb, farblos und wurde bei -20 °C eingefroren. Danach erfolgte die Lyophilisation bis zur vollständigen Trocknung. Das Lyophilisat war watteartig und weiß bzw. schwach gelblich (Abb. 3-7, B). Die isolierte Menge lag bei 640 ± 60 mg (n = 5) ausgehend von 100 g BFM, die im 12 L-Maßstab generiert wurden (entsprechend 6,4 ± 0,6 mg/g_{BFM} bzw. 220 ± 20 mg/L_{Kulturvolumen}).

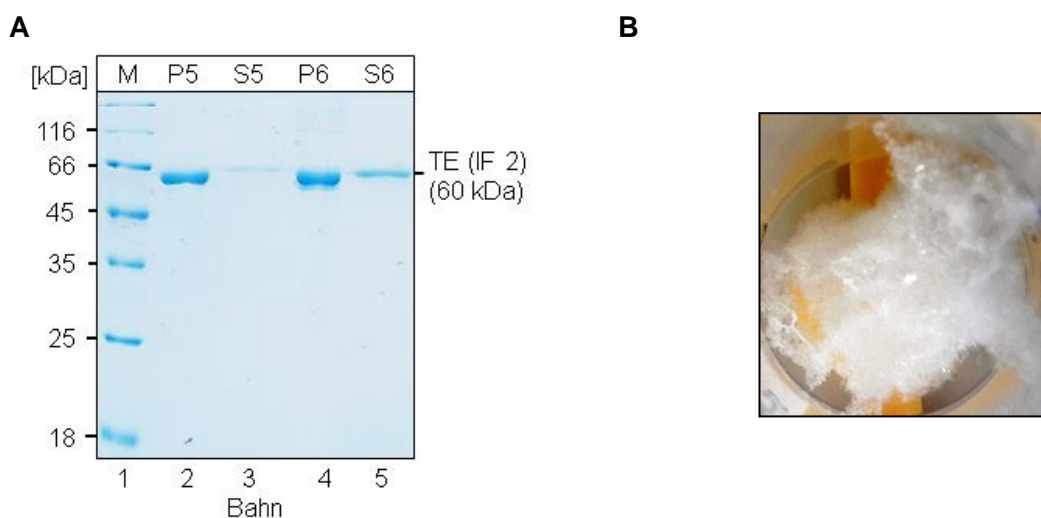


Abb. 3-7 (A) 12,5 %ige SDS-PAGE zur Analyse des Präzipitats der TE-Aufarbeitung, (B) Lyophilisat nach Aufarbeitung der acetonhaltigen Überstände S1 – S3. Bahn 1: Marker (5 µL); Bahn 2: Präzipitat bei Rotationsverdampfung nach Waschen mit Chloroform (2 µL); Bahn 3: getrockneter Überstand nach Waschen mit Chloroform (10 µL); Bahn 4: Präzipitat bei Dialyse nach Waschen mit Chloroform (2 µL); Bahn 5: getrockneter Überstand nach Waschen mit Chloroform (10 µL).

Trotz des Verlustes von insgesamt ca. 15 % TE durch die Präzipitation wurde die erzielte Ausbeute als ausreichend bewertet. Da bei der Analyse der um den Faktor 50 höher konzentrierten Fraktionen S5 und S6 nur eine sehr geringe TE-Konzentration nachgewiesen wurde (Abb. 3-7, A; Bahn 3 und 5), wurden diese Fraktionen für die Bilanzierung vernachlässigt.

Die Extraktion und Aufarbeitung des TEs wurde während des gesamten Projektes aufrechterhalten, sodass TE in relativ kurzer Zeit im Gramm-Maßstab zur Verfügung stand. In einer Extraktion wurde testweise ein vierter Extraktionsschritt durchgeführt, da nach drei Extraktionsstufen noch TE im Pellet nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-6; Bahn 11, S. 60). Die TE-haltigen Überstände wurden nach dem gleichen Protokoll einzeln aufgearbeitet (2.8, S. 44). Die TE-Ausbeute nach Aufarbeitung der vierten Extraktionsstufe war mit 5 % der Gesamtausbeute sehr gering, sodass ein vierter Extraktionsschritt vernachlässigt werden kann.

Die Aufarbeitung von 100 g BFM aus der Kultivierung im 100 L-Maßstab führte zu einer Ausbeute von 6,33 mg/g_{BFM} bzw. 255 mg/L_{Kulturvolumen}. Ein Vergleich der TE-Ausbeute nach Acetonextraktion und der Wachstumsparameter (3.1.3, S. 57) von *E. coli* im 12 L- und 100 L-Maßstab ist in Tab. 3-1 dargestellt. Die durchschnittlichen Ausbeuten an TE pro Gramm BFM nach Aufarbeitung waren mit ca. 6,3 – 6,5 mg vergleichbar. Der Faktor der Maßstabsvergrößerung des Kultivierungsmediums von 8,3 spiegelt sich weitestgehend in der Ausbeute der Biofeuchtmasse mit 8,7 zwischen Fermentation 1 (12 L) und 3 (100 L) wider. Die maximalen Wachstumsraten der *E. coli*-Zellen im 12 L- und 100 L-Bioreaktormaßstab waren mit 0,59 h⁻¹ bzw. 0,64 h⁻¹ nahezu gleich. Daraus ergaben sich Verdopplungszeiten von 65 – 70 min. Der Ertragskoeffizient $Y_{X/S}$ als Maß für die Effizienz der Biomasseproduktion war mit 0,27 g_{BTM}/g_{Glucose} und 0,30 g_{BTM}/g_{Glucose} im 12 L-Maßstab (Fermentationen 1 und 2) bzw. 0,28 g_{BTM}/g_{Glucose} im 100 L-Maßstab (Fermentation 3) ebenfalls sehr ähnlich. Der Unterschied in der generierten Biofeuchtmasse lässt sich durch die leicht voneinander abweichenden Induktionszeitpunkte erklären. Die Übertragung der TE-Produktion auf den 100 L-Maßstab war damit erfolgreich und konnte erstmals in einem definierten Minimalmedium gezeigt werden.

Tab. 3-1 Vergleich der TE-Produktion im 12 L (Fermentation 1 und 2) und 100 L-Bioreaktormaßstab (Fermentation 3).

Kulturvolumen [L]	μ_{\max} [h ⁻¹]	t_d [min]	OD _{Indukt.} [-]	BTM _{Ernte} [g/L]	$Y_{X/S}$ [g _{BTM} /g _{Glc}]	BFM _{Ernte} [kg]	TE * ₁ [mg/g _{BFM}]	TE * ₁ [mg/L _{Kultur}]
12 * ₂	0,62	67	16,3	8,7	0,27	0,48	6,4	220
12 * ₂	0,60	69	14,2	7,0	0,30	0,41	6,5	205
100	0,65	64	18,6	9,9	0,28	4,18	6,3	255

*₁ nach Acetonextraktion

*₂ Extraktionszeit von 4 h (Extraktion 1 und 3) bzw. 16 h (Extraktion 2) statt 15 min pro Extraktionsschritt und ohne Resuspendieren der Pellets mittels Ultraturrax

3.4 Charakterisierung des extrahierten Tropoelastins

3.4.1 Löslichkeitstest

Um zu überprüfen, ob das aufgearbeitete Tropoelastin (3.3, S. 61) vollständig rücklöslich ist, sollte dessen Löslichkeit in dH₂O (TE-Konzentration: 5 mg/mL) und 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) (TE-Konzentration: 50 mg/mL) getestet werden. Die Löslichkeit des Lyophilisats wurde, wie unter 2.9, S. 44 beschrieben, untersucht. Unter den Bedingungen entstand eine klare Lösung, die bei einer TE-Konzentration von 50 mg/mL gelblich-braun verfärbt war. Durch Zentrifugation bildete sich kein Bodenkörper, welcher auf unlösliches TE hätte schließen lassen können. Das Lyophilisat war somit in den getesteten Lösungsmitteln und Konzentrationen vollständig löslich.

3.4.2 Untersuchung der Proteinreinheit

Zur Untersuchung der Proteinreinheit wurde das Lyophilisat (3.3, S. 61) mittels SDS-PAGE (2.6.1, S. 39) analysiert. Als Probe diente hier beispielhaft das Lyophilisat nach Produktion im 12 L-Bioreaktormaßstab (Fermentation 1; Tab. 3-1, S. 63). Zwei identisch beladene SDS-PAGE Gele wurden entweder mittels Coomassie-Färbung (2.6.2.1, S. 39) oder mittels Silberfärbung (2.6.2.2, S. 40) gefärbt. Im Vergleich zur Coomassie-Färbung besitzt die Silberfärbung eine 100-fach höhere Sensitivität und ist damit besser für den Nachweis geringster Proteinmengen geeignet. Die gefärbten Gele der SDS-PAGE Analyse sind in Abb. 3-8 dargestellt. Bei beiden Färbemethoden wurde Tropoelastin (TE, IF 2) bei der erwarteten molekularen Masse von 60 kDa nachgewiesen (Abb. 3-8; Bahn 2 und 4). Das Lyophilisat zeigte mit der Coomassie-Färbung eine hohe Proteinreinheit. Es wurde nur ein sehr geringer Anteil von Proteinen im Bereich von 20 – 60 kDa detektiert. Im Vergleich dazu wurden in diesem Bereich bei der gleichen Probe mittels Silberfärbung zahlreiche Proteine nachgewiesen. Theoretisch kann es sich dabei entweder um *E. coli*-eigene Wirtszellproteine oder Fragmente des TEs handeln.

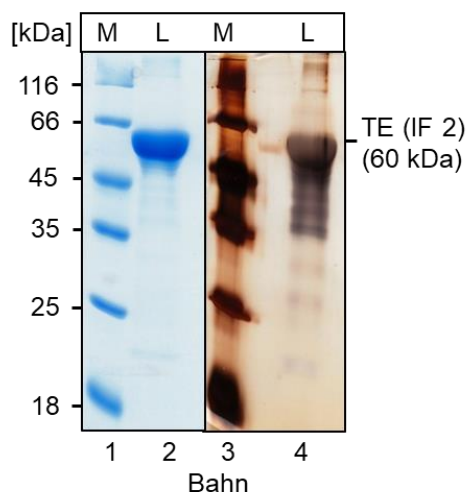


Abb. 3-8 12,5 %ige SDS-PAGE zur Analyse der Proteinreinheit des Lyophilisats nach Produktion im 12 L-Bioreaktormaßstab (Fermentation 1). Bahn 1 + 3: Marker (5 µL); Bahn 2 und 4: Lyophilisat nach Aufarbeitung aus acetonhaltigen Überständen S1 – S3 (je ca. 5 µg); links: Coomassie-Färbung, rechts: Silberfärbung, 3 min entwickelt.

3.5 Reinigung des extrahierten Tropoelastins mit Kationenaustauschchromatographie

Um die kontaminierenden Proteine (3.4.2) vom Tropoelastin (TE, IF 2) abzutrennen und möglichst nur Vollängen-TE für weiterführende Experimente zu gewinnen, sollte ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen werden. Bereits Vrhovski und Kollegen beschrieben die Abtrennung von TE-Fragmenten mittels Umkehrphasenchromatographie (HPLC) [Vrhovski et al., 1997]. Diese Methode war aufgrund des hohen Bedarfs an mehreren 100 mg TE und der fehlenden Geräteausstattung nicht umsetzbar. Selbst eine Ausbeute von ca. 100 mg TE pro Lauf mittels präparativer HPLC wäre zu gering gewesen (persönliche Information Dr. Malešević). Als Alternative zur HPLC sollte in der vorliegenden Arbeit ein Protokoll zur TE-Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (IEX) entwickelt werden. Vorteil der IEX ist eine bessere Skalierbarkeit des Prozesses. Eine besondere Herausforderung stellte das Koazervationsverhalten des TEs dar, welches von der Temperatur, dem pH, der TE- und der Salzkonzentration abhängig ist. Der theoretische isoelektrische Punkt (pI) von TE (IF 2, ohne Signalpeptid) liegt bei 10,37 (s. Anhang, Abb. 8-3, S. 115). Für Proteine mit einem pI > 8 wird eine Kationenaustauschchromatographie (cIEX) empfohlen [Aguilar, 2004]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Säulenmaterial SP Sepharose FastFlow (Tab. 2-2, S. 28) verwendet. Für die Interaktion mit der negativ geladenen Sulphopropylgruppe ist eine positive Netto-Ladung des TEs erforderlich. Als pH-Wert des Binde- und Elutionspuffers wurde deshalb ein pH von 8,0 gewählt. Als Puffersubstanz wurde 50 mM HEPES eingesetzt, dessen Pufferbereich bei 6,8 – 8,2 liegt (pKs = 7,56 bei 25 °C, vgl. GE-Manual "Ion exchange chromatography – Principles and Methods", 2016). Dieser Puffer wurde bereits durch Martin und Kollegen zum Lösen von rekombinantem TE genutzt [Martin et al., 1995].

3.5.1 Einfluss der NaCl-Konzentration auf das Koazervationsverhalten von Tropoelastin

Da das Tropoelastin (TE) bei der Kationenaustauschchromatographie (cIEX) mit hohen Salzkonzentrationen bis 500 mM NaCl eluiert würde, muss das Risiko einer ungewollten TE-Aggregation am Säulenmaterial berücksichtigt werden. Bei einer zu niedrigen Salzkonzentration hingegen würden die ionischen Wechselwirkungen zwischen den bei pH 8,0 positiv geladenen Aminosäuren (Arg, Lys) und dem negativ geladenen Säulenmaterial nur teilweise überwunden. Das TE würde nicht bzw. nicht vollständig eluieren. Aus diesem Grund wurde zunächst das Koazervationsverhalten des extrahierten, lyophilisierten TEs (3.3, S. 61) im gewählten Puffersystem von 50 mM HEPES (pH 8,0) untersucht. Ziel war es, die höchstmögliche NaCl-Konzentration für die Elution zu bestimmen, ohne eine Koazervation bei Raumtemperatur (25 °C) auszulösen. Dafür wurde die Aggregationsoptik des Prometheus NT.48 (NanoTemper, Deutschland) genutzt. Die Probenvorbereitung und Durchführung der Messung sind unter 2.9, S. 44 beschrieben. Die resultierende Lichtstreuung in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration von 0 – 250 mM ist in Abb. 3-9 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Lichtstreuung bei beiden getesteten TE-Konzentrationen bis zu einer NaCl-Konzentration von 175 mM nahezu konstant war. Die Lichtstreuung war mit NaCl-Konzentrationen über 175 mM zunehmend höher, was für eine stärkere TE-Aggregation spricht. Weiterhin wird der Einfluss der TE-

Konzentration auf die Koazervation deutlich, da die Lichtstreuung bei z.B. 250 mM NaCl und 20 mg/mL TE (Abb. 3-9, rot) mit ca. 300 mAU ungefähr doppelt so hoch war wie die Lichtstreuung bei gleicher NaCl-Konzentration und 10 mg/mL TE mit ca. 175 mAU (Abb. 3-9, schwarz). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, bei der cIEX zunächst eine NaCl-Konzentration von maximal 150 mM für die Elution zu testen.

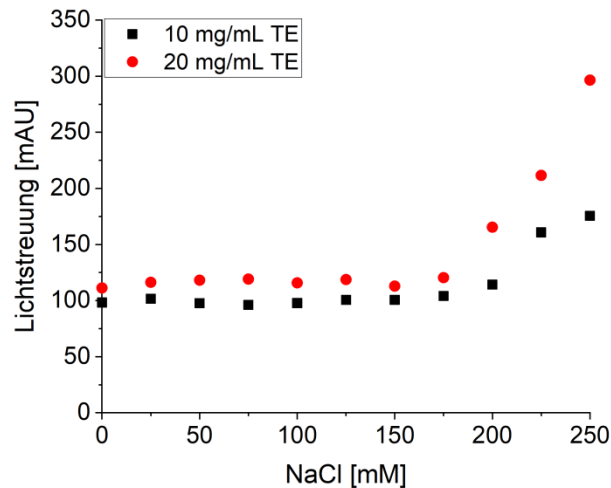


Abb. 3-9 Lichtstreuung der TE-Lösung abhängig von der NaCl-Konzentration bei 25 °C. Das extrahierte TE (IF 2) wurde in einer Konzentration von 10 mg/mL (schwarz) bzw. 20 mg/mL (rot) in 50 mM HEPES (pH 8,0) gelöst und eine NaCl-Konzentration von 0 – 250 mM eingestellt.

3.5.2 Reinigungsversuch von TE (IF 2) mittels Kationenaustauschchromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Nachdem die höchstmögliche NaCl-Konzentration zur Elution des Tropoelastins (TE) bestimmt wurde, wurde die Kationenaustauschchromatographie (cIEX) unter den in 2.11, S. 45 beschriebenen Parametern durchgeführt. Es wurden in diesem Fall 300 mg des lyophilisierten TEs (IF 2) (3.3, S. 61) in einer Konzentration von 2 mg/mL im Bindepuffer 50 mM HEPES (pH 8,0) gelöst. Für die Elution wurden ein linearer Gradient von 0 – 15 % (10 CV) sowie ein isokratischer Schritt von 15 % Elutionspuffer (3 CV) gewählt. Dies entspricht einer NaCl-Konzentration von 0 – 150 mM. Das entsprechende Chromatogramm des Reinigungsversuches ist in Abb. 3-10, A dargestellt. Alle Fraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE (2.6.1, S. 39) analysiert. Die Coomassie-gefärbten Gele der SDS-PAGE Analyse sind in Abb. 3-10, C dargestellt.

Bei den Proben vor bzw. nach Filtration der TE-Lösung wurde eine Proteinbande bei ca. 60 kDa detektiert, welche dem TE entspricht (Abb. 3-10, C oben; Bahn 2 und 3). Die TE-Banden zeigten im Vergleich keinen signifikanten Unterschied in der Bandenintensität. Somit scheint das lyophilisierte TE im Bindepuffer vollständig löslich gewesen zu sein. Wie bei den vorherigen Analysen wurden einige schwache Proteinbanden im Bereich von 20 kDa – 60 kDa nachgewiesen. Im Durchfluss (Abb. 3-10, C oben; Bahn 4) und in der Waschfraktion (Abb. 3-10, C oben; Bahn 5) wurde eine niedrige Absorption bei 280 nm gemessen und es konnten in beiden Fraktionen mittels Coomassie-Färbung keine Proteine nachgewiesen werden. Da Wirtszellproteine bereits während der Extraktion (3.2, S. 59) vom TE getrennt wurden, ist eine sehr geringe Proteinkonzentration im Durchfluss zu erwarten gewesen.

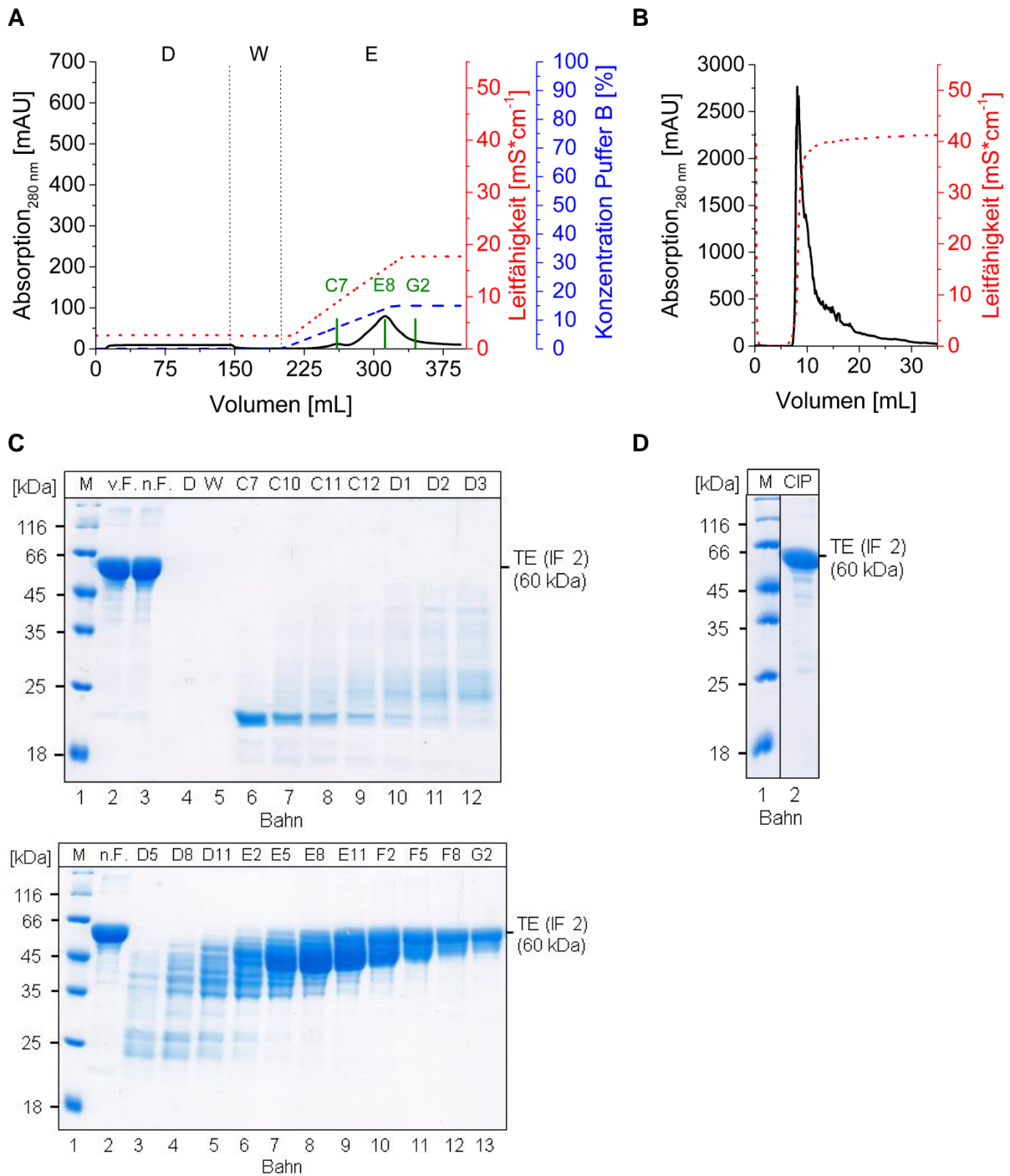


Abb. 3-10 (A) Chromatogramm der cIEX von TE (IF 2) mit Elution von 0 – 150 mM NaCl, (B) Chromatogramm CIP nach cIEX, (C) 12,5 %ige SDS-PAGE der Fraktionen der cIEX, (D) 12,5 %ige SDS-PAGE des Eluats nach CIP. XK16/20 mit SP Sepharose FastFlow (CV: 12 mL), Applikation von 300 mg TE in 50 mM HEPES (pH 8,0) [2 mg/mL] mit 2 mL/min, Bindepuffer: 50 mM HEPES (pH 8,0), Elutionspuffer: 50 mM HEPES (pH 8,0) + 1 M NaCl, CIP-Puffer: 50 mM HEPES (pH 8,0) + 500 mM NaCl + 3 M Harnstoff. Alle Proben wurden 1:1 mit 2x Probenpuffer bzw. Proben der Elutionsfraktionen 4:1 mit 5x Probenpuffer versetzt. (C, oben) Bahn 1: Marker [5 µL]; Bahn 2 und 3: TE vor bzw. nach Filtration [je 5 µL]; Bahn 4: Durchfluss [15 µL]; Bahn 5: Waschfraktion [15 µL]; Bahn 6 – 12: Elutionsfraktionen C7 – D3 [je 10 µL]; (C, unten) Bahn 1: Marker [5 µL]; Bahn 2: TE nach Filtration [5 µL]; Bahn 3 – 13: Elutionsfraktionen D5 – G2 [je 10 µL]; (D) Bahn 1: Marker [5 µL]; Bahn 2: Eluat bei CIP, 1:10 verdünnt [2 µL].

Die Analyse der Waschfraktion belegt, dass das TE unter den gewählten Bedingungen vollständig am Säulenmaterial gebunden hat. In den Fraktionen C7 bis D11 eluierte kein Volllänge-TE, sondern nur Proteine mit einer molekularen Masse geringer als 60 kDa (Abb. 3-10, C oben; Bahn 6 – 12 bzw. unten; Bahn 3 – 5). In den Fraktionen des zweiten Elutionspeaks E2 bis G2 (Abb. 3-10, C unten; Bahn 6 – 13) ist eine Überlagerung mit der Elution von Volllänge-TE nachweisbar gewesen. Neben den unbekannt Proteinen mit einer molekularen Masse von unter 60 kDa konnte auch Volllänge-TE detektiert werden. Eine vollständige Abtrennung der TE-Fragmente war jedoch nicht möglich.

Um zu untersuchen, ob nach Elution mit bis zu 150 mM NaCl noch Volllänge-TE am Säulenmaterial gebunden war, sollte das Säulenmaterial gereinigt werden. Eine Reinigung des Chromatographiematerials mit 1 M NaCl-Lösung laut Herstellerangabe war aufgrund der hohen Ionenstärke nicht möglich, da diese die TE-Koazervation auslöst. Dadurch würde das möglicherweise am Säulenmaterial gebundene TE aggregieren. Außerdem wird eine Reinigung des Chromatographiematerials mit 1 M NaOH-Lösung durch den Hersteller angegeben. Der Einfluss von 1 M NaOH-Lösung auf die TE-Aggregation wurde in einem Vortest im Eppendorfgefäß untersucht. Dazu wurde TE in einer Konzentration von 20 mg/mL in Bindepuffer (cLEX) gelöst und eine NaCl-Endkonzentration von 150 mM eingestellt. Nach Zugabe des gleichen Volumens einer 1 M NaOH-Lösung setzte eine schlagartige Präzipitation ein. Der pH-Wert lag nach Zugabe der NaOH-Lösung bei 10. Somit war auch 1 M NaOH-Lösung nicht für die Reinigung des Chromatographiematerials geeignet.

Zur Entwicklung einer alternativen CIP-Methode wurde das Koazervationsverhalten von 10 mg/mL TE in 50 mM HEPES (pH 8,0), ohne bzw. mit 500 mM NaCl jeweils mit 2 M Harnstoff mittels Aggregationsoptik (2.10, S. 44) untersucht. Ohne Zugabe von NaCl ist bis zu einer Temperatur von 55 °C keine signifikante Zunahme der Lichtstreuung nachweisbar gewesen (Abb. 3-11, schwarz). Durch die fehlende Ionenstärke setzte demnach erwartungsgemäß keine TE-Koazervation ein. Bei der Probe mit 500 mM NaCl (Abb. 3-11, rot) konnte für die Koazervation hingegen eine Transitionstemperatur von ca. 30 °C bestimmt werden.

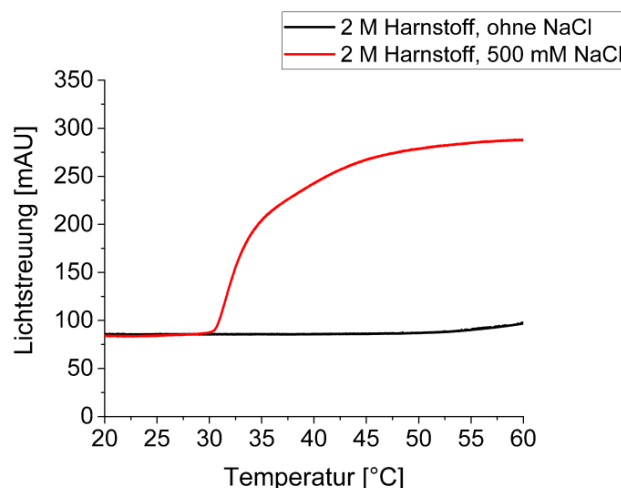


Abb. 3-11 Einfluss von NaCl und 2 M Harnstoff auf das Koazervationsverhalten von TE (IF 2) bei zunehmender Temperatur. TE-Konzentration: 10 mg/mL in 50 mM HEPES (pH 8,0) + 2 M Harnstoff, ohne NaCl (schwarz) bzw. mit 500 mM NaCl (rot). Temperaturgradient: 20 – 60 °C mit +0,5 °C/min.

Das Säulenmaterial wurde nach dem Reinigungslauf von TE mit dH₂O (2 CV) und mit dem CIP-Puffer (cIEX) (Tab. 2-3, S. 31) in umgekehrter Flussrichtung mit einer Flussrate von 1 mL/min gespült (3 CV). Die CIP-Probe wurde am Peak-Maximum manuell über das Outlet entnommen. Das Chromatogramm sowie das Coomassie-gefärbte Gel nach der SDS-PAGE (2.6.1, S. 39) zur Analyse des Eluats sind in Abb. 3-10, B und D, S. 67 dargestellt.

Die Absorption des Peakmaximums war mit ca. 2750 mAU im Vergleich zu jener des zweiten Elutionspeaks mit ca. 100 mAU (Abb. 3-10, A, S. 67) sehr hoch. Dies belegt, dass ein Großteil an Protein auf dem Chromatographiematerial verblieben ist. Laut Gel der SDS-PAGE Analyse eluierte während des CIP-Protokolls hauptsächlich Vollängen-TE und einige Proteine mit einer molekularen Masse von 25 kDa – 60 kDa (Abb. 3-10, D; Bahn 2, S. 67). Der CIP-Puffer sollte demnach zur Reinigung des Säulenmaterials geeignet sein. Den Resultaten nach war die Konzentration von 150 mM NaCl zu gering, um das Vollängen-TE unter den gewählten Bedingungen vollständig zu eluieren.

3.5.3 Reinigung von TE (IF 2) mittels Kationenaustauschchromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Um die NaCl-Konzentration für eine vollständige Elution des Vollängen-Tropoelastins (TE) bei der Kationenaustauschchromatographie (cIEX) erhöhen zu können, sollte eine Reinigung unter denaturierenden Bedingungen untersucht werden. Harnstoff ist ein chaotrophes Agens, das hydrophobe Interaktionen, vermutlich auch zwischen den hydrophoben Domänen des TE während der Koazervation, verhindern kann. Ein weiterer Vorteil könnte sein, dass aus der Extraktion mit Aceton stammende Lipide/Fettsäuren entfernt werden, die möglicherweise ebenfalls über hydrophobe Wechselwirkungen mit TE interagieren. Zur Untersuchung des Koazervationsverhaltens wurde erneut die Aggregationsoptik genutzt (2.9, S. 44). In diesem Fall wurde die Lichtstreuung mit zunehmender Temperatur von 20 °C – 40 °C gemessen, um die Abhängigkeit der Transitionstemperatur von der Harnstoffkonzentration zu bestimmen. Die Resultate sind in Abb. 3-12 dargestellt.

Als Referenz diente erneut eine Probe ohne Harnstoff und ohne NaCl. Die Lichtstreuung blieb bis zur getesteten Temperatur von 40 °C nahezu konstant bei 95 mAU (Abb. 3-12, schwarz).

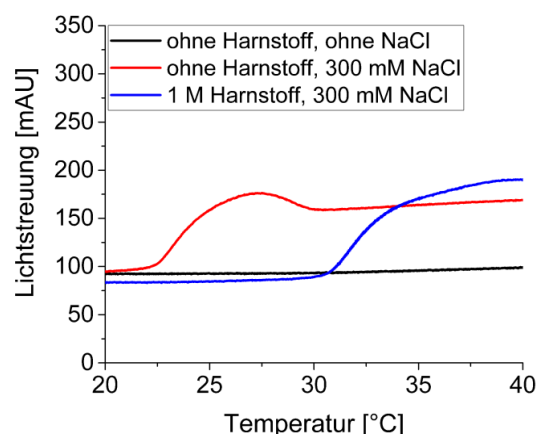


Abb. 3-12 Einfluss von NaCl und 1 M Harnstoff auf das Koazervationsverhalten von TE (IF 2) bei steigender Temperatur. TE-Konzentration: 10 mg/mL in 50 mM HEPES (pH 8,0) (schwarz) bzw. + 300 mM NaCl (rot) bzw. + 300 mM NaCl und 1 M Harnstoff (blau). Temperaturgradient: 20 – 40 °C mit +0,5 °C/min.

Es erfolgte demnach keine Koazervation der TE-Monomere. Der Einfluss der Salzkonzentration auf die Koazervation von TE wurde erneut bei einer Probe ohne Harnstoff und mit 300 mM NaCl nachgewiesen. Eine Erhöhung der Lichtstreuung erfolgte bei der Probe ab einer Temperatur von ca. 21 °C (Abb. 3-12, rot). Bei gleicher NaCl-Konzentration konnte in Anwesenheit von 1 M Harnstoff bei 21 °C keine Koazervation nachgewiesen werden. Die Transitionstemperatur wurde auf ca. 30 °C erhöht (Abb. 3-12, blau). Demnach sollte der Einsatz einer NaCl-Konzentration von bis zu 300 mM zur TE-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen mit 1 M Harnstoff möglich sein.

Um den Einfluss von 1 M Harnstoff während der cIEX (2.11, S. 45) zu untersuchen, wurde die TE-Reinigung unter den gewählten Parametern (3.5.2, S. 66) wiederholt. Binde- und Elutionspuffer enthielten jedoch jeweils 1 M Harnstoff. Die Elution erfolgte über einen linearen Gradienten von 0 – 30 % Elutionspuffer (10 CV), gefolgt von 30 % Elutionspuffer (3 CV). Dies entspricht einer NaCl-Konzentration von bis zu 300 mM. Alle Schritte wurden bei RT (21,6 °C) durchgeführt. Die Chromatogramme des Reinigungslaufes und des CIP-Protokolls sind in Abb. 3-13, A und B dargestellt. Alle Fraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE (2.6.1, S. 39) analysiert. Die Coomassie-gefärbten Gele sind in Abb. 3-13, C dargestellt.

Das TE vor bzw. nach der Filtration (Abb. 3-13, C oben; Bahn 2 und 3) zeigte erneut keinen signifikanten Unterschied in der Bandenintensität. Ein geringer Anteil des TEs wurde jedoch im Retentat nach Filtration der TE-Lösung nachgewiesen (Abb. 3-13, C oben; Bahn 4). Dies spricht für einen sehr geringen TE-Anteil, der auf dem Filter verblieben ist. Im Durchfluss (Abb. 3-13, C oben; Bahn 5) und in der Waschfraktion (Abb. 3-13, C oben; Bahn 6) konnten mit der Coomassie-Färbung keine Proteine nachgewiesen werden. Es kann demnach erneut von einer nahezu vollständigen Bindung des TEs an das Säulenmaterial ausgegangen werden. Der erste Elutionspeak enthielt laut SDS-PAGE Analyse der Fraktion B6 hauptsächlich ein unbekanntes Protein bei einer molekularen Masse von ca. 21 kDa (Abb. 3-13, C oben; Bahn 7). Laut Analyse der Fraktion C2 eluierten im zweiten Elutionspeak Proteine mit einer molekularen Masse von bis zu 60 kDa, sowie das Volllängen-TE (Abb. 3-13, C oben; Bahn 11). In den Fraktionen von C10 bis E6 des Hauptpeaks war das Volllängen-TE vom Großteil unbekannter Proteine abgetrennt (Abb. 3-13, C unten; Bahn 3 – 13). Diese Fraktionen wurden vereinigt. Zur Entfernung von Harnstoff und NaCl wurden die vereinigten Fraktionen gegen einen 10 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 5,0) dialysiert (2.8, S. 43). Die Gesamtverdünnung lag bei 1:10⁶. Der Großteil des Harnstoffes und des NaCl wurden somit entfernt. Die theoretischen Endkonzentrationen lagen bei 1 µM Harnstoff und 0,2 µM NaCl.

Im Chromatogramm während des CIP-Protokolls war nur ein schwacher Absorptionspeak nachweisbar (Abb. 3-13, B). In der Probe der CIP-Fraktion wurde mittels SDS-PAGE Volllängen-TE bei 60 kDa detektiert (Abb. 3-13, C unten; Bahn 14). Demnach konnte während der Elution nur ein sehr geringer Anteil nicht von der Säule eluiert werden. Durch die Peaküberlagerung zwischen dem zweiten Peak und dem Hauptpeak konnte nicht das gesamte Volllängen-TE zur weiteren Aufarbeitung genutzt werden. Die Masse des Lyophilisates nach Gefrier-trocknung (2.8, S. 43) wurde bestimmt. Es ergab sich eine Menge von 152 mg an gereinigtem TE, welche 58,5 % der tatsächlich applizierten Proteinmenge von 260 mg entsprach. Das Lyophilisat war weiß und frei von Verfärbung. Die Reinigung des extrahierten TEs war unter den gewählten Bedingungen somit nahezu vollständig möglich.

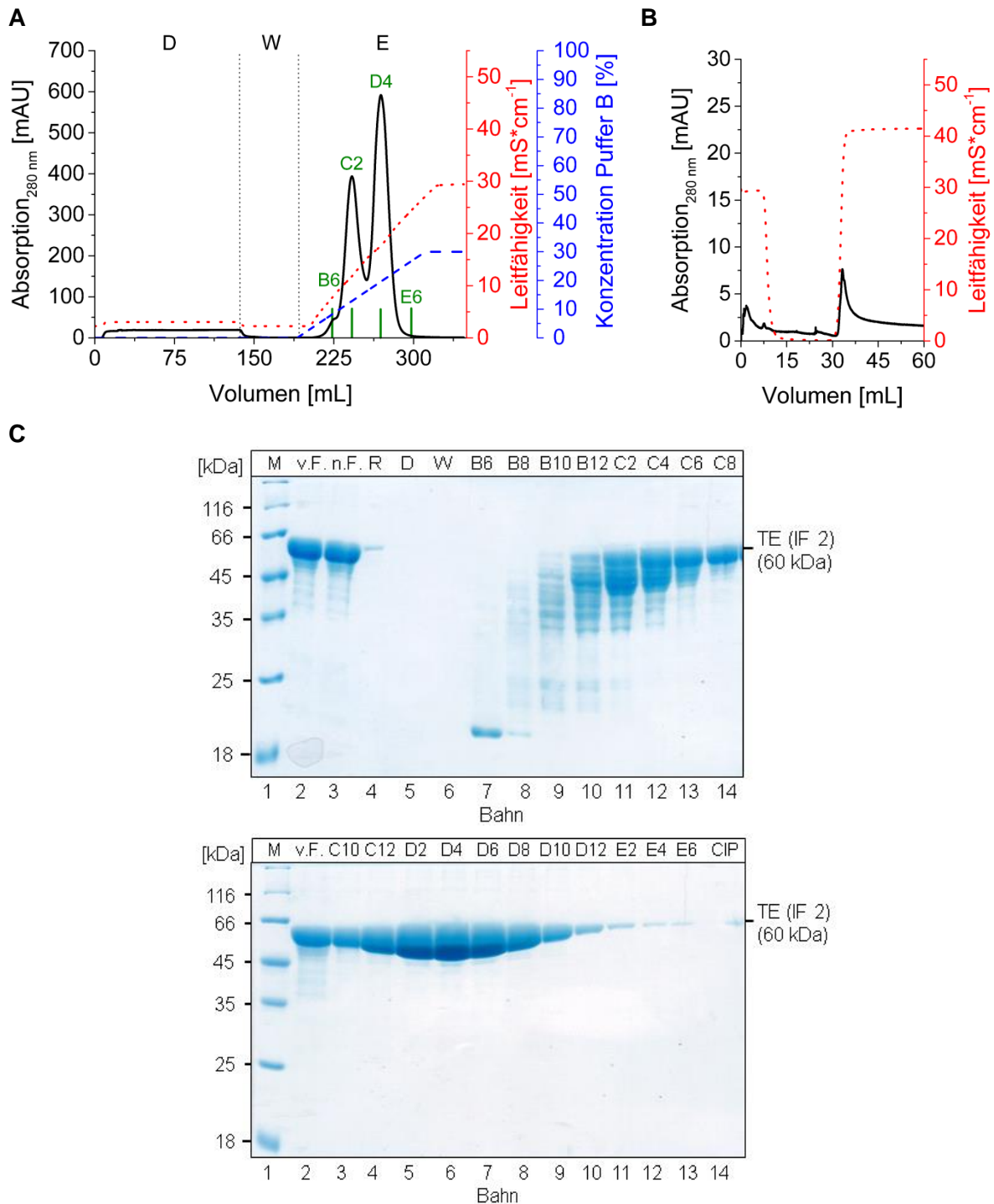


Abb. 3-13 (A) Chromatogramm der cIEX von TE (IF 2) mit Elution von 0 – 300 mM NaCl unter Einfluss von 1 M Harnstoff, (B) Chromatogramm CIP nach cIEX, (C) 12,5 %ige SDS-PAGE der Fraktionen aus cIEX und CIP. XK16/20 mit SP Sepharose FastFlow (CV: 12 mL), Applikation von 260 mg TE in 50 mM HEPES (pH 8,0) [2 mg/mL] mit 2 mL/min, Bindepuffer: 50 mM HEPES (pH 8,0) + 1 M Harnstoff, Elutionspuffer: 50 mM HEPES (pH 8,0) + 1 M NaCl + 1 M Harnstoff, CIP-Puffer: 50 mM HEPES (pH 8,0) + 500 mM NaCl + 3 M Harnstoff. Alle Proben wurden 1:1 mit 2x Probenpuffer versetzt. (C, oben) Bahn 1: Marker [5 μL]; Bahn 2 und 3: TE vor bzw. nach Filtration [je 5 μL]; Bahn 4: Retentat der Filtration [5 μL]; Bahn 5: Durchfluss [15 μL]; Bahn 6: Waschfraktion [15 μL]; Bahn 7 – 14: Elutionsfraktionen B6 – C3 [je 2,5 μL]; (C, unten) Bahn 1: Marker [5 μL]; Bahn 2: TE vor Filtration [5 μL]; Bahn 3 – 13: Elutionsfraktionen C10 – E6 [je 2 μL]; Bahn 14: Probe CIP [15 μL].

Die Proteinreinheit des TEs vor und nach der cIEX wurde mittels SDS-PAGE (2.6.1, S. 39) und Silberfärbung (2.6.2.2, S. 40) qualitativ untersucht. Die gefärbten Gele sind in Abb. 3-14 dargestellt.

Im Vergleich ist zu erkennen, dass der Großteil der anfänglich enthaltenen kontaminierenden Proteine mit einer molekularen Masse von 20 – 60 kDa durch die cIEX abgetrennt wurden. Nach der cIEX wurde hauptsächlich Vollängen-TE detektiert (Abb. 3-14; Bahn 4). Somit konnte die Reinheit des TEs weiter gesteigert werden. Die quantitative Bestimmung der Proteinreinheit erfolgte unter 3.5.4.2, S. 74.

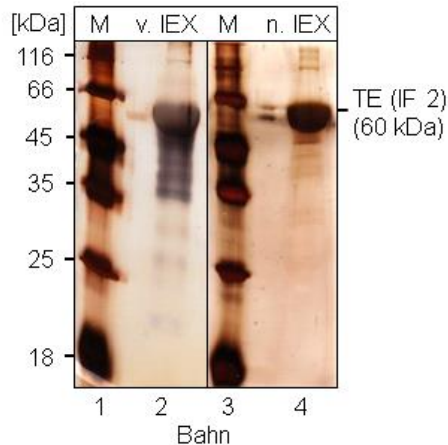


Abb. 3-14 12,5 %ige SDS-PAGE des lyophilisierten TEs vor bzw. nach Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie. Bahn 1 und 3: Marker (5 μ L); Bahn 2: extrahiertes TE vor cIEX; Bahn 4: extrahiertes TE nach cIEX; je ca. 5 μ g Protein; Silberfärbung, je 3 min entwickelt.

3.5.3.1 Einfluss der TE-Beladungsmenge auf das Elutionsverhalten bei der Kationenaustauschchromatographie

Die Bindekapazität des SP Sepharose FastFlow-Materials, das für die TE-Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie (cIEX) verwendet wurde, liegt laut Hersteller für Ribonuklease A bei bis zu 70 mg/mL_{Medium}. Da sich Ribonuklease A in molekularer Masse (13,7 kDa) und isoelektrischem Punkt (pI: 9,6) deutlich von Tropoelastin (IF 2) unterscheidet, ist die Angabe der Bindekapazität nicht übertragbar. Es war daher fraglich, ob eine zu hohe TE-Beladungsmenge von 25 mg/mL_{Säulenvolumen} (3.5.3, S. 69) zu einer Verringerung der Trennleistung geführt hat. Um dies ausschließen zu können, wurde die cIEX mit einem Zehntel der TE-Beladungsmenge (2,5 mg/mL_{Säulenvolumen}) unter sonst gleichen Bedingungen wiederholt. Die Chromatogramme des Reinigungslaufes und des CIP-Protokolls sind in Abb. 3-15, A und B dargestellt. Alle Fraktionen wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE (2.6.1, S. 39) analysiert. Die Coomassie-gefärbten Gele sind in Abb. 3-15, C dargestellt.

Im Chromatogramm des Reinigungslaufes zeigen sich während der Elution zwei Absorptionspeaks mit teilweiser Überlagerung. Das Elutionsprofil ist vergleichbar mit dem Profil bei einer TE-Beladungsmenge von 25 mg/mL_{Säulenvolumen} (Abb. 3-13, A, S. 71). Durch die Reduktion der Proteinkonzentration ist die Absorption bei 280 nm erwartungsgemäß geringer. Das aufgetragene Probenvolumen bei der SDS-PAGE wurde deswegen entsprechend erhöht. Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE zeigte das gleiche Muster an Proteinbanden wie bei dem vorherigen Reinigungslauf (Abb. 3-13, C, S. 71).

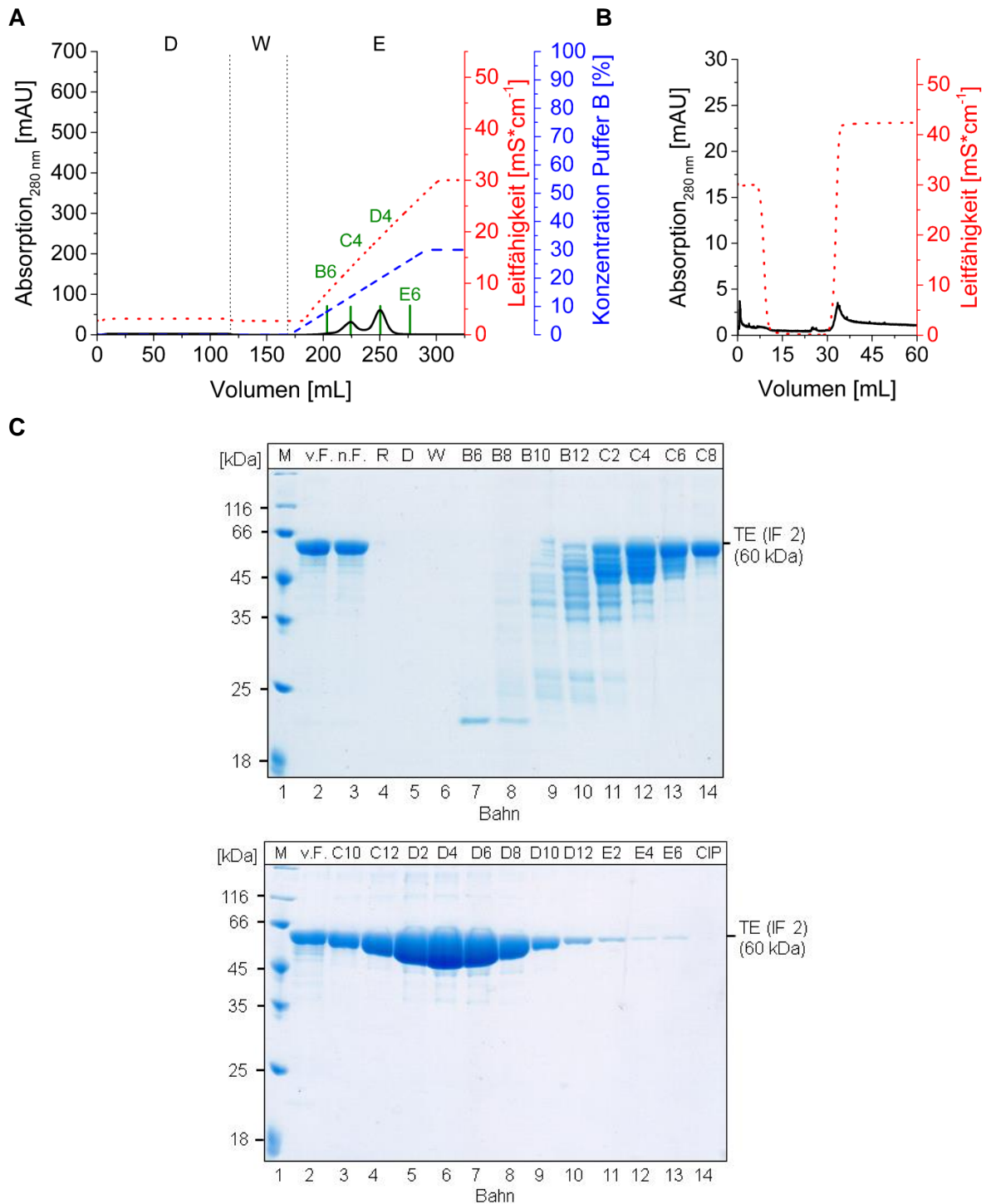


Abb. 3-15 (A) Chromatogramm der cIEX von TE (IF 2) mit reduzierter Beladungsmenge, (B) Chromatogramm CIP nach cIEX, (C) 12,5 %ige SDS-PAGE der Fraktionen aus cIEX und CIP. XK16/20 mit SP Sepharose FastFlow (CV: 12 mL), Applikation von 30 mg TE in 50 mM HEPES (pH 8,0) [0,2 mg/mL] mit 2 mL/min, Bindepuffer: 50 mM HEPES (pH 8,0) + 1 M Harnstoff, Elutionspuffer: 50 mM HEPES (pH 8,0) + 1 M NaCl + 1 M Harnstoff, CIP-Puffer: 50 mM HEPES (pH 8,0) + 500 mM NaCl + 3 M Harnstoff. Alle Proben wurden 4:1 mit 5x Probenpuffer versetzt. (C, oben) Bahn 1: Marker [5 µL]; Bahn 2 und 3: TE vor bzw. nach Filtration [je 15 µL]; Bahn 4: Retentat nach Filtration [1,5 µL]; Bahn 5: Durchfluss [15 µL]; Bahn 6: Waschfraktion [15 µL]; Bahn 7 – 14: Elutionsfraktionen B6 – C8 [je 15 µL]; (C, unten) Bahn 1: Marker [5 µL]; Bahn 2: TE vor Filtration [15 µL]; Bahn 3 – 13: Elutionsfraktionen C10 – E6 [je 15 µL]; Bahn 14: Probe CIP [15 µL].

Das Volllängen-TE in den Fraktionen C10 bis E6 (Abb. 3-15, C unten; Bahn 3 – 13) konnte zum Großteil von den anderen Proteinen in den Fraktionen B6 bis C8 (Abb. 3-15, C oben; Bahn 7 – 14) abgetrennt werden. Durch die Peaküberlagerung konnte nicht das gesamte Volllängen-TE gewonnen werden. Laut Absorptionsmessung und SDS-PAGE Analyse der CIP-Probe war kein Protein in der CIP-Fraktion nachweisbar (Abb. 3-15, C unten; Bahn 14). Demnach konnte das TE vollständig vom Säulenmaterial eluiert werden. Das Elutionsverhalten zeigte keine Unterschiede im Bezug auf eine TE-Beladungsmenge von 2,5 mg/mL_{Säulenvolumen} (30 mg) bzw. 25 mg/mL_{Säulenvolumen} (300 mg). Die Ergebnisse belegen, dass die Trennleistung mit beiden Beladungsmengen vergleichbar war. Es ist daher in diesem Bereich von keiner Verringerung der Trennleistung auszugehen.

3.5.4 Charakterisierung des gereinigten Tropoelastins

3.5.4.1 Löslichkeitstest und Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Löslichkeit des lyophilisierten Tropoelastins (TE) nach Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie (cIEX) (3.5.3, S. 69) wurde untersucht. Der Löslichkeitstest wurde, wie unter 2.9, S. 44 beschrieben, durchgeführt. Das Lyophilisat wurde in diesem Fall in dH₂O in einer Konzentration von 5 mg/mL und 50 mg/mL gelöst. Die Lösungen waren bei RT klar und farblos.

Um zu prüfen, ob eine Differenz zwischen theoretischer und gemessener Proteinkonzentration einer TE-Lösung nach Einwaage des Lyophilisats besteht, sollte testweise die Proteinkonzentration (theoretisch: 1 mg/mL) bestimmt werden. Die Absorptionsmessung sowie die Berechnung der TE-Konzentration über das Lambert-Beer-Gesetz sind unter 2.12.3.2, S. 47 beschrieben. Das resultierende UV-Vis Spektrum der Absorptionsmessung ist im Anhang (Abb. 8-5, S. 116) dargestellt. Die gemessene Proteinkonzentration von 1,02 mg/mL stimmte mit der erwarteten, theoretischen Proteinkonzentration sehr gut überein. Die Abweichung lag bei 2 % und war somit sehr gering. Demnach ist die spektrophotometrische Methode zur Bestimmung der TE-Konzentration geeignet und die Herstellung einer TE-Lösung kann gravimetrisch durch Einwiegen des Lyophilisates erfolgen.

3.5.4.2 Bestimmung der Proteinreinheit und Identifikation der Nebenprodukte

Die Bestimmung der Proteinreinheit des Tropoelastins (TE) vor und nach der Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie (cIEX) erfolgte wie unter 2.14.1, S. 49 beschrieben. Die entsprechenden Chromatogramme Analyse mittels Flüssigchromatographie sind in Abb. 3-16 dargestellt.

Bei der TE-Probe vor der cIEX war ein Nebenpeak bei einer Retentionszeit ab ca. 14,1 min detektierbar (Peakmaximum: 14,53 min). Das Maximum des Hauptpeaks lag bei einer Retentionszeit von 14,87 min. Bei der TE-Probe nach der cIEX waren ein Hauptpeak bei nahezu gleicher Retentionszeit von 14,85 min und ein kleiner Peak bei 14,46 min detektierbar. Demnach muss es sich bei dem Hauptpeak um das Volllängen-TE handeln. Die Nebenprodukte mit einer Retentionszeit von 14,1 min bis 14,7 min konnten durch die cIEX fast vollständig abgetrennt werden. Eine vollständige Trennung von TE und den Nebenprodukten war aufgrund der Peaküberlagerung allerdings nicht möglich (3.5.3, S. 69). Mit der Software wurde die Proteinreinheit anhand der Verhältnisse der Peakflächen bestimmt. Die

Proteinreinheit des Vollängen-TEs vor der cIEX lag bei 87,6 % und konnte durch die cIEX auf 99,4 % erhöht werden. Die Peakfläche der Nebenprodukte wurde von 12,4 % auf 0,55 % reduziert. Die Peaks bis zu 3 min („Totzeit“) können durch unterschiedliche Lösungsmittel oder das Schalten des Injektionsventils entstehen. Bei der Integration der Peakflächen zur Bestimmung der TE-Proteinreinheit wurden diese daher nicht einbezogen.

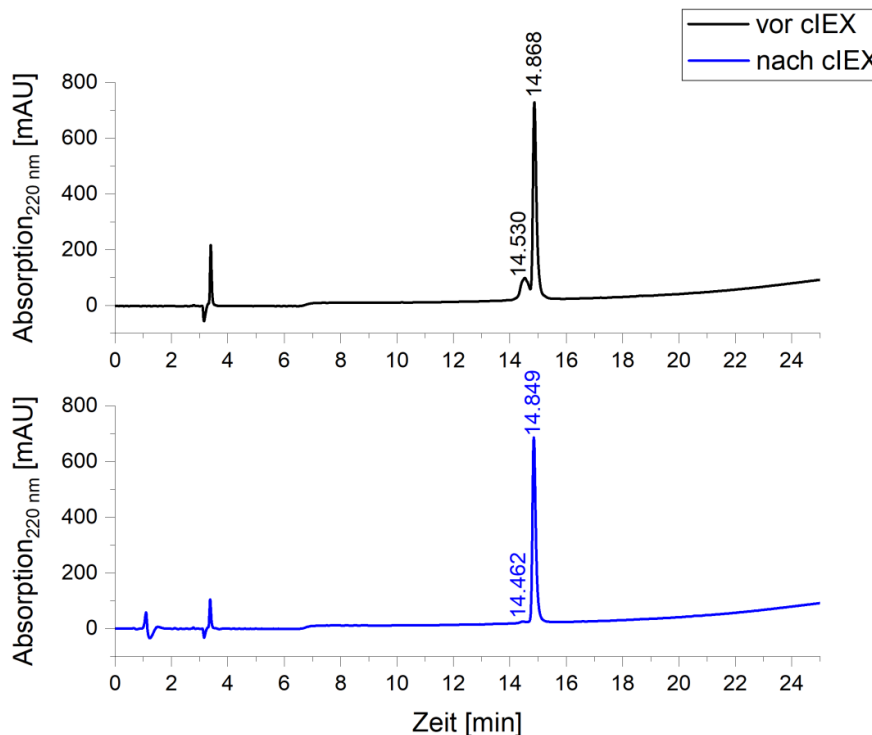


Abb. 3-16 LC-Chromatogramm der Trennung der Proteine von TE (IF 2) vor bzw. nach Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie. TE (IF 2) nach Extraktion und Aufarbeitung vor cIEX (schwarz); TE (IF 2) nach cIEX (blau). Säule: Vydac Proteine & peptide C18. Lösungsmittel A: 0,1 % TFA/H₂O; Lösungsmittel B: 0,1 % TFA/ACN. Flussrate: 1 mL/min. Isokratisch mit 5 % B für 3 min, gefolgt von Eutionsgradienten bis 100 % B in 22 min [Methode Dr. Malešević, AG Pietzsch].

Um die Nebenprodukte identifizieren zu können, wurde eine Fraktion des Nebenpeaks im Bereich von 14,1 min bis 14,5 min separat aufgefangen. Es erfolgten die Spaltung mit Trypsin bzw. Pankreaselastase sowie die Analyse mittels nanoESI-QTOF MS, um die Peptide zu identifizieren (2.14.2.2, S. 50).

In Abb. 3-17 ist das Alignment der resultierenden Peptide (blau) mit der AS-Sequenz des TEs (IF 2, ohne Signalpeptid) dargestellt. Diese decken einen Großteil der Sequenz ab (Sequenzabdeckung: 70 %). Es wurden sowohl Peptide des N-terminalen als auch des C-terminalen Bereiches detektiert. Ein Datenbankabgleich der Peptidsequenzen gegen das Proteom von *E. coli* (Swiss-Prot Datenbank) führte zu keinen signifikanten Treffern. Demnach handelt es sich bei den abgetrennten Nebenprodukten nicht um *E. coli*-Wirtszellproteine, sondern um TE-Fragmente.

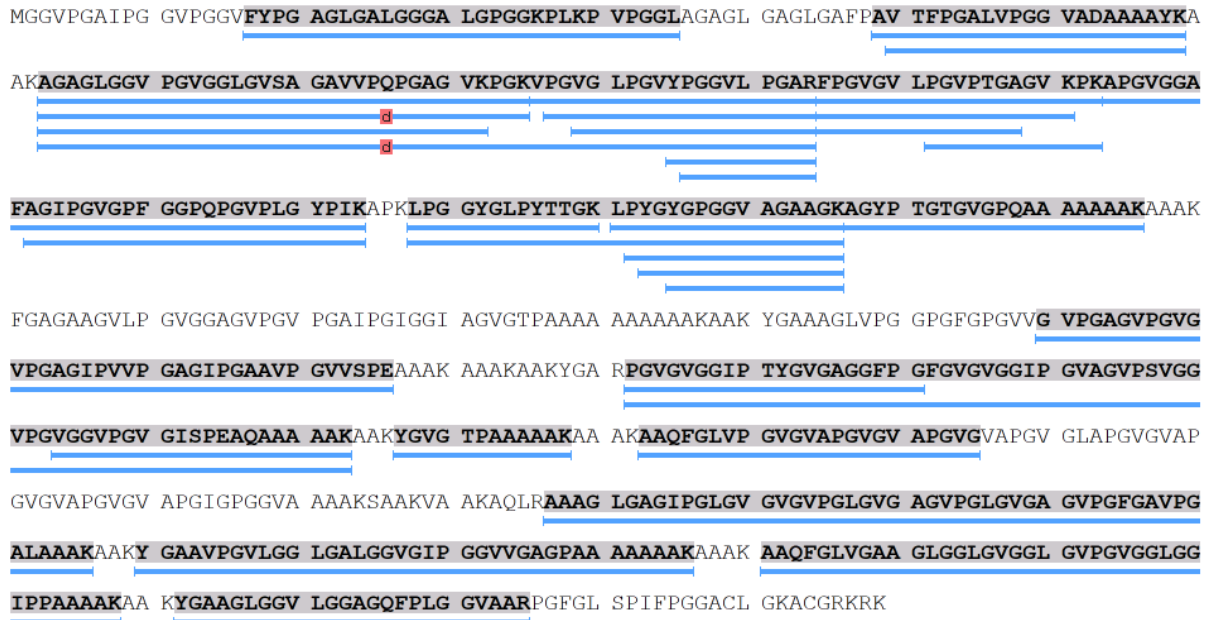


Abb. 3-17 Alignment der resultierenden Peptide nach Verdau der mittels LC abgetrennten Nebenprodukte einer TE-Probe vor der Kationenaustauschchromatographie. Die gepoolten Nebenprodukte (14,1 –14,5 min) wurden mittels Trypsin bzw. Pankreaselastase gespalten. Die Analyse erfolgte mittels ESI-MS (Orbitrap Q Exactive Plus). Die mit der Sequenz TE (IF 2, ohne Signalpeptid) übereinstimmenden Peptide sind als blaue Balken dargestellt. Die entsprechenden Aminosäuren sind grau hinterlegt. Sequenzabdeckung: 70 %. (d, rot) Deamidierung ($m/z +0,98$) [Analyse durchgeführt von T. Hedtke, Fraunhofer IMWS].

3.6 *In vitro* Prolyl-4-Hydroxylierung von Tropoelastin

In nativem, humanem Tropoelastin (TE, Isoform 2) sind ca. 24 % aller Prolyl-Reste partiell hydroxyliert [Schmelzer et al., 2016]. Der Hydroxylierungsgrad in TE (IF 2) der menschlichen Haut liegt bei ca. 10 % aller Prolyl-Reste [Hedtke et al., 2019]. Das nächste Ziel in der vorliegenden Arbeit, nach erfolgreicher Produktion und Reinigung des TEs (IF 2), war das Einbringen der Prolyl-4-Hydroxylierung. Als Kandidat für die *in vitro* Hydroxylierung von rekombinanten TE sollte die virale Prolyl-4-Hydroxylase aus *Paramecium bursaria* Chlorella Virus-1 (cvP4H) untersucht werden. Eine N-terminal verkürzte Enzymvariante (AS 36 – 242, ohne N-terminale Transmembrandomäne) wurde bereits erfolgreich rekombinant produziert und z.T. enzymkinetisch charakterisiert [Eriksson et al., 1999]. Weiterhin wurde die Kristallstruktur des Enzyms aufgeklärt [Longbotham et al., 2015]. Mit der cvP4H war es möglich, humanes Kollagen durch Coexpression in *E. coli* zu hydroxylieren und so einen ähnlichen Hydroxylierungsgrad wie in nativem Kollagen zu erzeugen [Shi et al., 2017].

Zunächst sollte die cvP4H in *E. coli* überproduziert und aus der gewonnenen Biofeuchtmasse gereinigt werden. Angestrebt wurde eine *in vitro* Hydroxylierung des TEs, da bei dieser Methode, im Gegensatz zur Coexpression, Enzym- und Substratkonzentrationen definiert und variiert werden können. Zum indirekten Nachweis der Hydroxylierungsreaktion sollte die Messung des O_2 -Verbrauches etabliert werden. Der direkte Nachweis des 4-Hydroxyprolins sowie die Positionsbestimmung der modifizierten Prolyl-Reste im TE-Molekül sollten anschließend massenspektrometrisch erfolgen.

3.6.1 Produktion der His₁₀-cvP4H im Schüttelkolbenmaßstab

Die Produktion der viralen Prolyl-4-Hydroxylase aus *Paramecium bursaria* Chlorella Virus-1 (cvP4H) erfolgte im Überproduktionsstamm *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pET-16b_cvP4H. Im Gegensatz zum von Eriksson und Kollegen verwendeten pET-15b codiert der Vektor pET-16b für einen N-terminalen His₁₀-tag anstatt eines His₆-tags [Eriksson et al., 1999]. Dadurch sollte eine höhere Bindungsaffinität zu dem Chromatographiematerial erreicht werden. Als Selektionsmarker diente, wie bei Eriksson und Kollegen, die vektorcodierte Ampicillin-Resistenz. Die entsprechende Plasmidkarte ist im Anhang unter Abb. 8-9, S. 121 abgebildet. Es ist nicht bekannt, ob Eriksson und Kollegen eine Anpassung der Codon-Nutzung für *E. coli* durchführten. In Vorversuchen zur vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Produktion der His₁₀-cvP4H mit und ohne codon-optimierter DNA-Sequenz getestet. Die Anpassung der Codon-Nutzung für *E. coli* erfolgte durch den Gensyntheseanbieter (2.5.2.2, S. 37). Bei dem Konstrukt mit optimierter DNA-Sequenz, wurden neben der His₁₀-cvP4H zwei unbekannte Proteine mit einer geringeren molekularen Masse als die His₁₀-cvP4H produziert (Daten nicht gezeigt). Da dies mit der ursprünglichen DNA-Sequenz nicht der Fall war, wurde in der vorliegenden Arbeit die DNA-Sequenz ohne Anpassung der Codon-Nutzung verwendet (s. Anhang, Abb. 8-8, S. 121). Die Aminosäuresequenz der His₁₀-cvP4H ist im Anhang in Abb. 8-10, S. 122 aufgeführt. Die Kultivierungsbedingungen zur Überproduktion der His₁₀-cvP4H wurden, soweit angegeben, nach Eriksson und Kollegen durchgeführt. Die Vor- und Hauptkultur wurden, wie unter 2.5.2.2, S. 37 beschrieben, angefertigt. Zum Induktionszeitpunkt bzw. alle 30 min nach Induktion wurden von beiden Kulturen 1/OD-Proben entnommen und diese mittels SDS-PAGE (2.6.1, S. 39) analysiert. Die Wachstumskurven der induzierten und der nicht induzierten Kultur sowie das Coomassie-gefärbte Gel sind in Abb. 3-18 dargestellt.

Die Zellen der induzierten Kultur zeigten nach Induktion im Vergleich ein leicht verlangsamtes Wachstum, was eine metabolische Last durch die Proteinproduktion vermuten lässt (Abb. 3-18, A). In Übereinstimmung damit konnte ab 1 h nach Induktion eine Proteinbande bei ca. 26,6 kDa nachgewiesen werden, deren Intensität während der Induktionsphase zunimmt (Abb. 3-18, B; Bahn 3 – 5). Dies entspricht der theoretischen molekularen Masse der His₁₀-cvP4H. Die Produktion der His₁₀-cvP4H in *E. coli* im Schüttelkolbenmaßstab war demnach erfolgreich. Zellen der nicht induzierten Kultur zeigten bis zur Kultivierungsdauer von 4,25 h erwartungsgemäß kein stagnierendes Wachstum (Abb. 3-18, A) und keine Produktion der His₁₀-cvP4H (Abb. 3-18, B; Bahn 6 – 8). Danach stagnierte das Wachstum allerdings und in der SDS-PAGE konnte eine Proteinbande bei ca. 26,6 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3-18, B; Bahn 9). Dies deutet auf eine geringe Produktion der His₁₀-cvP4H hin, vermutlich verursacht durch unvollständige Repression des T7-Promoters oder durch induktorähnliche Stoffe im LB-Medium [Studier, 2018].

Die segregative Plasmidstabilität in der induzierten Kultur wurde zu zwei Zeitpunkten untersucht (2.5.4, S. 39). Zum Induktionszeitpunkt lag diese bei 100 % und 2 h nach Induktion bei 67 %. Dies deutet auf einen Plasmidverlust und somit auf einen steigenden Anteil an plasmidfreien Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer hin.

Unter den gleichen Bedingungen wurde Biofeuchtmasse (BFM) zur Reinigung der His₁₀-cvP4H produziert (2.5.2.2, S. 37). Die generierte Menge an BFM lag bei 3,0 g/L_{Kulturvolumen}.

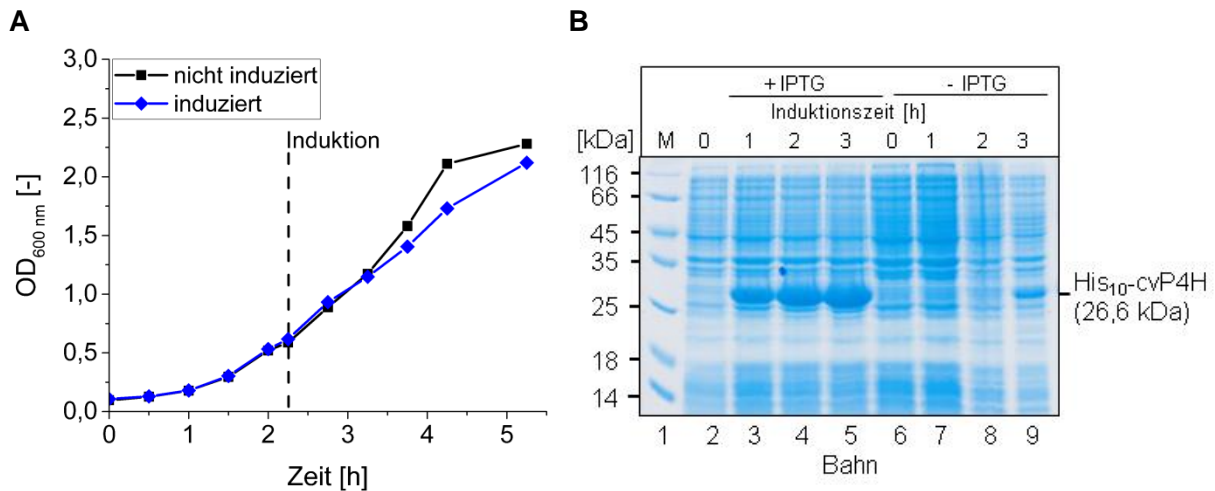


Abb. 3-18 (A) Wachstumskurve *E. coli* BL21-Gold(DE3) + pET-16b_cvP4H, (B) zeitlicher Verlauf der Überproduktion von His₁₀-cvP4H. Die Kultivierung erfolgte in je 500 mL LB-Medium + 100 µg/mL Ampicillin bei 37 °C und 80 rpm ausgehend von einer OD₆₀₀ von 0,1. Angegeben sind die Mittelwerte der optischen Dichte nach Doppelbestimmung gegen LB-Medium als Blank. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Proteinüberproduktion bei einer Kultur mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert (blau). Beide Kulturen wurden auf 28 °C gekühlt und bei 28 °C für 3 h inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 1/OD-Proben angelegt, die Zellen in 50 µL Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 99 °C erhitzt. Bahn 1: Marker (5 µL); Bahn 2: 0 h, Kultur vor IPTG-Zugabe; Bahn 3 – 5: 1 h bis 3 h nach IPTG-Zugabe; Bahn 6 – 9: 0 h bis 3 h ohne IPTG-Zugabe; je 10 µL Probe.

3.6.2 Reinigung der His₁₀-cvP4H

Die Reinigung der viralen Prolyl-4-Hydroxylase sollte mit Hilfe des N-terminal fusionierten His₁₀-tags erfolgen. Der Zellaufschluss, die Fraktionierung und die Reinigung der His₁₀-cvP4H mittels Nickel-Affinitätschromatographie sind unter 2.12.1, S. 45 beschrieben. Die Chromatogramme der Nickel-Affinitätschromatographie und der anschließenden Reinigung des Chromatographiematerials (*cleaning in place*, CIP) sind in Abb. 3-19, A und B dargestellt. Das gefärbte SDS-PAGE Gel (2.6.1, S. 39) und die Nitrocellulosemembran nach Western-Blot und Antikörpernachweis (2.6.3, S. 41) zur Analyse der Fraktionen sind in Abb. 3-19, C und D abgebildet.

Im Zellysate konnte eine intensive Proteinbande bei ca. 26 kDa sowohl durch Coomassie-Färbung (Abb. 3-19, C; Bahn 2) als auch durch immunologische Detektion mittels Anti-Polyhistidin Antikörper (Abb. 3-19, D; Bahn 2) nachgewiesen werden. Die theoretische molekulare Masse des Zielenzym beträgt 26,6 kDa. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei der nachgewiesenen Bande um die His₁₀-cvP4H handelt. Der Vergleich zwischen unlöslicher und löslicher Fraktion zeigt, dass der Großteil der His₁₀-cvP4H unlöslich vorlag (Abb. 3-19, C bzw. D; Bahn 3 und 4). Für eine Aufarbeitung wurde der lösliche Anteil an His₁₀-cvP4H in Betracht gezogen. Während der Auftragung der löslichen Fraktion auf die Chromatographiesäule wurde im Durchfluss eine sehr hohe Absorption_{280 nm} von über 4 000 mAU gemessen (Abb. 3-19, A; Phase „D“). Erwartungsgemäß handelte es sich dabei um Wirtszellproteine (Abb. 3-19, C; Bahn 5). In dieser Probe war keine His₁₀-cvP4H mittels Immunodetektion nachweisbar (Abb. 3-19, D; Bahn 5). Somit hat das Zielprotein vollständig am Chromatographiematerial gebunden. Während der Waschphase sank die Absorption_{280 nm} nahezu bis zur Baseline (Abb. 3-19, A; Phase „W“). Durch den Verdünnungseffekt konnten keine Proteine in

der Waschfraktion detektiert werden (Abb. 3-19, C bzw. D; Bahn 6). In der Elutionsphase wurde ein Peak in den Fraktionen A7 bis B9 detektiert (Abb. 3-19, A; Phase „E“). Mittels SDS-PAGE Analyse wurde in diesen Fraktionen hauptsächlich ein Protein bei 26,6 kDa detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Fraktionen A7 bis B9 wurden vereinigt, konzentriert und die Imidazolkonzentration durch einen Pufferwechsel (2.12.2, S. 46) bis auf ca. 35 μM reduziert. Das konzentrierte Protein konnte mittels Immundetektion spezifisch bei der erwarteten molekularen Masse der His₁₀-cvP4H von 26,6 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3-19, D; Bahn 7). Mittels Bradford-Assay (2.12.3, S. 46) wurde eine Proteinkonzentration von 4,5 mg/mL bestimmt. Dies entspricht 4,7 mg/g_{BFM} bzw. 18 mg/L_{Kulturvolumen}.

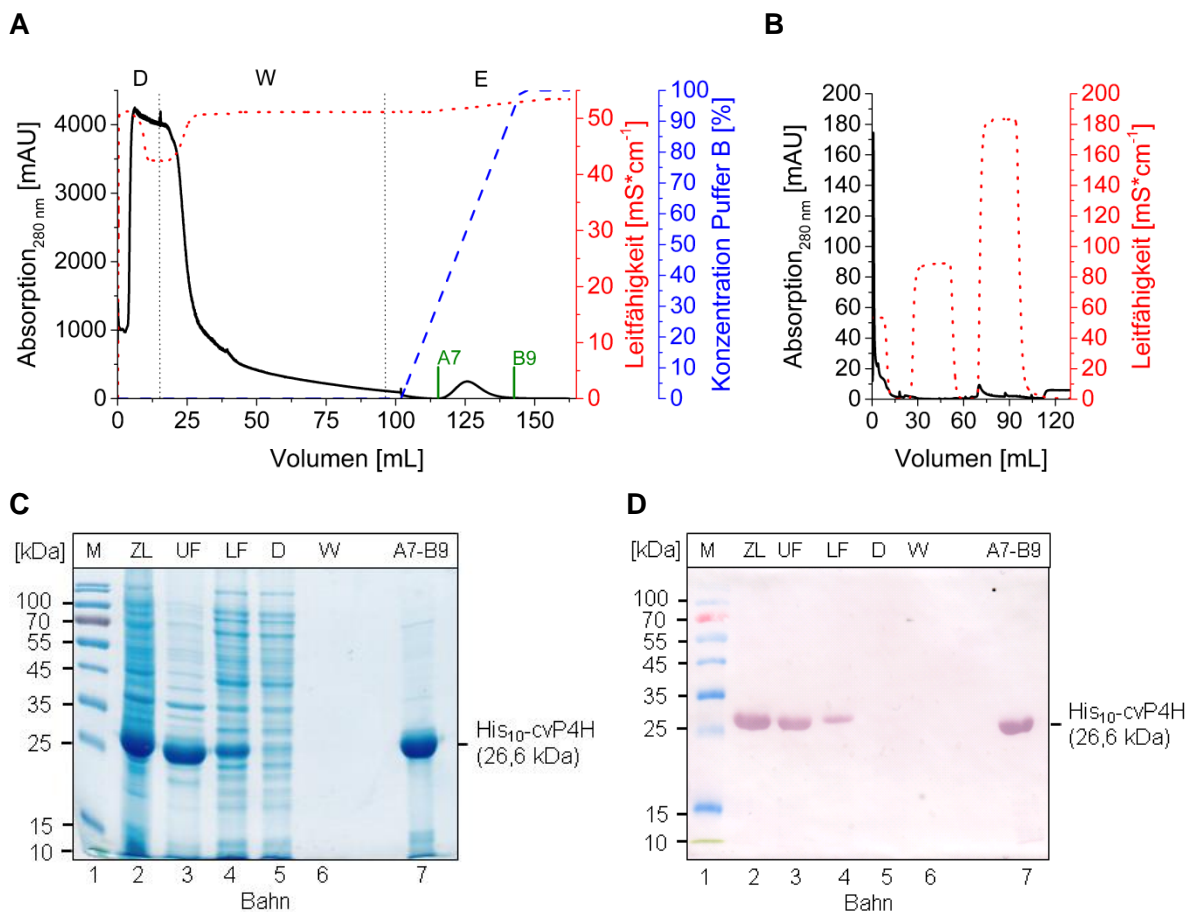


Abb. 3-19 (A) Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie zur Reinigung der His₁₀-cvP4H, (B) Chromatogramm CIP, (C) 12,5 %ige SDS-PAGE zur Analyse der Fraktionen, (D) NCM des Immunoblots nach SDS-PAGE der Fraktionen. XK16/20 mit Nickel Sepharose Excel (CV: 8,6 mL), Applikation der löslichen Fraktion (V = 15 mL) mit 3 mL/min, Puffer A: 20 mM Tris/HCl (pH 7,9) + 500 mM NaCl + 20 mM Imidazol, Puffer B: 20 mM Tris/HCl (pH 7,9) + 500 mM NaCl + 500 mM Imidazol, CIP: dH₂O (2 CV), 1 M NaCl (3 CV), dH₂O (2 CV), 1 M NaOH (3 CV), dH₂O (2 CV), 20 % Ethanol (3 CV). Alle Proben wurden 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 99 °C inkubiert. Bahn 1: Marker [5 μL]; Bahn 2: Zelllysat (ZL) [5 μL], Bahn 3: unlösliche Fraktion (UF) nach Resuspendieren im Volumen der löslichen Fraktion [5 μL]; Bahn 4: lösliche Fraktion (LF) [5 μL]; Bahn 5: Durchfluss (D) [5 μL]; Bahn 6: Waschfraktion (W) [15 μL]; Bahn 7: Pool der Elutionsfraktionen (E) nach Konzentrieren und Pufferwechsel (9 μg). Bei der SDS-PAGE für den Immunoblot wurde jeweils die Hälfte des Probenvolumens aufgetragen. Primär: Anti-Polyhistidin-AK produziert in Maus [1:1 000]; sekundär: Anti-Mouse IgG-Alkaline Phosphatase AK produziert in Ziege [1:10 000].

Wie im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gel zu sehen ist, war die His₁₀-cvP4H nicht vollständig „bandenrein“ (Abb. 3-19, C; Bahn 7). Es zeigten sich schwache Banden proteinogener Verunreinigungen bei verschiedenen molekularen Massen. Die Proteinreinheit der His₁₀-cvP4H wurde für weiterführende Experimente dennoch als ausreichend betrachtet. Während des CIP-Protokolls zur Reinigung des Chromatographiematerials wurden nur einzelne, schwache Absorptionssignale detektiert, weshalb von einer vollständigen Elution der His₁₀-cvP4H ausgegangen werden kann (Abb. 3-19, B). Die Reinigung der viralen Prolyl-4-Hydroxylase His₁₀-cvP4H war somit erfolgreich. Eine Optimierung zur Steigerung der Ausbeute war aufgrund der für die Versuche geplanten ausreichenden Enzymmenge nicht notwendig.

3.6.3 *In vitro* Hydroxylierung

Nach erfolgreicher Aufarbeitung des Tropoelastins (TE) und der viralen Prolyl-4-Hydroxylase (cvP4H) sollte die *in vitro* Hydroxylierung des TEs durchgeführt werden. Eine Möglichkeit die Reaktion zu verfolgen, ist die kontinuierliche Messung der Veränderung der O₂-Konzentration im Reaktionsansatz. Durch den Einbau eines Sauerstoffatoms in den Prolyl-Rest des Peptidsubstrates unter gleichzeitiger Decarboxylierung des 2-Oxoglutarates (2-OG) wird Sauerstoff während der Reaktion verbraucht (Abb. 1-4, S. 19). Die Methode zur Messung der O₂-Konzentration sowie die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes sind unter 2.13, S. 47 beschrieben. Die anfängliche O₂-Konzentration zu Beginn der Reaktion wurde zwischen 220 – 250 nmol/mL bestimmt. Der jeweilige Startwert wurde auf 100 % relative O₂-Konzentration festgelegt. Der pH-Wert im Reaktionsansatz (37 °C) betrug nach Zugabe aller Komponenten ca. 7,0. Die Messungen wurden als Triplikate durchgeführt. Der O₂-Verbrauch, die maximale O₂-Verbrauchsrate als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit sowie die spezifische Enzymaktivität sind in Tab. 3-2, S. 83 aufgeführt.

Die Enzymfamilie der Fe²⁺-/2-OG-abhängigen Dioxygenasen katalysiert neben der Zielreaktion auch die ungekoppelte Reaktion, bei der 2-OG decarboxyliert wird (Abb. 1-4, S. 19). Dabei findet keine Hydroxylierung von Prolyl-Resten statt. Um den O₂-Verbrauch während dieser Katalyse zu bestimmen, wurden Reaktionen ohne Peptidsubstrat durchgeführt (Abb. 3-20, A, schwarz). Der relative O₂-Verbrauch nach 10 min war $5,0 \pm 1,3$ % ($10,4 \pm 0,8$ μM, n = 3) bzw. nach 30 min bei $8,2 \pm 2,2$ % ($16,8 \pm 1,2$ μM, n = 3). Die Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte über den Anstieg im linearen Bereich der Progresskurven im Intervall von $\Delta t = 2$ min (Abb. 3-20, A). Für die initiale Reaktionsgeschwindigkeit wurden $1,25 \pm 0,061$ nmol·mL⁻¹·min⁻¹ bestimmt. Die spezifische Aktivität für die ungekoppelte Reaktion ergab einen Wert von 0,0125 U/mg.

Die Aktivität der gereinigten His₁₀-cvP4H wurde zunächst mit dem synthetischen Peptid (PAPK)₅ untersucht. Diese Aminosäuresequenz stellt das Motiv des natürlichen Substrates der cvP4H dar (K_M : 50 μM) [Eriksson et al., 1999]. Als finale Substratkonzentration wurden $12,5$ μM (PAPK)₅ ($\frac{K_M}{4}$) eingesetzt (Abb. 3-20, A), da die O₂-Konzentration im Reaktionsmedium unter Luftausschluss limitiert war. Die Reaktionen wurden demnach nicht unter (PAPK)₅-Substratsättigung durchgeführt. Es wurde bereits gezeigt, dass das Enzym terminale Prolyl-Reste nicht hydroxyliert [Eriksson et al., 1999; Longbotham et al., 2015]. Eine anfängliche O₂-Konzentration von 220 – 250 μM sollte somit theoretisch für einen vollständigen Umsatz von 100 μM Prolyl-Resten ausreichend sein. Bei allen Reaktionsansätzen sank die O₂-

Konzentration sofort nach Zugabe des 2-OG und blieb jeweils nach ca. 10 min nahezu konstant. Der relative O₂-Verbrauch wurde mit $18,4 \pm 3,2 \%$ ($42,5 \pm 6,8 \mu\text{M}$, $n = 3$) bestimmt. Für die initiale Reaktionsgeschwindigkeit im Intervall von $\Delta t = 1 \text{ min}$ (Abb. 3-20, A) wurden $13,8 \pm 1,61 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ bestimmt. Nach Abzug der ungekoppelten Reaktion ($0,0125 \text{ U/mg}$) ergab sich eine spezifische Aktivität von $0,126 \text{ U/mg}$. Der Wert ist um Faktor 10 höher als bei den Reaktionen ohne Peptidsubstrat. Dies lässt auf eine Hydroxylierung des synthetischen Peptides (PAPK)₅ durch die His₁₀-cvP4H schließen. Die gereinigte His₁₀-cvP4H war demnach unter den gewählten Reaktionsbedingungen aktiv.

Für die *in vitro* Hydroxylierung des TEs wurde das gereinigte TE (IF 2) (3.5.3, S. 69) als Proteinsubstrat eingesetzt. Die Progresskurven sind in Abb. 3-20, B dargestellt. Der Gesamtsauerstoffverbrauch nach 30 min Reaktionszeit ergab $18,6 \pm 4,8 \%$ ($39,6 \pm 14,1 \mu\text{M}$, $n = 3$). Der Wert ist im Vergleich zur Blindreaktion ohne Peptidsubstrat ($8,2 \pm 2,2 \%$) um Faktor 2,3 höher, sodass eine enzymatische Hydroxylierung des TE (IF 2) angenommen werden kann. Für die initiale Reaktionsgeschwindigkeit im Intervall von $\Delta t = 1 \text{ min}$ (Abb. 3-20, B) wurden $3,0 \pm 1,61 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ bestimmt. Daraus ergibt sich nach Abzug der Blindreaktion ($0,0125 \text{ U/mg}$) eine spezifische Aktivität von $0,018 \text{ U/mg}$. Dieser Wert ist um den Faktor 1,4 größer als der Wert für die Blindreaktion, was die Vermutung der TE-Hydroxylierung bestätigt. Insgesamt zeigte sich jedoch, dass die drei Progresskurven unterschiedliche Verläufe haben (Abb. 3-20, B). Im Verlauf der Progresskurve der Reaktion 2 (Abb. 3-20, B, rot) zeigte sich ein für Enzymreaktionen inhomogener Verlauf zwischen 20 – 22 min, in welchem unerwartet viel Sauerstoff verbraucht wurde.

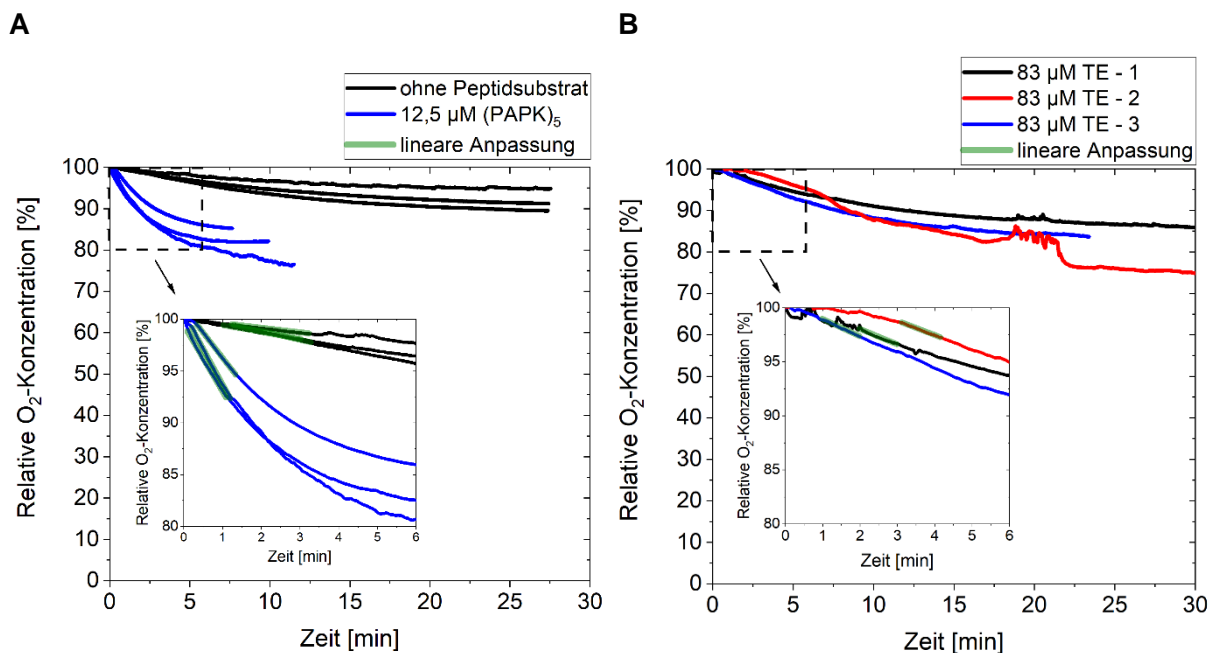


Abb. 3-20 Relative O₂-Konzentration während der *in vitro* Hydroxylierung mit His₁₀-cvP4H bei 37 °C. 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,16 mM L-Ascorbinsäure, 0,5 mM 2-OG, 1 μM (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, 4 μM His₁₀-cvP4H (0,1 mg/mL). (A) ohne Peptidsubstrat (schwarz) bzw. 12,5 μM (PAPK)₅ (blau). (B) 83 μM TE (IF 2) (5,0 mg/mL) ($n = 3$) mit Reaktion 1 (schwarz), Reaktion 2 (rot), Reaktion 3 (blau). Inset-Zoom mit linearer Anpassung (grün) zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit. Reaktionsstart durch Zugabe von 2-OG bei $t = 0$. Reaktionsvolumen: 1 mL.

Ein Grund für die mangelnde Reproduzierbarkeit und den inhomogenen Verlauf der Progresskurven könnten Sekundärstrukturen des TEs sein (Abb. 1-3, S. 13), sodass die Zugänglichkeit der Prolyl-Reste für die cvP4H möglicherweise gering war oder sich im Reaktionszeitraum veränderte. Diese Hypothese sollte in einem Folgeexperiment überprüft werden. Durch das Lösen des TEs in Puffer mit 1 M Harnstoff vor der Reaktion sollte untersucht werden, ob durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelte Sekundärstrukturen aufgelöst und der Anteil an lösungsmittel-exponierten Prolyl-Resten erhöht werden kann. Die Harnstoffbehandlung des TEs vor der Hydroxylierungsreaktion ist unter Kapitel 2.13, S. 47 beschrieben. Die theoretische Endkonzentration im Reaktionsansatz lag bei 50 mM Harnstoff.

Zunächst sollte der Einfluss des Harnstoffs auf die His₁₀-cvP4H Aktivität untersucht werden. Dafür wurde eine Reaktion mit 12,5 µM (PAPK)₅ und 50 mM Harnstoff im Reaktionsansatz in drei unabhängigen Messungen durchgeführt (Abb. 3-21, A, blau). Die Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten erfolgte im Intervall von $\Delta t = 1$ min (Abb. 3-20, B). Die spezifische Aktivität der His₁₀-cvP4H für das Substrat (PAPK)₅ in Anwesenheit von 50 mM Harnstoff betrug nach Abzug der Blindreaktion 0,133 U/mg und war somit vergleichbar zu den Reaktionen ohne Harnstoff (0,126 U/mg). Dadurch konnte ein inhibierender Effekt durch Harnstoff bei der Reaktion mit harnstoffbehandeltem TE (IF 2) (Abb. 3-21, B) im Vorfeld ausgeschlossen werden. Im nächsten Versuchsansatz wurde Harnstoff-behandeltes TE unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt (Abb. 3-21, B). Die Ergebnisse waren mit denen des unbehandelten TEs vergleichbar. Der relative O₂-Verbrauch nach 30 min Reaktionszeit bei der Reaktion mit behandeltem TE war mit $17,8 \pm 3,8$ % ($40,6 \pm 14,4$ µM, n = 3) vergleichbar zur Reaktion mit unbehandeltem TE.

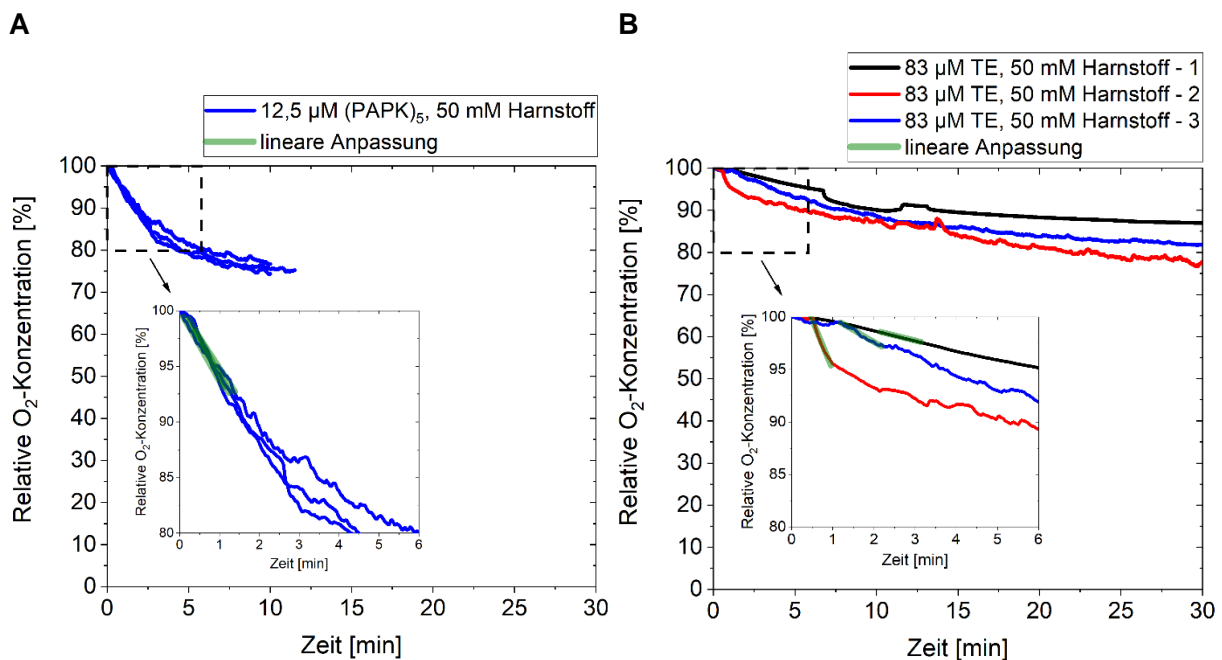


Abb. 3-21 Relative O₂-Konzentration während der *in vitro* Hydroxylierung mit His₁₀-cvP4H bei 37 °C mit Harnstoff. 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,16 mM L-Ascorbinsäure, 0,5 mM 2-OG, 1 µM (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, 4 µM His₁₀-cvP4H (0,1 mg/mL). (A) 12,5 µM (PAPK)₅ (blau) (n = 3). (B) 83 µM TE (IF 2) (5,0 mg/mL) (n = 3) mit Reaktion 1 (schwarz), Reaktion 2 (rot), Reaktion 3 (blau). Inset-Zoom mit linearer Anpassung (grün) zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit. Theoretische Endkonzentration Harnstoff: 50 mM. Reaktionsstart durch Zugabe von 2-OG bei t = 0. Reaktionsvolumen: 1 mL.

Auch für das Harnstoff-behandelte TE zeigten die Progresskurven teilweise einen inhomogenen Verlauf. Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit aus den Reaktionen 1 bis 3 ergaben nach Abzug der Blindreaktion eine spezifische Aktivität von 0,025 U/mg. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie der Wert für die Reaktionen mit unbehandeltem TE (Tab. 3-2, S. 83). Die Behandlung mit Harnstoff hatte demnach keinen Effekt auf den Reaktionsverlauf. Bei Reaktion 2 wurde eine unerwartet hohe initiale Reaktionsgeschwindigkeit ($\Delta t = 0,5$ min) von $21,4 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ bestimmt (Abb. 3-21, B), die jedoch nicht reproduzierbar war. Die Experimente in Anwesenheit von Harnstoff lassen demnach keine Aussage zur Hypothese der Prolyl-Zugänglichkeit in TE oder einer Veränderung der Sekundärstrukturen während des Reaktionsverlaufes zu.

Tab. 3-2 Übersichtstabelle zu O_2 -Verbrauch, Reaktionsgeschwindigkeit und spezifischer Enzymaktivität bei der *in vitro* Hydroxylierung. 37°C , $0,1 \text{ mg His}_{10}\text{-cvP4H}$, $V_{\text{Reaktion}} = 1 \text{ mL}$, Reaktionszeit $t = 10$ min bzw. 30 min; $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol O}_2/\text{min}$. Für alle Messungen ist $n = 3$. Die Werte der Reaktion ohne Peptidsubstrat wurden nicht von den angegebenen Werten der anderen Reaktionen abgezogen.

Substrat	Reaktionszeit [min]	relativer O_2 -Verbrauch [%]	O_2 -Verbrauch [nmol]	initiale Reaktionsgeschwindigkeit v_0 [nmol·mL ⁻¹ ·min ⁻¹]	Spezifische Enzymaktivität [U/mg]
ohne Peptidsubstrat	10	$5,0 \pm 1,3$	$10,4 \pm 0,8$	$1,25 \pm 0,06$	0,0125
	30	$8,2 \pm 2,2$	$16,8 \pm 1,2$		
12,5 μM (PAPK) ₅ (ohne Harnstoff)	10	$18,4 \pm 3,2$	$42,5 \pm 6,8$	$13,8 \pm 1,61$	0,138
12,5 μM (PAPK) ₅ (50 mM Harnstoff)	10	$24,3 \pm 0,98$	$58,9 \pm 1,2$	$14,53 \pm 0,94$	0,145
83 μM TE (ohne Harnstoff)	30	$18,6 \pm 4,8$	$39,6 \pm 14,1$	$3,01 \pm 0,06$	0,03
83 μM TE (50 mM Harnstoff)	30	$17,8 \pm 3,8$	$40,6 \pm 14,4$	$3,66 \pm 2,1$	0,037

Mit Hilfe des Modellpeptids (PAPK)₅ konnte zunächst der Aktivitätstest durch Detektion des Sauerstoffverbrauchs im Oxytherm+ etabliert werden. Die Ergebnisse bestätigen zudem die Aktivität der rekombinanten viralen Hydroxylase. Die Resultate der *in vitro* Hydroxylierung von TE (IF 2) deuten auf die Inkorporation von Sauerstoff und somit Bildung von TE-gebundenem HyP hin. Basierend auf diesen Daten sollte diese Hypothese im Anschluss durch Massenspektrometrie überprüft werden und die Hydroxylierungsstellen des potentiell modifizierten TE identifiziert werden.

3.6.4 Identifikation von 4-Hydroxyprolinen in TE (IF 2)

Die Ergebnisse der *in vitro* Hydroxylierung von Tropoelastin (TE) mittels His₁₀-cvP4H erlaubten die Annahme der Bildung von TE-gebundenem 4-Hydroxyprolin (HyP) (3.6.3). Die Inkorporation eines O-Atoms in den Prolyl-Rest kann massenspektrometrisch über die Verschiebung des *m/z*-Verhältnisses (+15,99) gemessen werden. Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit des erzeugten Hydroxylierungsmusters treffen zu können, wurden je zwei Proben ohne bzw. mit Harnstoffbehandlung des TEs für die MS-Analyse gewählt. Zum einen wurde TE nach Reaktion 1 (schwarze Progresskurven; Abb. 3-20, B, S. 81 bzw. Abb. 3-21, B, S. 82) und zum

anderen TE nach Reaktion 2 (rote Progresskurven; Abb. 3-20, B, S. 81 bzw. Abb. 3-21, B, S. 82) eingesetzt. Die Probenvorbereitung, die MS-Analyse sowie die Datenauswertung sind unter 2.14.2.2, S. 50 beschrieben.

Die Sequenzabdeckung der identifizierten Peptide mit der AS-Sequenz des TE (IF 2, ohne Signalpeptid) lag in allen analysierten Proben im Bereich von 94 – 97 %. Außerdem wurden in allen Proben zwischen 7 – 13 Peptide nachgewiesen, die einzigartig (*unique*) für TE (IF 2) sind. Dadurch gilt TE (IF 2) als eindeutig identifiziert. Die insgesamt 86 Prolyl-Reste von TE (IF 2) konnten nachgewiesen werden. Zudem erlaubte die Analyse den Nachweis von HyP. Beispielhaft sind im Anhang in Abb. 8-12, S. 124 jeweils ein Massenspektrum eines Peptides ohne bzw. mit Hydroxylierung des Prolyl-Restes P-220 dargestellt (Abb. 3-22, TE mit Harnstoff, Reaktion 2). Beide Peptide wurden in der gleichen Probe nachgewiesen. Für das entsprechende Fragmentation (y_6) konnte eine Differenz im m/z -Verhältnis von +15,99 detektiert werden (unmodifiziert: 666,35; modifiziert: 682,34). Dies spricht für den Einbau eines O-Atoms in den Prolyl-Rest. Damit gelang es im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmal TE-gebundene Prolyl-Reste *in vitro* zu hydroxylieren.

Eine Übersicht der *in vitro* hydroxylierten Prolyl-Reste ist in Abb. 3-22 dargestellt. Aufgelistet sind die 86 Prolyl-Reste des TEs (IF 2, Nummerierung inkl. Signalpeptid) mit den umgebenden Aminosäuren $X_1 - X_4$ bzw. $X_1' - X_4'$. Dargestellt ist weiterhin die Lokalisation der Prolyl-Reste in hydrophoben Domänen oder in hydrophilen KP- bzw. KA-Quervernetzungsdomänen [Schmelzer und Duca, 2021]. Farblich hervorgehoben sind Konsensus-Motive, wie z.B. das GXPG-Motiv, in denen der Prolyl-Rest angeordnet sein kann. Basierend auf den Ergebnissen von Schmelzer und Kollegen ist weiterhin markiert, welche Prolyl-Reste nativ als partiell hydroxyliert identifiziert wurden [Schmelzer et al., 2016]. In der Übersicht sind für jeden HyP-Rest die Anzahl der identifizierten HyP-Peptide, die Anzahl an belastbaren Spektren sowie die Gesamtanzahl an identifizierten Peptiden angegeben. Weiterhin ist für jeden HyP-Rest das prozentuale Verhältnis zwischen identifizierten HyP-Peptiden bezogen auf die Gesamtanzahl an Peptiden aufgeführt.

Die Auswertung der MS-Daten ergab, dass in allen vier analysierten TE-Proben Peptide mit hydroxylierten Prolyl-Resten identifiziert wurden. Als belastbares Ergebnis wird in der vorliegenden Arbeit die Hydroxylierung eines Prolyl-Restes angesehen, wenn mindestens zwei Peptide mit HyP nachgewiesen wurden. Zum Teil wurden für HyP-Reste nur ein Peptid bzw. ein Spektrum gefunden, sodass der Hydroxylierungsnachweis nur bedingt belastbar ist. Überwiegend wurden Peptide ohne HyP nachgewiesen. Das prozentuale Verhältnis zwischen HyP-Peptidanzahl und Gesamtpeptidanzahl war für den Großteil der jeweiligen HyP-Reste mit unter 20 % gering, was für einen geringen Modifikationsgrad spricht. Bei einem hohen Modifikationsgrad wäre ein höheres prozentuales Verhältnis zwischen HyP-Peptidanzahl und Gesamtpeptidanzahl zu erwarten gewesen.

Die HyP-Reste waren nicht gleichmäßig über die TE-Moleküle verteilt. Vielmehr zeigten sich bei allen vier Proben zwei TE-Bereiche, in den Prolyl-Reste hauptsächlich hydroxyliert wurden. Dazu zählen zum einen die Domänen 8 – 14, 16 und 17 sowie zum anderen die C-terminalen Domänen 28 – 33. Entsprechend wurde in manchen TE-Bereichen kein HyP nachgewiesen. Dazu zählen die N-terminalen Domänen 2 – 6, Domäne 15 sowie die Domänen 18 – 22. Eine Ausnahme bildet Domäne 26 bei der TE-Probe mit Harnstoffbehandlung (Reaktion 1). In

dieser Domäne wurde für P-560 ein hoher Anteil an HyP-Peptiden von 60 % aller Peptide ermittelt. Dieser Prolyl-Rest ist einem GXPG-Motiv angeordnet und wurde auch in nativem Elastin als partiell hydroxyliert identifiziert [Schmelzer et al., 2016]. Das im C-terminalen Bereich befindliche P-710 liegt in einem XPG-Motiv. Für diesen Prolyl-Rest wurde in allen Proben ebenfalls ein hoher Modifikationsgrad mit einem Anteil an HyP-Peptiden von bis zu 83 % der Peptide bestimmt. Dieser Prolyl-Rest wurde in nativem Elastin nicht als partiell hydroxyliert identifiziert [Schmelzer et al., 2016].

In Tab. 3-3, S. 88 ist die Anzahl an HyP-Resten angegeben, die in Konsensus-Motiven bzw. außerhalb eines solchen Motivs gefunden wurden. In aus Gewebe isolierten TE (IF 2) befinden sich 19 der 21 möglichen HyP-Reste in GXPG-Motiven [Schmelzer et al., 2016]. In TE (IF 2) nach *in vitro* Hydroxylierung mit der His₁₀-cvP4H der vorliegenden Arbeit wurden 3 – 6 HyP-Reste in einem solchen Motiv nachgewiesen. Weiterhin wurde auch HyP im GXXPG, GXPA und XPG-Motiv identifiziert. Bei den vier analysierten TE-Proben war etwa die Hälfte der HyP-Reste keiner bestimmten Konsensus-Sequenz zuzuordnen. Dies spricht dafür, dass die virale Prolyl-4-Hydroxylase cvP4H im Vergleich zur humanen P4H eine geringe Substratspezifität aufweist. Zudem ist festzustellen, dass die HyP-Verteilung und damit verbunden die jeweilige Anzahl in TE zwischen den analysierten Proben variiert (Tab. 3-3, S. 88). Dieses Ergebnis kann darauf hindeuten, dass die enzymatische Hydroxylierungsreaktion unter den durchgeführten Bedingungen noch nicht abgeschlossen ist. In Folgeexperimenten sollten die Reaktionsbedingungen optimiert werden.

Die *in vitro* Hydroxylierung des rekombinanten TEs (IF 2) durch die rekombinante His₁₀-cvP4H konnte durch die MS-Analyse direkt nachgewiesen und die Ergebnisse der *in vitro* Hydroxylierung bestätigt werden. Damit wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die *in vitro* Prolyl-4-Hydroxylierung von rekombinatem, humanem TE (IF 2) gezeigt.

TE (IF 2) Domäne	X ₄	X ₃	X ₂	X ₁	P	X ₁ '	X ₂ '	X ₃ '	X ₄ '	nativ HyP	TE ohne Harnstoff (Reaktion 1)				TE ohne Harnstoff (Reaktion 2)				TE mit Harnstoff (Reaktion 1)				TE mit Harnstoff (Reaktion 2)								
											# Peptide (HyP)	# Spektren (HyP)	# Peptide (total)	# Peptide (HyP)/(total) [%]	# Peptide (HyP)	# Spektren (HyP)	# Peptide (total)	# Peptide (HyP)/(total) [%]	# Peptide (HyP)	# Spektren (HyP)	# Peptide (total)	# Peptide (HyP)/(total) [%]	# Peptide (HyP)	# Spektren (HyP)	# Peptide (total)	# Peptide (HyP)/(total) [%]					
2	P	G	G	V	P-30	G	A	I	P																						
	P	G	A	I	P-34	G	G	V	P	X																					
	P	G	G	V	P-38	G	G	V	F																						
	G	V	F	Y	P-44	G	A	G	L																						
4	G	A	L	G	P-58	G	G	K	P																						
	P	G	G	K	P-62	L	K	P	V																						
5	K	P	L	K	P-65	V	P	G	G																						
	L	K	P	V	P-67	G	G	L	A																						
6	L	G	A	F	P-83	A	V	T	F																						
	A	V	T	F	P-88	G	A	L	V																						
	G	A	L	V	P-93	G	G	V	A																						
7	L	G	G	V	P-116	G	V	G	G	X								1	1	24	4										
	G	A	V	V	P-130	Q	P	G	A		2	2	51	4				3	4	44	7	1	1	50	2						
8	V	V	P	Q	P-132	G	A	G	V		2	3	51	4	1	1	43	2													
	A	G	V	K	P-138	G	K	V	P																						
	P	G	K	V	P-142	G	V	G	L																						
	G	V	G	L	P-147	G	V	Y	P	X																					
9	P	G	V	Y	P-151	G	G	V	L																						
	G	G	V	L	P-156	G	A	R	F																						
	G	A	R	F	P-161	G	V	G	V																						
	V	G	V	L	P-167	G	V	P	T		2	2	21	10																	
10	L	P	G	V	P-170	T	G	A	G		2	2	21	10				3	3	18	17	4	4	23	17						
	A	G	V	K	P-177	K	A	P	G		1	1	20	5				2	1	19	11	1	1	17	6						
	K	P	K	A	P-180	G	V	G	G																						
	F	A	G	I	P-190	G	V	G	P	X	1	2	26	4	1	1	19	5	3	6	24	13	1	1	20	5					
12	P	G	V	G	P-194	F	G	G	P		2	2	30	7				2	2	30	7										
	P	F	G	G	P-198	Q	P	G	V		3	3	33	9				3	4	33	9	1	1	26	4						
	G	G	P	Q	P-200	G	V	P	L		1	1	35	3	1	1	25	4													
	Q	P	G	V	P-203	L	G	Y	P		1	1	35	3																	
	P	L	G	Y	P-207	I	K	A	P		1	1	36	3																	
	P	I	K	A	P-211	K	L	P	G																						
	A	P	K	L	P-214	G	G	Y	G																						
13	G	Y	G	L	P-220	Y	T	T	G		2	2	17	12	2	2	13	15													
	T	G	K	L	P-227	Y	G	Y	G		2	2	27	7	1	2	17	6	3	3	25	12	2	2	16	13					
14	Y	G	Y	G	P-232	G	G	V	A						2	3	21	10	1	1	25	4	2	4	20	10					
	K	A	G	Y	P-245	T	G	T	G																						
15	T	G	V	G	P-252	Q	A	A	A																						
16	A	G	V	L	P-275	G	V	G	G																						
	G	A	G	V	P-283	G	V	P	G	X	1	1	14	7																	
	V	P	G	V	P-286	G	A	I	P																						
	P	G	A	I	P-290	G	I	G	G																						
17	G	V	G	T	P-301	A	A	A	A		1	1	20	5	1	2	28	4													

Abb. 3-22 (Teil 1)

TE (IF 2) Domäne	X ₄	X ₃	X ₂	X ₁	P	X ₁ '	X ₂ '	X ₃ '	X ₄ '	nativ HyP	TE ohne Harnstoff (Reaktion 1)				TE ohne Harnstoff (Reaktion 2)				TE mit Harnstoff (Reaktion 1)				TE mit Harnstoff (Reaktion 2)												
											# Peptide (HyP)	# Spektren (HyP)	# Peptide (total)	# Peptide (HyP)/(total) [%]	# Peptide (HyP)	# Spektren (HyP)	# Peptide (total)	# Peptide (HyP)/(total) [%]	# Peptide (HyP)	# Spektren (HyP)	# Peptide (total)	# Peptide (HyP)/(total) [%]	# Peptide (HyP)	# Spektren (HyP)	# Peptide (total)	# Peptide (HyP)/(total) [%]									
18	A	G	L	V	P-324	G	G	P	G																										
	V	P	G	G	P-327	G	F	G	P	X																									
	P	G	F	G	P-331	G	V	V	G																										
	V	V	G	V	P-337	G	A	G	V	X																									
	G	A	G	V	P-342	G	V	G	V	X																									
	G	V	G	V	P-347	G	A	G	I	X																									
	G	A	G	I	P-352	V	V	P	G																										
	I	P	V	V	P-355	G	A	G	I																										
	G	A	G	I	P-360	G	A	A	V	X																									
G	A	A	V	P-365	G	V	V	S																											
19	G	V	V	S	P-370	E	A	A	A																										
	Y	G	A	R	P-387	G	V	G	V	X																									
20	V	G	G	I	P-395	T	Y	G	V																										
	A	G	G	F	P-405	G	F	G	V	X																									
	V	G	G	I	P-415	G	V	A	G	X																									
	V	A	G	V	P-421	S ^o	V	G	G	X																									
	V	G	G	V	P-427	G	V	G	G	X																									
	V	G	G	V	P-433	G	V	G	I	X																									
21	V	G	I	S	P-439	E	A	Q	A																										
23	G	V	G	T	P-457	A	A	A	A																										
24	F	G	L	V	P-475	G	V	G	V																										
	V	G	V	A	P-481	G	V	G	V																										
	V	G	V	A	P-487	G	V	G	V																										
	V	G	V	A	P-493	G	V	G	L																										
	V	G	L	A	P-499	G	V	G	V																										
	V	G	V	A	P-505	G	V	G	V																										
	V	G	V	A	P-511	G	V	G	V																										
	V	G	V	A	P-517	G	I	G	P																										
	P	G	I	G	P-521	G	G	V	A																										
26	G	A	G	I	P-551	G	L	G	V	X																									
	G	V	G	V	P-560	G	L	G	V	X									3	4	5	60													
	G	A	G	V	P-569	G	L	G	V																										
	G	A	G	V	P-578	G	F	G	A	X																									
27	F	G	A	V	P-584	G	A	L	A																										
28	G	A	A	V	P-600	G	V	L	G																										
	G	V	G	I	P-615	G	G	V	V	X																									
29	V	G	A	G	P-623	A	A	A	A			1	1	14	7	2	5	26	8	1	3	13	8	3	6	30	10								
30	G	L	G	V	P-658	G	V	G	G	X		3	4	11	27	2	3	29	7	2	6	9	22	2	2	29	7								
31	L	G	G	I	P-667	P	A	A	A			1	2	10	10	5	7	31	16	1	1	9	11	5	7	33	15								
	G	G	I	P	P-668	A	A	A	A							3	5	31	10	1	1	9	11	3	6	33	9								
32	A	G	Q	F	P-693	L	G	G	V			2	2	10	20	1	2	21	5	1	1	10	10	1	2	20	5								
33	V	A	A	R	P-701	G	F	G	L			1	1	8	13					1	1	7	14												
	F	G	L	S	P-707	I	F	P	G			1	1	7	14	1	1	12	8	1	2	7	14												
	S	P	I	F	P-710	G	G	A	C			5	11	7	71	3	8	12	25	5	11	6	83	7	14	14	50								

Abb. 3-22 (Teil 2)

Abb. 3-22 Übersicht der Prolyl-Reste in humanem TE (IF 2, ohne Signalpeptid) mit umgebenden Aminosäuren $X_1 - X_4$ bzw. $X_1' - X_4'$ sowie der HyP-Reste nach *in vitro* Hydroxylierung mit His₁₀-cvP4H bei 37 °C ohne bzw. mit Harnstoffbehandlung des TEs vor der Reaktion. Angegeben ist die Position der Prolyl-Reste in hydrophoben und KP-Domänen bzw. KA-Domänen des TEs. Die Nummerierung der Prolyl-Reste erfolgt inklusive des Signalpeptides. Farblich hervorgehoben sind die Konsensus-Motive GXXPG, GXPG, GXPA und XPG. Weiß unterlegt sind Prolyl-Reste, die keiner dieser Konsensus-Sequenzen folgen. (X) markiert, ob die Prolyl-Reste in nativem TE (IF 2) partiell hydroxyliert sind. (# Peptide HyP) Anzahl der identifizierten HyP-Peptide bzw. (# Spektren HyP) Anzahl der belastbaren Spektren mit =1, =2, 3...10 bzw. >10. (# Peptide total) Gesamtanzahl der für den jeweiligen Aminosäurerest identifizierten Peptide mit und ohne HyP. (# Peptide HyP/ # Peptide total) Prozentualer Anteil an HyP-Peptiden von ≤20 %, 20...40 %, 41...60 % bzw. ≥60 % bezogen auf die Gesamtanzahl der für den jeweiligen Aminosäurerest identifizierten Peptide.

Tab. 3-3 Anzahl der in Konsensus-Motiven angeordneten HyP-Reste in isoliertem, humanem TE (IF 2) lt. [Schmelzer et al., 2016] bzw. nach *in vitro* Hydroxylierung von rekombinantem, humanem TE (IF 2) mittels His₁₀-cvP4H.

Konsensus-Motiv	isoliertes TE (IF 2)	TE ohne Harnstoff (Reaktion 1)	TE ohne Harnstoff (Reaktion 2)	TE mit Harnstoff (Reaktion 1)	TE mit Harnstoff (Reaktion 2)
GXXPG	2	2	2	2	5
GXPG	19	3	3	6	4
GXPA	0	1	1	0	0
XPG	0	3	2	3	2
kein Motiv	0	13	7	11	11

4 Diskussion

4.1 Produktion und Aufarbeitung von rekombinantem Tropoelastin (Isoform 2)

4.1.1 Einfluss der *cer*-Sequenz auf die segregative Plasmidstabilität

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines stabilen Produktionssystems für humanes Tropoelastin (Isoform 2) in *E. coli*. Dafür ist eine segregative Plasmidstabilität von Plasmiden mit hoher Kopienanzahl essentiell. Eine Ursache für die Plasmidinstabilität ist die Bildung von Plasmidmultimeren durch homologe Rekombination [Patient und Summers, 1993]. Diese Multimere akkumulieren schnell während der Replikation (*dimer catastrophe*) [Summers et al., 1993]. Daraus resultiert eine Verringerung der Plasmidkopienanzahl in den Tochterzellen nach der Zellteilung, wodurch vermehrt plasmidfreie Zellen auftreten können. Durch die geringere metabolische Belastung und das resultierende schnellere Wachstum kann der Anteil plasmidhaltiger Zellen massiv abnehmen [Glick, 1995]. Dies würde sich negativ auf die Ausbeute bei der Überproduktion des Zielproteins auswirken.

Ein System zur Auflösung der Plasmidmultimere zu Monomeren ist das spezifische Xer-*cer* Rekombinationssystem des ColE1-Plasmids [Summers und Sherratt, 1988]. Die *cer*-Sequenz vermittelt dafür zum einen die Rekrutierung der XerCD-Rekombinase. Zum anderen codiert sie für eine regulatorische, nicht translatierte RNA (*Rcd*; *regulator of cell division*), die vermutlich die Zellteilung bis zur Auflösung der Multimere verzögert [Chant und Summers, 2007]. Dadurch wird eine gleichmäßige Verteilung der Plasmide auf die Tochterzellen gewährleistet.

Die Verwendung eines Expressionsvektors mit einem Antibiotikum-Resistenzgen als Selektionsmarker und die Zugabe von Antibiotika zum Kultivierungsmedium sind in Hinblick auf die Freisetzung und Bildung von Resistenzen in der Umwelt als problematisch zu betrachten. Eine Strategie zur Plasmidstabilisierung und Selektion ohne Einsatz von Antibiotika wurde durch Peubez und Kollegen beschrieben [Peubez et al., 2010]. In einem ersten Schritt wurde die Plasmidstabilität bei der rekombinanten Produktion zweier Proteine in *Helicobacter pylori* im Schüttelkolbenmaßstab in Abhängigkeit der *cer*-Sequenz untersucht. Dabei erfolgte keine Zugabe eines Antibiotikums zum Kulturmedium. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an Zellen mit dem Plasmid ohne die *cer*-Sequenz von 97 % zum Zeitpunkt der Induktion bereits nach 2 h nur noch bei 25 % lag. Bei Zellen mit dem *cer*-haltigen Plasmid lag der Anteil zum gleichen Zeitpunkt bei 100 %.

Der mögliche Verzicht auf den Einsatz von Kanamycin bei der Überproduktion von TE in *E. coli* sollte analog in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Eine Selektion auf plasmidhaltige Zellen erfolgte während der Vorkultur, um eine Mischkultur zu vermeiden. Ein Eintrag von Kanamycin bei dem Prozess im Schüttelkolben- (3.1.2.3, S. 56) und 12 L-Bioreaktormaßstab (3.1.3, S. 57) kann ausgeschlossen werden, da zur Herstellung des Inokulums geerntete Zellen ohne Kulturüberstand verwendet wurden. Die Kanamycinkonzentration im 100 L-Bioreaktormaßstab (3.1.3, S. 57) lag durch Animpfen mit 12 L Vorkultur bei ca. 6 µg/mL. Die

segregative Plasmidstabilität wurde sowohl im Schüttelkolben- als auch im 12 L-Bioreaktormaßstab ohne Zugabe des Antibiotikums bestimmt. Die segregative Plasmidstabilität zum Zeitpunkt der Induktion der Proteinüberproduktion sowie zu der Zellernte nach 2 h lag jeweils bei 100 %. Demnach konnte durch die *cer*-Sequenz sowohl die Multimerisierung der Plasmide als auch der Plasmidverlust bei mangelndem Selektionsdruck verhindert werden. Der Nutzen des Xer-*cer*-Systems in Hinblick auf Erhöhung der Plasmidstabilität und des Plasmiderhaltes im Fermentationsprozess wurde bestätigt.

4.1.2 Aufarbeitung und Reinigung von Tropoelastin (Isoform 2)

Die Proteinreinheit des TEs nach der Extraktion und Aufarbeitung wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Flüssigchromatographie bestimmt und lag bei 87 % (3.5.4.2, S. 74). Der Anteil der Nebenprodukte lag somit bei 13 %. Es konnte massenspektrometrisch nachgewiesen werden, dass es sich bei den Nebenprodukten um TE-Fragmente handelte. Die detektierten Peptide nach Verdau der Nebenprodukte mit Trypsin bzw. Pankreaselastase deckten ca. 70 % der gesamten AS-Sequenz von TE (IF 2) (Abb. 3-17, S. 76) ab. Es wurden sowohl Peptide im N- als auch im C-terminalen Bereich gefunden. Abbauprodukte des TEs wurden bereits bei der publizierten Produktions- und Aufarbeitungsstrategie beschrieben [Vrhovski et al., 1997]. Die TE-Fragmente wurden dabei mittels Umkehrphasenchromatographie entfernt. In der vorliegenden Arbeit konnten die TE-Fragmente mittels Kationenaustauschchromatographie (cIEX) unter denaturierenden Bedingungen zum Großteil von Vollängen-TE getrennt werden (2.11, S. 45). Mittels SDS-PAGE Analyse konnten zahlreiche TE-Fragmente mit einer molekularen Masse zwischen ca. 20 – 60 kDa detektiert werden (Abb. 3-13, S. 71).

Die Ursachen für die Bildung von TE-Fragmenten kann nicht abschließend geklärt, jedoch eingegrenzt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass mehrere Faktoren dazu beitragen. Beginnend auf Translationsebene kann es bei der Expression eines humanen Gens in *E. coli* durch die unterschiedlich häufige Verwendung von Codonen (*codon bias*) [Grantham et al., 1980] zu einer verringerten Translationseffizienz kommen. Etwa ein Drittel der Codone des humanem *eln*-Gens werden in *E. coli* mit einer Häufigkeit von <10 % genutzt und wurden als seltene Codone identifiziert [Martin et al., 1995]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete DNA-Sequenz zur Produktion von TE (IF 2) wurde deshalb durch den Anbieter der Gensynthese für eine optimale Translationseffizienz in *E. coli* angepasst. Demnach sollten die entsprechenden tRNAs während der Biosynthese des TEs zu Verfügung stehen. Es ist anzunehmen, dass jedoch auch die hohe Abfolge repetitiver Sequenzen zu einem Mangel an Aminosäuren (AS) führen kann. Auffällig für TE ist der besonders hohe Anteil an bestimmten AS. Der Anteil von Alanin, Lysin, Prolin und Valin liegt in TE (IF 2, ohne Signalpeptid) bei 77,6 % (s. Anhang, Abb. 8-3, S. 115). Möglicherweise waren die Biosynthese und die Beladung der tRNAs mit AS nach Induktion der TE-Produktion nicht ausreichend. Entsprechend könnten AS in das Kultivierungsmedium supplementiert werden [Kumar et al., 2020], um die Biosynthese des Vollängen-TEs zu verbessern.

Ein partieller, intrazellulärer Abbau des TEs durch *E. coli*-eigene Proteasen während der Kultivierung könnte theoretisch eine weitere Ursache für die TE-Fragmentierung sein. Um das Risiko der proteolytischen Spaltung zu verringern, wurde der *E. coli* Stamm BL21-Gold(DE3) verwendet, der Proteasedefizienzen aufweist. Dazu zählen die cytoplasmatische Lon-

Serinprotease mit einer breiten Substratspezifität und die OmpT der äußeren Hüllmembran. Um den Abbau durch andere *E. coli*-eigene Proteasen während des Zellaufschlusses zu unterbinden, wurde die Biofeuchtmasse (BFM) zunächst mittels Mikrowelle in kurzen Intervallen auf 70 °C erhitzt und Proteasen inaktiviert. Die ursprüngliche Methode der Proteaseinhibierung mittels Mikrowellen bei Rattengehirnen [Sturm et al., 2010] wurde in unpublizierten Vorarbeiten für die TE-Aufarbeitung etabliert [Ahmed, 2012]. Ein Unterschied im TE-Fragmentmuster im Vergleich zur Proteaseinhibierung mittels PMSF konnte dabei nicht festgestellt werden. Die thermische Inaktivierung von Proteasen ist im Maßstab der vorliegenden Arbeit von Vorteil, da eine Zugabe von Proteaseinhibitoren zu mehreren 100 Millilitern Zellsuspension nicht praktikabel bzw. wirtschaftlich wäre.

Vorteilhaft bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisierer APV-2000 ist, dass große Volumina, z.B. mehrere Hundert Milliliter an Zellsuspensionen durch das System geleitet werden können. Ein enzymatischer Aufschluss durch Lysozym in Kombination mit Gefrier-Tau-Schritten wurde von Martin und Kollegen durchgeführt [Martin et al., 1995]. Dies wäre jedoch für die Aufarbeitung von beispielsweise 100 g BFM nicht praktikabel. Ein weiterer Vorteil des Aufschlusses mittels Hochdruckhomogenisation ist, dass Wirtszell-DNA durch die Scherkräfte fragmentiert und die Viskosität des Zellysates innerhalb von drei Passagen reduziert wird [Agerkvist und Enfors, 1990]. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine hohe Viskosität des Zellysates nach der ersten Passage des Hochdruckhomogenisators festgestellt (3.2, S. 59). Die Viskosität nahm nach zweiter und dritter Passage stark ab, was für eine Fragmentierung der Wirtszell-DNA spricht. Somit kann auf die Zugabe von DNA-abbauenden Enzymen, wie DNase I, verzichtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur besseren Skalierung eine Reinigungsmethode zur Abtrennung der TE-Fragmente mittels cIEX im präparativen Maßstab entwickelt. Eine besondere Herausforderung stellte dabei das Koazervationsverhalten des TEs dar. Dieser Prozess der Zusammenlagerung der TE-Monomere wird durch die hydrophoben Domänen des Proteins vermittelt und wird durch Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und die TE-Konzentration beeinflusst [Vrhovski et al., 1997]. Die durch die Koazervation erzeugte Trübung bzw. Lichtstreuung wurde in einem Spektrophotometer mit flüssigkeitstemperierten Küvettenhalter gemessen [Vrhovski et al., 1997]. Die Lichtstreuungsmessung der TE-Lösung erfolgte für je 10 min bei einer Temperatur von 4 – 70 °C. In der vorliegenden Arbeit wurde die Lichtstreuung über die Aggregationsoptik des Prometheus NT.48 (Nanotemper) gemessen (3.5.1, S. 65). Das verwendete Gerät bietet durch die fortschrittliche Technologie den Vorteil, dass ein deutlich geringeres Probenvolumen von nur 15 µL pro Messung nötig ist. Weiterhin können parallel bis zu 48 Proben in einem Temperaturbereich von 20 – 99 °C vermessen werden. Die Temperierung erfolgt durch ein Heizelement, auf dem die mit der Probe gefüllten Kapillaren positioniert werden. Dadurch können mehrere Bedingungen in kurzer Zeit getestet werden.

In den *in vitro* Koazervationsstudien wurden 37 °C, 150 mM NaCl und ein pH-Wert von 7 – 8 als optimale Bedingungen für die Koazervation von rekombinantem TE (IF 4) bestimmt [Vrhovski et al., 1997]. Bei dieser Isoform ist Domäne 26A enthalten, während Exon 22 durch Spleißen entfernt wird. Weiterhin wurde z.B. bei einer TE-Lösung (20 mg/mL; 150 mM NaCl;

pH 7,9) eine Koazervation ab 30 °C gemessen. Eine Messung der Lichtstreuung unterhalb dieser Temperatur fand nicht statt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Koazervation einer TE-Lösung [20 mg/mL; pH 8,0] bei 25 °C ab einer NaCl-Konzentration von ca. 175 mM beginnt (3.5.1, S. 65). Demnach stimmen die Resultate grob mit den Ergebnissen von Vrhovski und Kollegen überein, wenngleich TE (IF 2) nicht Domäne 26A aufweist.

Mit einer maximalen NaCl-Konzentration von 150 mM konnte das Volllängen-TE (IF 2) in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht vollständig vom cEX-Säulenmaterial eluieren (3.5.2, S. 66). Demnach war die Ionenstärke im Elutionspuffer zu gering. Eine Erhöhung der einsetzbaren NaCl-Konzentration auf bis zu 300 mM war nur unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von 1 M Harnstoff zu allen Puffern möglich. Durch Messung der Lichtstreuung konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Transitionstemperatur der Koazervation unter diesen Bedingungen auf 30 °C erhöht wurde (3.5.3, S. 69). Der Einfluss von Harnstoff als chaotrophes Agens auf die Koazervation wurde damit bestätigt. Die Trennung von TE-Fragmenten und Volllängen-TE war möglich, jedoch durch eine Peaküberlagerung nicht vollständig (Abb. 3-13, A, S. 71). Im linearen Gradienten von 0 – 300 mM NaCl eluierten zunächst die TE-Fragmente mit einer geringen molekularen Masse und einer geringeren Netto-Ladung. Es ist zu vermuten, dass TE-Fragmente höherer molekularer Masse eine ähnliche Netto-Ladung und somit auch ein ähnliches Elutionsverhalten wie das Volllängen-TE aufweisen. Dadurch konnten diese nicht vollständig voneinander getrennt werden. Kleinere TE-Fragmente weisen eine geringe Netto-Ladung als das Volllängen-TE auf und eluieren bei einer geringeren NaCl-Konzentration (3.5.3, Abb. 3-13, C, S. 69). Weiterhin ist die Bindekapazität des Chromatographiematerials für TE (IF 2) unbekannt. Laut Hersteller können von Ribonuklease A bis zu 70 mg/mL_{Medium} binden. Da sich molekulare Masse und isoelektrischen Punkt der Ribonuklease A (m. w.: 13,7 kDa; pI: 9,6) deutlich von TE (IF 2) (m. w.: 60 kDa; pI: 10,37) unterscheiden, ist die Bindekapazität nicht übertragbar. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der TE-Beladungsmenge auf 10 % der verwendeten Beladungsmenge von ursprünglich 25 mg/mL_{Säulenvolumen} (300 mg) auf 0,25 mg/mL_{Säulenvolumen} (30 mg) keinen Effekt auf die Trennung des Volllängen-TEs und der TE-Fragmente hat (3.5.3.1, S. 72). Die Abtrennung des Großteils der TE-Fragmente wurde im silbergefärbten SDS-PAGE Gel nachgewiesen (3.5.3, S. 69). Die Proteinreinheit konnte laut HPCL-Analyse auf 99,4 % erhöht werden (3.5.4.2, S. 74). Ein Vergleichswert ist in der Literatur nicht angegeben.

Ein Vergleich zwischen isolierten TE-Mengen bisher publizierter Arbeiten und der vorliegenden Arbeit ist in Tab. 4-1 dargestellt. Die Produktion des rekombinanten TEs (IF 2) fand immer in *E. coli* statt. Als Kulturmedium wurde bisher, soweit angegeben, Komplexmedium verwendet. Wirtszellproteine wurden mittels Cyanogenbromid gespalten und TE mit 0,1 M Essigsäure aus der unlöslichen Fraktion extrahiert [Indik et al., 1990]. Die isolierte TE-Menge lag bei 2 – 4 mg/L_{Kulturvolumen}. In späteren Veröffentlichungen wurde die Fällung von Wirtszellproteinen mit n-Propanol und n-Butanol durchgeführt [Martin et al., 1995; Vrhovski et al., 1997]. Die isolierte TE-Menge konnte auf 30 mg/L_{Kulturvolumen} gesteigert werden [Martin et al., 1995]. Nach Abtrennung der TE-Fragmente mittels Umkehrphasenchromatographie lag die isolierte Menge bei 50 – 200 mg/L_{Kulturvolumen} [Vrhovski et al., 1997].

In der vorliegenden Arbeit wurde für die TE-Produktion erstmalig ein definiertes Minimalmedium verwendet und TE (IF 2) im 100 L-Bioreaktormaßstab produziert. Die Extraktion des TE erfolgte über einen alternativen Extraktionsmix aus 70 % Aceton, 20 % 0,25 M Ammoniumacetat-Puffer (pH 5,0) und 10 % dH₂O. Die Abtrennung der TE-Fragmente erfolgte mittels cIEX unter denaturierenden Bedingungen mit 1 M Harnstoff. Die in der vorliegenden Arbeit erzielte TE-Ausbeute lag mit $137,5 \pm 12,5$ mg/L_{Kulturvolumen} (n = 2) im Bereich der publizierten Werte von Vrhovski und Kollegen.

Tab. 4-1 Vergleich der Ausbeute an rekombinantem TE (IF 2) nach Produktion in *E. coli* und dessen chromatographischer Reinigung.

Referenz	Kulturmedium	Fällungs- bzw. Extraktionsmethode	Reinigungsmethode	TE-Ausbeute [mg/L _{Kultur}]
[Indik et al., 1990]	k. A.	Cyanogenbromid, 0,1 M Essigsäure	RP-HPLC	2 – 4
[Martin et al., 1995]	LB	n-Propanol, n-Butanol	k. A.	30
[Vrhovski et al., 1997]	LB	n-Propanol, n-Butanol	RP-HPLC	50 – 200
die vorliegende Arbeit	M9 Minimal	70 % Aceton-Mix	cIEX (1 M Harnstoff)	125 – 150

In der Literatur wurden für den Zellaufschluss ein Verhältnis zwischen Biofeuchtmasse und Aufschlusspuffer von 1:9 gewählt und die Wirtszellproteine der löslichen Fraktion durch eine Alkoholpräzipitation gefällt [Martin et al., 1995]. Dabei erfolgte die sukzessive Zugabe des 1,5-fachen Volumens an n-Propanol bzw. des 2,5-fachen Volumens an n-Butanol zu der TE-haltigen, löslichen Fraktion bei 4 °C über je 2 h. Dadurch entstanden große Volumina für die weitere TE-Aufarbeitung. Die gefällten Wirtszellproteine wurden mittels Zentrifugation von der alkoholischen, TE-haltigen Fraktion abgetrennt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verhältnis zwischen Biofeuchtmasse und Aufschlusspuffer von 1:3 verwendet. Außerdem erfolgte die TE-Extraktion mit dem Aceton-haltigen Extraktionsmix aus der unlöslichen Fraktion. Dadurch war es möglich, das Volumen der TE-haltigen Überstände um das 6,5-fache zu verringern. Dadurch wurde der weitere Aufarbeitungsprozess vereinfacht. Die Verwendung von Aceton als Lösungsmittel bietet den Vorteil gegenüber den Alkoholen n-Propanol und n-Butanol, dass es im Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 25 °C ab ca. 280 mbar von der wässrigen, TE-haltigen Phase abgetrennt werden kann. Der Vorgang der Koazervation ist u.a. von der Temperatur abhängig [Vrhovski et al., 1997]. Eine deutliche Erhöhung der Wasserbadtemperatur würde die Bildung von TE-Koazervaten fördern, die irreversibel aggregieren können [Bellingham et al., 2003]. Eine solche irreversible Aggregation wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet. Dabei wurde die TE-Lösung nach Abtrennen des Acetons (3.3, S. 61) testweise auf 45 °C erwärmt. Innerhalb von 10 min bildeten sich zunehmend größere Aggregate, die sich nach Abkühlung auf RT für 16 h nicht wieder auflösten. Demnach würde das TE für die weitere Verwendung unbrauchbar. Eine anschließende chromatographische Reinigung wäre durch das hohe Risiko einer Blockierung der Chromatographiesäule nicht möglich. Bei einer anschließenden Herstellung von Proteinvliesen mittels Elektrosponnen

[Yeo et al., 2015] wird das gelöste TE durch eine Spinndüse geleitet. Nach Austritt wird das TE im elektrischen Feld beschleunigt und das Lösungsmittel, z.B. 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFP), verdampft auf dem Weg zu Kollektor. Größere TE-Aggregate können zur Blockade der Spinndüse und ungleichmäßigen Polymerfasern führen. Weiterhin ist zu vermuten, dass die *in vitro* Hydroxylierung von TE-Koazervaten durch die verringerte Zugänglichkeit der Proxyl-Reste weniger effizient sein würde.

Durch den geringen Flammpunkt des Acetons (-18 °C) und das Risiko, leicht entzündliche Gemische mit Luft zu bilden, ist Aceton ein weniger geeignetes Lösungsmittel für eine großtechnische Extraktion von TE. Aus Schutz vor Explosionen müsste sichergestellt sein, dass Zündquellen vermieden werden, die verwendeten Anlagen technisch dicht sind oder andere Maßnahmen, wie technische Lüftungen, vorgenommen werden. Außerhalb der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit einem Extraktionsmix basierend auf n-Propanol und n-Butanol ebenfalls TE extrahiert werden kann. Die Flammpunkte der beiden Alkohole liegen bei 22 °C für n-Propanol bzw. bei 34 °C für n-Butanol. Durch das geringere Explosionsrisiko wäre dieser Extraktionsmix vermutlich besser für eine Extraktion im technischen Maßstab geeignet.

Das in der vorliegenden Arbeit isolierte TE (IF 2) nach der Extraktion war weiß bzw. schwach gelblich (3.3, S. 61). Bei der Aufarbeitung wurde außerdem präzipitiertes TE abgetrennt. Das Präzipitat war bräunlich gefärbt. Die Ursache für die Verfärbung ist jedoch unklar. Eine Verfärbung des TEs nach der alkoholischen Fällung der Wirtszellproteine mit n-Butanol wurde bereits beschrieben [Vrhovski et al., 1997]. Die Verfärbung wurde dabei durch Waschen des TEs mit Chloroform entfernt. Nach Trocknung der chloroformhaltigen Phase blieb ein öliger, gelber Rückstand zurück. Dieser wurde gaschromatographisch analysiert. Im Rückstand wurden Fettsäuren nachgewiesen. Darunter hauptsächlich Palmitin- ($C_{16:0}$) und Oleinsäure ($C_{18:1}$) der *E. coli*-Zellmembran. Das bräunliche Präzipitat (3.3, S. 61) wurde daher in der vorliegenden Arbeit ebenfalls testweise mit Chloroform gewaschen. Nach Trocknung des chloroformhaltigen Überstandes entstand ein ölig brauner Rückstand. Fraglich ist die Ursache der Braunfärbung. Reine Palmitin- und Oleinsäure werden als farblos beschrieben. Oleinsäure nimmt jedoch an der Luft durch Autoxidation eine gelbe bis braune Färbung an [Hartmann-Schreier, 2004; Heydt und Hartmann-Schreier, 2014]. Es ist daher zu vermuten, dass der Rückstand ebenfalls Fettsäuren der *E. coli*-Zellmembran enthielt, die durch Aceton gelöst wurden. Diese Fettsäuren scheinen nach der Abtrennung des Acetons mit dem TE zu interagieren, wodurch ca. 15 % der isolierten TE-Menge präzipitierten (3.3, S. 61). Auf ein Waschen des TEs mit Chloroform zur Entfernung der Fettsäuren wurde aufgrund dessen gesundheitsschädigender und potentiell krebserregender Wirkung verzichtet. Durch Waschen der unlöslichen Fraktion mit Aufschlusspuffer vor der TE-Extraktion (Abb. 2-1, S. 42) konnte die Verfärbung in der vorliegenden Arbeit reduziert werden. So war der Überstand S0 braun gefärbt (Abb. 3-6, B, S. 60). Der Überstand S_w nach dem Waschschrift war beige und deutlich schwächer verfärbt. Die TE-haltigen Überstände nach der Extraktion sowie das TE waren farblos bzw. sehr schwach gelblich (Abb. 3-7, B, S. 62). Das lyophilisierte TE nach Reinigung mittels cIEX war weiß. Demnach konnte die schwach gelbliche Verfärbung im zweiten Reinigungsschritt entfernt werden.

4.2 Produktion und Reinigung der His₁₀-cvP4H

Die Prolyl-4-Hydroxylierung des rekombinant produzierten Tropelastins (TE) sollte *in vitro* durch die virale Prolyl-4-Hydroxylase aus *Paramecium bursaria* Chlorella Virus-1 (cvP4H) erfolgen. Das Enzym wurde erstmals mit N-terminaler Polyhistidin-Sequenz von Eriksson und Kollegen rekombinant in *E. coli* produziert und chromatographisch gereinigt [Eriksson et al., 1999]. Ein Wert über die hergestellte Enzymmenge wurde nicht angegeben. Basierend auf dem von Eriksson und Kollegen veröffentlichten Protokoll wurde das Enzym auch in der vorliegenden Arbeit gewonnen. Dabei konnten 4,7 mg/g_{BFM} bzw. 18 mg/L_{Kulturvolumen} des Enzyms aufgearbeitet werden. Bei der gelelektrophoretischen Untersuchung des löslichen und unlöslichen Anteils der in der vorliegenden Arbeit produzierten His₁₀-cvP4H lies sich ein deutlicher Anteil in der unlöslichen Zellfraktion detektieren (3.6.2, S. 78). Ein Anteil von unlöslicher cvP4H war bereits bei Eriksson und Kollegen nachweisbar, obwohl die Kultivierungstemperatur nach Induktion auf 28 °C herabgesetzt wurde. Die Ausbeute der cvP4H basierend auf dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Protokoll könnte theoretisch durch die weitere Verringerung der Kultivierungstemperatur nach Induktion erhöht werden. Die temperaturbedingt geringere Translationsgeschwindigkeit könnte die korrekte Faltung der His₁₀-cvP4H begünstigen und das Verhältnis zu Gunsten des löslichen Anteils verschieben. Gleichzeitig ist bei gleicher Kultivierungsdauer jedoch von einer geringeren Ausbeute an Biofeuchtmasse auszugehen. Eine Kultivierung nach Induktion bei 18 °C über Nacht wurde kürzlich beschrieben [Langley et al., 2019]. Aufgrund der geringen segregativen Plasmidstabilität des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmids pET-16b_cvP4H von 67 % 2 h nach Induktion (3.6.1, S. 77), wäre eine Verlängerung der Induktionsphase nicht sinnvoll. Zur Optimierung sollte davor eine Umklonierung in einen Vektor hoher Plasmidstabilität erfolgen, z.B. in den von Langley und Kollegen genutzten Vektor pET28a. Eine weitere Möglichkeit wäre die Klonierung in den für die TE-Produktion verwendeten Vektor pET28a(+)_cer der vorliegenden Arbeit. Eine hohe Plasmidstabilität ist weiterhin vorteilhaft, wenn das Enzym im Bioreaktormaßstab produziert werden sollte. Im Hinblick auf die IMAC-basierte Aufarbeitung zeigten sich in der abschließenden gelelektrophoretischen Analyse mittels SDS-PAGE noch geringe proteinogene Verunreinigungen (3.6.2, S. 78). Bei diesen Proteinen könnte es sich um histidinreiche Wirtszellproteine handeln, die trotz des Waschschrilles nicht vom Zielprotein getrennt werden konnten. Zur Optimierung des Reinigungsprotokolls könnten zusätzliche Reinigungsschritte mittels Anionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie angeschlossen werden, welche beispielweise vor Aufklärung der Kristallstruktur von Longbotham und Kollegen durchgeführt wurden [Longbotham et al., 2015]. Für die vorliegende Arbeit war eine weitere Optimierung der Kultivierung oder Reinigung nicht notwendig, da die Menge und der Reinheitsgrad des Enzyms für die geplanten Versuche als ausreichend angesehen wurden.

4.3 *In vitro* Prolyl-4-Hydroxylierung

4.3.1 (PAPK)₅

Der Nachweis der Enzymaktivität der in der vorliegenden Arbeit gereinigten His₁₀-cvP4H (3.6.2, S. 78) wurde zunächst mit dem synthetischen Peptid (PAPK)₅ als Substrat durchgeführt. Dieses Motiv stellt ein natürliches Substrat der cvP4H dar [Eriksson et al., 1999]. In der

vorliegenden Arbeit wurde die Enzymaktivität durch das Verfolgen des O_2 -Verbrauches während der Reaktion der His₁₀-cvP4H bestimmt (3.6.3, S. 80). Zunächst wurde die ungekoppelte Reaktion der His₁₀-cvP4H ohne Peptidsubstrat gemessen. Nach Abzug der Blindreaktion ergab sich bei einer Konzentration von 12,5 μM (PAPK)₅ aus der initialen Reaktionsgeschwindigkeit eine spezifische Aktivität von $0,126 \pm 0,016$ U/mg ($n = 3$). Das gereinigte Enzym war somit aktiv und die Hydroxylierung des synthetischen (PAPK)₅-Peptides ließ sich über den O_2 -Verbrauch im Oxytherm+ nachweisen. Ein Vergleichswert zur Einordnung der in der vorliegenden Arbeit bestimmten Aktivität der cvP4H über einen O_2 -Assay wurde bisher nicht veröffentlicht. Ein V_{\max} von 10 300 cpm/ μg wurde mittels [¹⁴C] O_2 -Radioaktivitätsassay bestimmt [Eriksson et al., 1999] und kann nicht zum Vergleich herangezogen werden.

Eine andere virale Prolyl-4-Hydroxylase wurde im Organismus *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus identifiziert [Rutschmann et al., 2014]. Rutschmann und Kollegen konnten durch Coexpression in *E. coli* humanes Kollagen (Typ III) hydroxylieren und einen ähnlichen Hydroxylierungsgrad im Vergleich zu nativem Kollagen (Typ III) erzeugen. Die Mimivirus-P4H ist ein Monomer mit einer molekularen Masse von 27,9 kDa (Swiss-Prot Datenbankeintrag: Q5UP57) und weist diesbezüglich eine gewisse Ähnlichkeit mit der cvP4H (monomeres Enzym, m. w.: 27,8 kDa inkl. N-terminaler Transmembrandomäne) auf. Die Kristallstruktur der P4H aus dem Mimivirus wurde bisher jedoch nicht aufgeklärt. Außerdem sind K_M -Werte für Peptid- bzw. Co-Substrate unbekannt. In einem [¹⁴C] O_2 -Radioaktivitätsassay wurden kurze synthetische Peptide, wie z.B. (GPP)₇ und (SPAP)₅, eingesetzt [Rutschmann et al., 2014]. Das (SPAP)₅-Motiv stammt aus prolinreichen Mimivirus-Proteinen. Mit dem synthetischen (SPAP)₅-Peptid (280 μM) wurde nach Abzug der Blindreaktion (ca. 15 pmol·min⁻¹·mg⁻¹) eine spezifische Enzymaktivität von ca. 75 pmol·min⁻¹·mg⁻¹ bestimmt. Dieser Wert ist ca. um Faktor 10³ geringer als die spezifische Aktivität der cvP4H mit 12,5 μM (PAPK)₅ (126 nmol·min⁻¹·mg⁻¹) aus der vorliegenden Arbeit. Da es sich allerdings um Enzyme aus verschiedenen Organismen und unterschiedliche Peptidsubstrate handelt, ist ein Vergleich nur sehr eingeschränkt möglich.

Die spezifische Aktivität der aus Hühnerembryonen isolierten P4H mit dem synthetischen Peptid (PPG)₅ lag bei 1,1 U/mg [Nietfeld und Kemp, 1980]. Die spezifischen Aktivitäten der Hühner- und der cvP4H liegen somit in einer ähnlichen Größenordnung. Vergleiche zwischen cvP4H und der aus Hühnerembryonen isolierten P4H sind allerdings nur bedingt möglich. Beide gehören zwar der gleichen Enzymfamilie an, weisen jedoch Unterschiede in Aufbau und Substratspezifität auf (1.1.3, S. 17).

Es ist bekannt, dass P4Hs eine ungekoppelte Reaktion katalysieren (Abb. 1-4, S. 19), deren Mechanismus bisher nicht vollständig aufgeklärt ist. Mit der aus Hühnerembryonen isolierten P4H konnte gezeigt werden, dass die Decarboxylierung des 2-Oxo-[1-¹⁴C]-glutarates auch ohne Peptidsubstrat erfolgt [De Jong et al., 1982; De Jong und Kemp, 1984]. Der Anteil des [¹⁴]CO₂ bei Reaktion ohne Peptidsubstrat entsprach dabei 1 – 4 % des [¹⁴]CO₂ bei Reaktion mit dem (PPG)₁₀-Peptid [Myllylä et al., 1984]. In der Reaktion der rekombinanten cvP4H mit dem synthetischen Peptid (PPG)₁₀ (0,2 mM, K_M : 2,9 mM) wurden 5450 cpm [¹⁴C] O_2 gebildet [Eriksson et al., 1999]. Bei Negativkontrollen wurden hingegen weniger als 500 cpm [¹⁴C] O_2 erzeugt. Dies entspricht einem Anteil der ungekoppelten Reaktion von ca. 10 %. Für die His₁₀-cvP4H wurde in der vorliegenden Arbeit eine spezifische Aktivität von 0,0125 U/mg (ohne

Peptidsubstrat) bzw. von 0,126 U/mg (12,5 μM (PAPK)₅) bestimmt (3.6.3, S. 80). Der Anteil der ungekoppelten Reaktion war demnach vergleichbar.

Ein wichtiges Ziel für den Einsatz von Enzymen für anwendungsorientierte Katalysen ist der mögliche Totalumsatz des Substrates. Auch im Hinblick auf die Hydroxylierung des Peptidsubstrates wäre es wünschenswert, dass das Enzym im Rahmen der katalytischen Limitierungen (Sequenzspezifität, Zugänglichkeit und Verfügbarkeit aller Substrate) die potentiellen zu modifizierenden Prolyl-Reste vollständig hydroxyliert. In diesem Zusammenhang wurden die Ergebnisse der O₂-Verbrauchsexperimente für das Modellpeptid numerisch analysiert. Vereinfachend wird für die folgenden Betrachtungen angenommen, dass der O₂-Verbrauch der ungekoppelten Reaktion immer gleich ist. Somit kann über den O₂-Verbrauch als grobe Näherung der Umsatz des (PAPK)₅ bzw. der Anteil an HyP bestimmt werden. Es wurde gezeigt, dass die cvP4H hauptsächlich interne Prolyl-Reste hydroxyliert [Eriksson et al., 1999; Longbotham et al., 2015]. Bei einer Reaktion mit 12,5 μM (PAPK)₅ sind somit theoretisch 100 nmol Prolyl-Reste enthalten, die hydroxyliert werden können. Die Differenz des mittleren Sauerstoffverbrauches aus den Reaktionen mit 12,5 μM (PAPK)₅ (42,5 \pm 6,8 nmol) und den Reaktionen ohne Peptidsubstrat (10,4 \pm 0,8 nmol) lag im Mittel bei 32 nmol (Tab. 3-2, S. 83). Daraus ergibt sich näherungsweise ein Umsatz von 32 % der Prolyl-Reste. Die Hydroxylierungsreaktion war demnach nicht vollständig und kam nach ca. 10 min aus unbekannter Ursache zum Erliegen. Grund dafür könnte theoretisch ein Mangel an einem Co-Substrat sein, der im Folgenden diskutiert werden soll.

Eine O₂-Konzentration von 220 – 250 nmol/mL zum Reaktionsstart sollte für den Umsatz von 100 nmol Prolyl-Resten ausreichend sein. Unbekannt ist allerdings der K_M -Wert der cvP4H für O₂, sodass ein Einfluss der O₂-Konzentration auf die Enzymaktivität nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Konzentration von 0,5 mM 2-OG entspricht 500 nmol im Reaktionsansatz und sollte bei der Reaktion mit 12,5 μM (PAPK)₅ nicht der limitierende Faktor sein. Der K_M -Wert der cvP4H für 2-OG liegt bei 20 μM [Eriksson et al., 1999]. Ein Faktor, der zur Inaktivierung der cvP4H führen kann, ist der Redoxzustand des Eisen-Ions im aktiven Zentrum. Durch die ungekoppelte Reaktion kann dieses im Fe(III)-Zustand verbleiben und das Enzym inaktivieren (Abb. 1-4, S. 19). Zur Reduktion des Eisen-Ions ist die Zugabe von Ascorbat notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde entsprechend der Literatur eine Konzentration von 160 μM Ascorbat eingesetzt [Longbotham et al., 2015]. Ein weiterer limitierender Faktor könnte die Beladung der cvP4H mit Fe²⁺ im aktiven Zentrum sein. Wie auch bei Longbotham und Kollegen wurden in der vorliegenden Arbeit pro Reaktion 4 μM His₁₀-cvP4H und 1 μM Fe²⁺ eingesetzt. In diesem Fall muss davon ausgegangen werden, dass ein gewisser Anteil der Enzymmoleküle mit Fe²⁺-Ionen gesättigt war. Durch die Imidazol-Gruppe in der Seitenkette von Histidin ($pK_{S, \text{Imidazolium-Gruppe}}$: 6,0) [Carey, 2001] liegt das Gleichgewicht bei pH > 6 mehr auf Seite der deprotonierten Form. Dadurch kann Histidin zweiwertige Übergangsmetall-Ionen von Nickel, Kobalt und Kupfer binden. Histidin ist daher an der Koordinierung von zweiwertigen Metall-Ionen im aktiven Zentrum beteiligt. Dazu zählen beispielsweise die katalytische Triade in Serin-Proteasen (Ser-His-Asp) [Dodson und Wlodawer, 1998]. Bei den Fe(II)- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen erfolgt die Koordinierung des Fe²⁺ durch zwei Histidinyll- und einen Aspartyl-Rest (1.1.3, S. 17). Theoretisch kann bei den Hydroxylierungsreaktionen (3.6.3, S. 80) (pH 7,0) der Polyhistidin-tag Fe²⁺-Ionen binden, sodass die Ionen nicht für die Beladung der cvP4H zur

Verfügung stehen. Gegen diesen Effekt spricht, dass bei Longbotham und Kollegen unter Einsatz von 1 μM FeSO_4 und 4 μM His₆-cvP4H nach 16 h Reaktionszeit massenspektrometrisch ein vollständiger Umsatz des Peptidsubstrates nachgewiesen wurde. Eine Rekonstitution der über Nickel-Affinitätschromatographie gereinigten His₆-cvP4H mit Fe^{2+} erfolgte dabei nicht. Zur Identifizierung limitierender Faktoren bzw. um die optimalen Reaktionsbedingungen für die *in vitro* Hydroxylierung mit der His₁₀-cvP4H zu finden, sind weiterführend Experimente mit verschiedenen Konzentrationen der Co-Substraten und Variation anderer Reaktionsparameter notwendig. Parallel dazu sollte die Quantifizierung des erzeugten 4-Hydroxyprolins erfolgen.

4.3.2 TE (IF 2)

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Prolyl-4 Hydroxylierung von rekombinantem, humanem Tropoelastin (Isoform 2) (TE, IF 2). Als Proteinsubstrat wurde dazu das chromatographisch gereinigte TE (IF 2) (3.5.3, S. 69) bei der *in vitro* Hydroxylierung eingesetzt. Die Enzymaktivität der His₁₀-cvP4H wurde anhand des O_2 -Verbrauchs verfolgt (3.6.3, S. 80). Um einen möglichen Einfluss der TE-Konformation auf die Hydroxylierung zu untersuchen, wurde ebenfalls harnstoffbehandeltes TE eingesetzt. Hinweise, dass mögliche Hydroxylierungspositionen strukturell abgeschirmt sein könnten, ergeben sich aus der Tertiärstruktur von unmodifiziertem TE (IF 2), welche in einem simulationsgestützten Modell anhand der Aminosäuresequenz vorhergesagt wurde [Tarakanova et al., 2018].

Der relative O_2 -Verbrauch sowie die spezifische Enzymaktivität waren bei allen Reaktionen mit TE höher als bei den ungekoppelten Reaktionen ohne Peptidsubstrat (Tab. 3-2, S. 83). Auffällig bei einer Progresskurve bei Einsatz von TE (IF 2) war ein Bereich mit erhöhtem O_2 -Verbrauch nach ca. 20 min, der nach wenigen Minuten endete (Abb. 3-20, B, S. 81). Vermutlich weist das TE-Molekül eine gewisse Flexibilität auf [Baldock et al., 2011], sodass Prolyl-Reste z.T. für die cvP4H zugänglich waren. Diese „spontane“ Zugänglichkeit könnte erklären, warum die Progresskurven innerhalb von drei Messungen z.T. nicht reproduzierbar waren. Eine im Vergleich zur Reaktion ohne Peptidsubstrat höhere Enzymaktivität wurde ebenfalls bei TE nach Harnstoffbehandlung beobachtet (Abb. 3-21, B, S. 82, Reaktion 2). Auch hier zeigte sich ein ähnliches Verhalten in den Progresskurven wie mit unbehandeltem TE.

Neben der strukturellen Zugänglichkeit der Prolyl-Reste im TE spielen bei Enzymreaktionen mit polymeren Substraten auch die Assoziation und Dissoziation zum Substrat eine Rolle. Für das kurze Peptidsubstrat (PAPK)₃ konnten Longbotham und Kollegen eine Dissoziationskonstante ($K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$) von $1,60 \pm 0,26 \mu\text{M}$ bestimmen [Longbotham et al., 2015], was für eine geringe Affinitätsstärke der Protein-Protein-Wechselwirkung spricht [Kastritis et al., 2011]. Für TE gibt es entsprechende Werte nicht. Ein hoher k_{on} -Wert (Assoziation) und ein geringer k_{off} -Wert (Dissoziation) können zu einer starken Enzym-Substrat-Wechselwirkung (niedriger K_D -Wert) führen und somit einen Einfluss auf den Substratumsatz haben.

Dennoch lassen die Ergebnisse des O_2 -Assays vermuten, dass die Hydroxylierung von Prolyl-Resten in TE stattgefunden hat. Anhand des verbrauchten Sauerstoffes ist allerdings von einem geringen Hydroxylierungsgrad des TEs auszugehen. Bei Einsatz von 83 μM TE (IF 2) mit insgesamt 86 Prolinen sind 7,1 mM (7,1 μmol) Prolyl-Reste enthalten. Der O_2 -Verbrauch nach Abzug der Blindreaktion von ca. 25 nmol entspricht näherungsweise einem Umsatz von ca. 0,4 % aller Prolyl-Reste. Es ist anzunehmen, dass dieser Umsatz durch Testung weiterer

Reaktionsbedingungen noch gesteigert werden kann. Zur Verbesserung der O₂-Versorgung könnte der Reaktionsansatz unter optimierten Reaktionsbedingungen schüttelnd inkubiert werden. Dies wäre allerdings mit dem Oxytherm+ nicht umsetzbar. Alternativ könnte O₂ in das Medium eingeleitet werden, wobei durch die hohe Sensitivität der Clarke-Elektrode auf sich ändernde O₂-Konzentrationen vermutlich kein stabiles Messsignal zu erwarten wäre. Einen positiven Einfluss auf die TE-Hydroxylierung könnte eine Verlängerung der Reaktionszeit haben. Die *in vitro* Hydroxylierung des synthetischen (PAPK)₅-Peptids erfolgte bei Eriksson und Kollegen bei einer Reaktionszeit von 30 min [Eriksson et al., 1999]. Der maximale Hydroxylierungsgrad des (PAPK)₅ wurde in der Literatur nach 16 h erreicht [Longbotham et al., 2015]. Ein weiterer Faktor könnte die Reaktionstemperatur sein. Bisher ist das Temperatur-Optimum der cvP4H nicht untersucht worden (vgl. BRENDA Datenbank, EC 1.14.11.2). In allen bisherigen Publikationen wurden Reaktionen mit der cvP4H bei 37 °C durchgeführt [Eriksson et al., 1999; Langley et al., 2019; Longbotham et al., 2015]. Daher wurden die Reaktionen in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bei 37 °C durchgeführt. Die Temperatur hat auch einen Einfluss auf die Hydrathüllen des TEs und das Klathratwasser, welche die hydrophoben Domänen des TEs unterhalb der Transitionstemperatur umgeben und das Protein in Lösung halten [Yeo et al., 2011]. Ab einer bestimmten Temperatur werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Klathratwassermolekülen gelöst und die hydrophoben Domänen des Proteins können interagieren (Koazervation). Allerdings beeinflussen noch weitere Faktoren, wie Ionenstärke und pH, das Koazervationsverhalten des TEs [Vrhovski et al., 1997]. Eine Koazervation unter den Reaktionsbedingungen der *in vitro* Hydroxylierung kann in der vorliegenden Arbeit weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Ionenstärke sehr gering war. Durch die cvP4H-Präparation ist nur mit einem Eintrag von theoretisch ca. 2 mM NaCl in den Reaktionsansatz zu rechnen. Für rekombinantes TE (IF 4, 20 mg/mL, pH 7,4) wurde z.B. festgestellt, dass unter einer NaCl-Konzentration von 100 mM bei 37 °C keine Koazervation stattfindet [Vrhovski et al., 1997]. Mit 100 mM NaCl wurde eine Koazervation mittels Trübungsmessung erst ab ca. 60 °C nachgewiesen. In den Reaktionsansätzen der vorliegenden Arbeit (TE-Konzentration: 5 mg/mL) war makroskopisch keine Trübung erkennbar, welche auf eine Koazervation hindeuten würde. Der Einfluss der Ionenstärke in Zusammenhang mit steigender Temperatur wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls für TE (IF 2) nachgewiesen. Ohne NaCl nimmt die Trübung der TE-Lösung bis zur höchsten getesteten Temperatur (40 °C) nicht zu (Abb. 3-12, schwarz, S. 69). Mit 300 mM NaCl in der TE-Lösung beginnt die Koazervation bei ca. 22 °C (Abb. 3-12, rot, S. 69).

Basierend auf der Studie von Schmelzer und Kollegen sind in nativem, humanem TE (IF 2) alle HyP-Reste in den hydrophoben Domänen des Proteins lokalisiert. Diese sind hauptsächlich im GXPG-Motiv (X ≠ P) angeordnet [Schmelzer et al., 2016]. Eine Übersicht, die die Positionen der partiell hydroxylierten Prolyl-Reste in der TE-Sequenz darstellt, ist im Anhang aufgeführt (Abb. 8-4, S. 116). Für den direkten Nachweis von 4-Hydroxyprolin erfolgte in der vorliegenden Arbeit die massenspektrometrische Analyse der TE-Proben nach der *in vitro* Hydroxylierung (3.6.4, S. 83). Anhand der MS-Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt, dass die *in vitro* Prolyl-4-Hydroxylierung von humanem TE mit der rekombinanten, viralen cvP4H möglich ist. In den TE-Peptiden wurde, unabhängig von der

Harnstoffbehandlung, HyP nachgewiesen. Die Lokalisation der HyP-Reste sowie der Modifikationsgrad waren zwischen den einzelnen TE-Proben ähnlich. Von einem Einfluss von Harnstoff auf das Hydroxylierungsmuster ist demnach nicht auszugehen. Vergleicht man die HyP-Positionen in TE nach *in vitro* Hydroxylierung mit jenen in nativem TE, zeigen sich Unterschiede. Die hydroxylierten Prolyl-Reste sind sowohl in den klassischen Konsensus-Motiven (GXXPG, GXPG, GXPA, XPG) als auch in anderen Aminosäuresequenzen (z.B. GQFP₆₉₃LG oder GLSP₇₀₇IF) angeordnet. Demnach scheint die virale cP4H im Vergleich zur hP4H eine geringe Substratspezifität aufzuweisen. Es wurden sowohl Prolyl-Reste in hydrophoben als auch in hydrophilen Domänen durch die His₁₀-cvP4H hydroxyliert. Einige entsprachen dabei den nativ modifizierten Resten (z.B. P-190, P-658), andere sind nativ jedoch nicht als partiell hydroxyliert nachgewiesen worden [Schmelzer et al., 2016].

Der prozentuale Anteil an HyP-Peptiden in Bezug auf die jeweilige Gesamtpeptidzahl war zum Großteil < 20 %, was auf einen geringen Hydroxylierungsgrad hinweist. Dies steht im Einklang mit dem geringen, gemessenen O₂-Verbrauch von ca. 25 nmol bei der Reaktion mit unbehandeltem TE (IF 2) und der höchsten Reaktionsgeschwindigkeit im Bezug auf die Gesamtkonzentration von 7,1 mM (7,1 µmol) Prolyl-Resten. Auffällig war in allen TE-Proben der hohe Modifikationsgrad des Prolyl-Restes P-710 in bis zu 83 % aller für den Rest identifizierten Peptide. Dieser Rest ist im XPG-Motiv in der hydrophoben Domäne 33 des TEs lokalisiert [Schmelzer et al., 2016]. Dieses Konsensus-Motiv wird auch in nativem Kollagen hydroxyliert und wurde mittels Coexpression von humanem Kollagen (Typ III) A1 und cvP4H hydroxyliert [Shi et al., 2017]. Laut Tertiärstrukturmodell des TEs befindet sich Domäne 33 in der C-terminalen „Fußregion“ [Tarakanova et al., 2018]. Es kann vermutet werden, dass P-710 in der TE-Tertiärstruktur lösungsmittlexponiert liegt und somit gut für die His₁₀-P4H zugänglich ist. Bei der Betrachtung ist zu beachten, dass das atomistische Modell für die TE-Tertiärstruktur auf Grundlage anderer Umgebungsparameter errechnet wurde als in der vorliegenden Arbeit bei der *in vitro* Hydroxylierung gegeben waren. So basiert das publizierte Modell auf Simulationen mit Wasser als Lösungsmittel. In der vorliegenden Arbeit wurde TE hingegen in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5) eingesetzt. Ein simulationsbasiertes Modell der Tertiärstruktur für TE in Wasser bei 37 °C wurde danach veröffentlicht und stellte ebenfalls die bereits publizierte Einteilung des TE-Moleküls in Knäuel-, Brücken und Fußregion dar [Tarakanova et al., 2019]. Das TE wurde dabei als Molekül mit einer gewissen „scherenartigen“ Konformationsänderung der C-terminalen Region beschrieben. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die hydrophoben Domänen des TEs z.T. lösungsmittlexponiert sein müssen und dass TE keinen hydrophoben Kernbereich bildet [Muiznieks und Weiss, 2007]. Dies kann erklären, warum in der vorliegenden Arbeit z.T. auch Prolyl-Reste in hydrophoben Domänen des unbehandelten TEs hydroxyliert wurden.

Nativ findet die Prolyl-4-Hydroxylierung im Lumen des endoplasmatischen Reticulums statt. Direkt nach der Biosynthese wird TE durch das Elastinbindeprotein (EBP) gebunden, was eine frühzeitige Aggregation verhindert [Hinek et al., 1995a]. Es ist wahrscheinlich, dass die Interaktion mit der humanen Prolyl-4-Hydroxylase und die TE-Hydroxylierung im TE-EBP-Komplex stattfinden. Dies könnte einen Einfluss auf die Effizienz der Hydroxylierung und deren Regioselektivität haben. Die Bindung des EBPs erfolgt dabei über das repetitive GVAPG-Motiv in

TE-Domäne 24. An diesen Prolyl-Resten wurde nativ kein HyP detektiert [Schmelzer et al., 2016]. Eine Hydroxylierung in Domäne 24 durch die cvP4H wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht nachgewiesen.

Prolyl-Reste im GXPG-Motiv liegen nativ partiell hydroxyliert vor, d.h. sie wurden bei der MS-Analyse sowohl modifiziert als auch nicht modifiziert nachgewiesen [Schmelzer et al., 2016]. Demnach gibt es kein einheitliches Hydroxylierungsmuster aller TE-Moleküle. Ein Grund dafür könnte die Bindung des TEs an das EBP sein. Denkbar wären hier verschiedene Verweilzeiten des TE-EBP-Komplexes im Lumen des ERs, in welchem die Prolyl-4-Hydroxylierung stattfindet. Denkbar ist auch, dass die Bindung des EBPs an TE die Tertiärstruktur des TEs verändert. Untersuchungen dazu wurden bisher nicht veröffentlicht.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der biotechnologischen Produktion und Reinigung von rekombinantem, humanem Tropoelastin (Isoform 2) sowie dessen *in vitro* Prolyl-4-Hydroxylierung mittels rekombinant produzierter, viraler Prolyl-4-Hydroxylase aus *Paramecium bursaria* Chlorella Virus-1.

Zielsetzung war es zunächst, humanes Tropoelastin im Gramm-Maßstab herzustellen. Dafür sollte ein reproduzierbares Produktionsprotokoll im Bioreaktor etabliert werden. Das produzierte Tropoelastin sollte aus der *E. coli*-Biofeuchtmasse extrahiert und gereinigt werden. Außerdem sollte eine virale Proyl 4-Hydroxylase (cvP4H) rekombinant hergestellt und affinitätschromatographisch gereinigt werden. *In vitro* sollte die Enzymaktivität in einem kontinuierlichen Assay mit dem synthetischen Peptid (PAPK)₅ über den Sauerstoffverbrauch der Hydroxylierungsreaktion nachgewiesen werden. Danach sollte die Hydroxylierung von rekombinantem Tropoelastin erfolgen. Die modifizierten Prolyl-Reste sollten massenspektrometrisch identifiziert werden.

Folgende Schwerpunkte wurden erfolgreich bearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tab. 5-1 zusammengefasst.

Tab. 5-1: Übersicht der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse.

Untersuchter Schwerpunkt	Kurzdarstellung der Ergebnisse	s. Abschnitt
Tropoelastin Produktion	<ul style="list-style-type: none"> Die Produktion von rekombinantem Tropoelastin in <i>E. coli</i> unter Anzucht in Minimalmedium wurde im Schüttelkolbenmaßstab und im 12 L-Bioreaktormaßstab etabliert. Es wurden 0,48 kg Biofeuchtmasse erzeugt. Die segregative Plasmidstabilität lag zum Erntezeitpunkt bei 100 %. Das Produktionsverfahren wurde erfolgreich auf den 100 L-Bioreaktormaßstab übertragen. Es wurden 4,18 kg Biofeuchtmasse erzeugt. 	3.1
Tropoelastin Extraktion	<ul style="list-style-type: none"> Ein Verfahren zur Extraktion von Tropoelastin aus 100 g <i>E. coli</i>-Biofeuchtmasse mittels Acetonextraktion wurde etabliert. Die Aufarbeitung von Tropoelastin nach Acetonextraktion wurde etabliert. Die Ausbeute lag bei $6,4 \pm 0,6$ mg Tropoelastin je Gramm Biofeuchtmasse, was 220 ± 20 mg/L_{Kulturvolumen} (n = 5) entspricht (Proteinreinheit laut HPCL-Analyse: > 85 %). 	3.2 3.3 und 3.4
Tropoelastin Reinigung	<ul style="list-style-type: none"> Es wurde ein Verfahren zur Abtrennung der Tropoelastinfragmente mittels Kationenaustauschchromatographie entwickelt. 	3.5

-
- Die Ausbeute lag bei ca. 3,9 mg Tropoelastin je Gramm Biofeuchtmasse, was $137,5 \pm 12,5 \text{ mg/L}_{\text{Kulturvolumen}}$ ($n = 2$) entspricht (Proteinreinheit laut HPLC-Analyse: > 99 %).
 - Die Proteinverunreinigungen wurden massenspektrometrisch als Fragmente des Tropoelastins identifiziert. 3.5.4.2
 - His₁₀-cvP4H Produktion • Die Überproduktion der viralen Prolyl-4-Hydroxylase in *E. coli* unter Anzucht in Komplexmedium wurde erfolgreich im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt. 3.6.1
 - His₁₀-cvP4H Reinigung • Die cvP4H wurde mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Ausbeute lag bei $18 \text{ mg/L}_{\text{Kulturvolumen}}$. 3.6.2
 - In vitro* Prolyl-4 Hydroxylierung • Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Messung des Sauerstoffverbrauches in einem kontinuierlichen Assay untersucht. 3.6.3
 Die Aktivität der His₁₀-cvP4H wurde mit dem synthetischen Peptid (PAPK)₅ nachgewiesen. Die spezifische Aktivität bei Einsatz von $12,5 \mu\text{M}$ (PAPK)₅ ($\frac{K_M}{4}$) und einer Reaktionstemperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde zu $0,126 \pm 0,016 \text{ U/mg}$ ($n = 3$) bestimmt.
 Der Einsatz von (harnstoffbehandeltem) Tropoelastin als Substrat für die His₁₀-cvP4H wurde untersucht. Die Ergebnisse lassen einen Einfluss der Tropoelastin-Konformation, der Co-Substratkonzentration, der Temperatur oder der Reaktionszeit bei der Hydroxylierungsreaktion vermuten.
 - Erstmals wurde die *in vitro* Hydroxylierung des rekombinanten Tropoelastins mit der His₁₀-cvP4H nachgewiesen. 3.6.4
 Die 4-Hydroxyproline sowie deren Positionen in der Aminosäuresequenz wurden eindeutig massenspektrometrisch identifiziert. Der Modifikationsgrad ist als gering einzuschätzen. Die cvP4H zeigte eine geringe Substratspezifität.
-

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmal die *in vitro* Prolyl-4-Hydroxylierung von rekombinanten, humanem Tropoelastin (Isoform 2) gezeigt. Sie leistet damit einen Beitrag zur Entwicklung neuer modifizierter Proteine, die beispielweise zur Herstellung von nativ-ähnlichen, elastinbasierten Biomaterialien für die medizinische Anwendung genutzt werden können.

6 Ausblick

Im Verlauf der Arbeiten ergaben sich einige Fragestellungen, die in der Zukunft bearbeitet werden sollten.

Die biotechnologische Produktion von Tropoelatin (Isoform 2) (TE IF 2) in M9-Minimalmedium sollte weiterführend optimiert werden. Bisher war die Produktionsstrategie im Bioreaktormaßstab für einen Prozesstag mit pulsweiser Fütterung ausgelegt. Durch eine Induktion bei höherer OD und längere Induktionsphase kann die Ausbeute an Biofeuchtmasse und somit an TE erhöht werden. Um die TE-Produktion im Gramm-Maßstab zu ermöglichen, sollte der Aufarbeitungsprozess skaliert werden und beispielsweise eine Ultrafiltration statt Dialyse etabliert werden. Für eine großtechnische Aufarbeitung sollte die Extraktion mit alkoholhaltigen Gemischen statt mit flüchtigem Aceton weiter untersucht werden. Aus dem produzierten TE kann die Herstellung von z.B. Proteinvliesen mittels Elektrosponnen oder von Hydrogelen erfolgen. Zur weiteren Charakterisierung des produzierten TEs sollte der Anteil an Endotoxinen aus *E. coli* bestimmt werden.

Aufgrund der zahlreichen, möglichen Ursachen für die TE-Fragmentierung wäre eine Optimierung zeitintensiv. Die Ausbeute an Vollängen-TE bei der Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie könnte durch ein angepasstes Elutionsprofil mit isokratischer Phase erhöht werden.

Die Produktion der löslichen His₁₀-cvP4H sollte durch Steigerung der segregativen Plasmidstabilität und einer stärkeren Absenkung der Kultivierungstemperatur unter 28 °C verbessert werden. Nachdem in der vorliegenden Arbeit die Prolyl-4-Hydroxylierung von TE massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnte, sollte eine Quantifizierung des HyPs angestrebt werden. Dies könnte z.B. mittels Fluoreszenzmarkierung der einzelnen Aminosäuren (FMOC-Derivatisierung) und Auftrennung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie erfolgen. Gleichzeitig sollte die *in vitro* Hydroxylierung optimiert werden. In weiterführenden Experimenten könnten dafür verschiedene Reaktionsbedingungen, wie z.B. eine niedrigere Reaktions-temperatur, getestet werden. Dies könnte einen Einfluss auf die TE-Konformation und Zugänglichkeit der Prolyl-Reste haben. Einfluss könnte ebenfalls die Reaktionszeit sowie die Konzentration der Co-Substrate haben. Da die Hydroxylierung des TEs nativ vermutlich im EBP-TE-Komplex stattfindet, sollte dieser *in vitro* nachgestellt werden. Dies könnte einen entscheidenden Einfluss auf die P4H-Aktivität, deren Hydroxylierungseffizienz und Regioselektivität haben. Nach Optimierung und Skalierung der *in vitro* Hydroxylierung sollte der Einfluss des HyPs, z.B. auf die Koazervationseigenschaften und Quervernetzungsverhalten des TEs, untersucht werden. Das gewonnene HyP-TE könnte zukünftig als vielversprechender, neuer Ausgangsstoff für Biomaterialien dienen.

7 Literatur

- Agerkvist, I. und Enfors, S. O. (1990). "Characterization of *E. coli* cell disintegrates from a bead mill and high pressure homogenizers." *Biotechnol Bioeng.*, **36**, 1083-1089.
- Aguilar, M. I. (2004). "HPLC of Peptides and Proteins - Methods and Protocols." *Humana Press*, 23-27.
- Ahmed, H. (2012). "Investigation on the purification of recombinant human tropoelastin from *Escherichia coli*." Masterarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Annabi, N., Mithieux, S. M., Weiss, A. S. und Dehghani, F. (2010). "Cross-linked open-pore elastic hydrogels based on tropoelastin, elastin and high pressure CO₂." *Biomaterials*, **31**, 1655-1665.
- Annunen, P., Helaakoski, T., Myllyharju, J., Veijola, J., Pihalajaniemi, T. und Kivirikko, K. I. (1997). "Cloning of the human prolyl 4-hydroxylase alpha subunit isoform alpha(II) and characterization of the type II enzyme tetramer. The alpha(I) and alpha(II) subunits do not form a mixed alpha(I) alpha(II)beta2 tetramer" *J Biol Chem.*, **272**, 17342-8.
- Augustin, M., Brocatti, L. K., Rustenbach, S. J., Schäfer, I. und Herberger, K. (2014). "Cost-of-illness of leg ulcers in the community" *Int Wound J.*, **11**, 283-292.
- Baggett, N. E., Zhang, Y. und Gross, C. A. (2017). "Global analysis of translation termination in *E. coli*." *PLoS Genet*, **13**, 1-27.
- Baldock, C., Oberhauser, A. F., Ma, L., Lammie, D., Siegler, V., Mithieux, S. M., Tu, Y., Chow, J. Y. H., Suleman, F., Malfois, M., Rogers, S., Guo, L., Irving, T. C., Wess, T. J. und Weiss, A. S. (2011). "Shape of tropoelastin, the highly extensible protein that controls human tissue elasticity." *PNAS*, **108**, 4322-4327.
- Bax, D. V., Rodgers, U. R., Bilek, M. M. M. und Weiss, A. S. (2009). "Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRR motif and integrin alphaVbeta3." *J Biol Chem.*, **284**, 28616-28623.
- Bellingham, C. M., Lillie, M. A., Gosline, J. M., Wright, G. M., Starcher, B. C., Bailey, A. J., Woodhouse, K. A. und Keeley, F. W. (2003). "Recombinant human elastin polypeptides self-assemble into biomaterials with elastin-like properties." *Biopolymers*, **70**, 445-455.
- Bennasroune, A., Romier-Crouzet, B., Blaise, S., Laffargue, M., Efremov, R. G., Martiny, L., Maurice, P. und Duca, L. (2019). "Elastic fibers and elastin receptor complex: Neuraminidase-1 takes the center stage." *Matrix Biol.*, **84**, 57-67.
- Berg, R. A. und Prockop, D. J. (1973). "The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen" *Biochem Biophys Res Commun.*, **52**, 115-120.
- Bernstein, E. F., Chen, Y. Q., Tamai, K., Shepley, K. J., Resnik, K. S., Zhang, H., Tuan, R., Mauviel, A. und Uitto, J. (1994). "Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin." *J Invest Dermatol.*, **103**, 182-186.
- Blanchevoye, C., Floquet, N., Scandolera, A., Baud, S., Maurice, P., Bocquet, O., Blaise, S., Ghoneim, C., Cantarelli, B., Delacoux, F., Dauchez, M., Efremov, R. G., Martiny, L., Duca, L. und Debelle, L. (2013). "Interaction between the elastin peptide VGVAPG and human elastin binding protein." *J Biol Chem.*, **288**, 1317-1328.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Bochicchio, B., Laurita, A., Heinz, A., Schmelzer, C. E. H. und Pepe, A. (2013). "Investigating the role of (2S,4R)-4-hydroxyproline in elastin model peptides." *Biomacromolecules*, **14**, 4278-4288.
- Böhme, B. (2023). Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (in Bearbeitung).
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brown, P. L., Mecham, L., Tisdale, C. und Mecham, R. P. (1992). "The cysteine residues in the carboxy terminal domain of tropoelastin form an intrachain disulfide bond that

- stabilizes a loop structure and positively charged pocket." *Biochem Biophys Res Commun.*, **186**, 549-555.
- Browne, S., Zeugolis, D. I. und Pandit, A. (2013). "Collagen: finding a solution for the source." *Tissue Eng Part A.*, **19**, 1491-1494.
- Callewaert, B., Renard, M., Huchtagowder, V., Albrecht, B., Hauser, I., Blair, E., Dias, C., Albino, A., Wachi, H., Sato, F., Mecham, R. P., Loyes, B., Coucke, P. J., Paepe, A. D. und Urban, Z. (2011). "New insights into the pathogenesis of autosomal-dominant cutis laxa with report of five ELN mutations." *Human Mutat.*, **32**, 445-455.
- Carey, F. A. (2001). "Organic Chemistry." *The McGraw Companies* 1059.
- Cassab, G. I. (1998). "Plant cell wall proteins." *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **49**, 281-309.
- Castro, C. D., Klose, T., Speciale, I., Lanzetta, R., Molinaro, A., Etten, J. L. V. und Rossmann, M. G. (2017). "Structure of the chlorovirus PBCV-1 major capsid glycoprotein determined by combining crystallographic and carbohydrate molecular modeling approaches." *PNAS*, **115**, E44-E52.
- Chant, E. L. und Summers, D. K. (2007). "Indole signalling contributes to the stable maintenance of Escherichia coli multicopy plasmids." *Mol Microbiol.*, **63**, 35-43.
- Chen, Z., Shin, M. H., Moon, Y. J., Lee, S. R., Kim, Y. K., Seo, J.-E., Kim, J. E., Kim, K. H. und Chung, J. H. (2009). "Modulation of elastin exon 26A mRNA and protein expression in human skin in vivo" *Exp Dermatol.*, **18**, 378-386.
- Chung, E. und Miller, E. J. (1974). "Collagen polymorphism: characterization of molecules with the chain composition (alpha 1 (3)03 in human tissues." *Science*, **183**, 1200-1201.
- Clarke, A. W., Arnspang, E. C., Mithieux, S. M., Korkmaz, E., Braet, F. und Weiss, A. S. (2006). "Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres" *Biochemistry*, **45**, 9989-9996.
- Davis, E. C. (1993). "Stability of elastin in the developing mouse aorta: a quantitative radioautographic study" *Histochemistry.*, **100**, 17-26.
- De Jong, L., Albracht, S. P. und Kemp, A. (1982). "Prolyl 4-hydroxylase activity in relation to the oxidation state of enzyme-bound iron. The role of ascorbate in peptidyl proline hydroxylation." *Biochim Biophys Acta.*, **704**, 326-32.
- De Jong, L. und Kemp, A. (1984). "Stoichiometry and kinetics of the prolyl 4-hydroxylase partial reaction." *Biochim Biophys Acta.*, **787**, 105-111.
- DeFrates, K. G., Moore, R., Borgesi, J., Lin, G., Mulderig, T., Beachley, V. und Hu, X. (2018). "Protein-Based Fiber Materials in Medicine: A Review." *Nanomaterials*, **8**, 1-26.
- Dhivya, S., Padma, V. V. und Santhini, E. (2015). "Wound dressings - a review." *Biomedicine*, **5**, 24-28.
- Diepgen, T. L. (2003). "Demographic changes in Germany. Consequences in health policy and dermatology." *Hautarzt.*, **54**, 804-808.
- Dixit, S., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dosunmu, E., Chaudhari, A., Vig, K., Pillai, S. R., Singh, S. R. und Dennis, V. A. (2017). "Immunological challenges associated with artificial skin grafts: available solutions and stem cells in future design of synthetic skin" *J Biol Eng.*, **11**, 1-23.
- Dodson, G. und Wlodawer, A. (1998). "Catalytic triads and their relatives." *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 347-352.
- Dunnigan, D. D., Cerny, R. L., Baumann, A. T., Roach, J. C., Lane, L. C., Agarkova, I. V., Wulser, K., Yanai-Balser, G. M., Gurnon, J. R., Vitek, J. C., Kronschnabel, B. J., Jeanniard, A., Blanc, G., Upton, C., Duncan, G. A., McClung, O. W., Ma, F. und Etten, J. L. V. (2012). "Paramecium bursaria Chlorella Virus 1 Proteome Reveals Novel Architectural and Regulatory Features of a Giant Virus." *J Virol.*, **86**, 8821-8834.
- Epstein, A. C. R., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y.-M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J. und Ratcliffe, P. J. (2001). "C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation." *Cell*, **107**, 43-54.

- Eriksson, M., Myllyharju, J., Tu, H., Hellman, M. und Kivirikko, K. I. (1999). "Evidence for 4-hydroxyproline in viral proteins. Characterization of a viral prolyl 4-hydroxylase and its peptide substrates." *J Biol Chem.*, **274**, 22131–22134.
- Fazio, M. J., Mattei, M. G., Passage, E., Chu, M. L., Black, D., Solomon, E., Davidson, J. M. und Uitto, J. (1991). "Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7." *Am J Hum Genet.*, **48**, 696-703.
- Fazio, M. J., Olsen, D. R., Kauh, E. A., Baldwin, C. T., Indik, Z., Ornstein-Goldstein, N., Yeh, H., Rosenbloom, J. und Uitto, J. (1988). "Cloning of full-length elastin cDNAs from a human skin fibroblast recombinant cDNA library: further elucidation of alternative splicing utilizing exon-specific oligonucleotides." *J Invest Dermatol.*, **91**, 458-465.
- Fung, Y. C. (1993). "Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues." 2nd ed., Springer-Verlag, New York.
- Fung, Y. C. und Sobin, S. S. (1981). "The retained elasticity of elastin under fixation agents" *J Biomech Eng.*, **103**, 121-122.
- Garsteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. und Bairoch, A. (2005). "Protein identification and analysis tools in the EXPASy server." (In) *John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press*, 571-607.
- Glick, B. R. (1995). "Metabolic load and heterologous gene expression." *Biotechnol Adv.*, **13**, 247-261.
- Godwin, A. R. F., Singh, M., Lockhart-Cairns, M. P., Alanazi, Y. F., Cain, S. A. und Baldock, C. (2019). "The role of fibrillin and microfibril binding proteins in elastin and elastic fibre assembly." *Matrix Biol.*, **84**, 17-30.
- Gorres, K. L. und Raines, R. T. (2010). "Prolyl 4-hydroxylase." *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, **45**, 106–124.
- Grantham, R., Gautier, C., Gouy, M., Mercier, R. und Pavé, A. (1980). "Codon catalog usage and the genome hypothesis." *Nucleic Acids Res.*, **8**, 49-62.
- Gross, E. (1967). "The cyanogen bromide reaction." *Methods Enzymol.*, **11**, 238-255.
- Hartmann-Schreier, J. (2004). "Palmitinsäure, RÖMPP Datenbank, RD-16-00128." Thieme Gruppe, Georg Thieme Verlag.
- Hedtke, T., Schröder, C. U., Heinz, A., Hoehenwarter, W., Brinckmann, J., Groth, T. und Schmelzer, C. E. H. (2019). "A comprehensive map of human elastin cross-linking during elastogenesis." *FEBS J.*, **286**, 3594-3610.
- Heinz, A., Huertas, A. C. M., Schröder, C. U., Pankau, R., Gosch, A. und Schmelzer, C. E. H. (2016). "Elastins from patients with Williams-Beuren syndrome and healthy individuals differ on the molecular level." *Am J Med Genet A.*, **170**, 1832-1842.
- Helaakoski, T., Vuori, K., Myllylä, R., Kivirikko, K. I. und Pihlajaniemi, T. (1989). "Molecular cloning of the alpha-subunit of human prolyl 4-hydroxylase: the complete cDNA-derived amino acid sequence and evidence for alternative splicing of RNA transcripts." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4392-4396.
- Heydt, H. und Hartmann-Schreier, J. (2014). "Ölsäure, RÖMPP Datenbank, RD-15-00354." Thieme Gruppe, Georg Thieme Verlag.
- Heyer, K., Herberger, K., Protz, K., Glaeske, G. und Augustin, M. (2016). "Epidemiology of chronic wounds in Germany: Analysis of statutory health insurance data" *Wound Repair Regen.*, **24**, 434-442.
- Hieta, R. und Myllyharju, J. (2002). "Cloning and characterization of a low molecular weight prolyl 4-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana*. Effective hydroxylation of proline-rich, collagen-like, and hypoxia-inducible transcription factor alpha-like peptides" *J Biol Chem.*, **277**, 23965-71.
- Hinek, A., Keeley, F. W. und Callahan, J. (1995a). "Recycling of the 67-kDa elastin binding protein in arterial myocytes is imperative for secretion of tropoelastin" *Exp Cell Res.*, **220**, 312-24.
- Hinek, A., Keeley, F. W. und Callahan, J. (1995b). "Recycling of the 67-kDa elastin binding protein in arterial myocytes is imperative for secretion of tropoelastin." *Exp Cell Res.*, **220**, 312-324.

- Hinek, A., Pshezhetsky, A. V., Itzstein, M. v. und Starcher, B. (2006). "Lysosomal sialidase (neuraminidase-1) is targeted to the cell surface in a multiprotein complex that facilitates elastic fiber assembly." *J Biol Chem.*, **281**, 3698-3710.
- Holmgren, S. K., Taylor, K. M., Bretscher, L. E. und Raines, R. T. (1998). "Code for collagen's stability deciphered" *Nature.*, **392**, 666-667.
- Huertas, A. C. M., Schmelzer, C. E. H., Hoehenwarter, W., Heyroth, F. und Heinz, A. (2016). "Molecular-level insights into aging processes of skin elastin." *Biochimie*, **128-129**, 163-73.
- Indik, Z., Abrams, W. R., Kucich, U., Gibson, C. W., Mecham, R. P. und Rosenbloom, J. (1990). "Production of recombinant human tropoelastin: characterization and demonstration of immunologic and chemotactic activity" *Arch Biochem Biophys.*, **280**, 80-86.
- Indik, Z., Yeh, H., Ornstein-Goldstein, N., Sheppard, P., Anderson, N., Rosenbloom, J. C., Peltonen, L. und Rosenbloom, J. (1987). "Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA" *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **84**, 5680-5684.
- Jenzsch, M., Gnoth, S., Kleinschmidt, M., Simutis, R. und Lübbert, A. (2006). "Improving the batch-to-batch reproducibility in microbial cultures during recombinant protein production by guiding the process along a predefined total biomass profile." *Bioprocess Biosyst Eng.*, **29**, 315-321.
- Kaelin, W. G. und Ratcliffe, P. J. (2008). "Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway." *Mol Cell.*, **30**, 393-402.
- Kang, M., Dunigan, D. D. und Etten, J. V. (2005). "Chlorovirus: a genus of Phycodnaviridae that infects certain chlorella-like green algae." *Mol Plant Pathol.*, **6**, 213-224.
- Kaska, D. D., Günzler, V., Kivirikko, K. I. und Myllylä, R. (1987). "Characterization of a low-relative-molecular-mass prolyl 4-hydroxylase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*" *Biochem J.*, **241**, 483-90.
- Kastritis, P. L., Moal, I. H., Hwang, H., Weng, Z., Bates, P. A., Bonvin, A. M. J. J. und Janin, J. (2011). "A structure-based benchmark for protein-protein binding affinity." *Protein Sci.*, **20**, 482-491.
- Kelleher, C. M., McLean, S. E. und Mecham, R. P. (2004). "Vascular Extracellular Matrix and Aortic Development." *Curr Top Dev Biol*, **62**, 153-188.
- Keskiaho, K., Hieta, R., Sormunen, R. und Myllyharju, J. (2007). "Chlamydomonas reinhardtii has multiple prolyl 4-hydroxylases, one of which is essential for proper cell wall assembly." *Plant Cell.*, **19**, 256-269.
- Kivirikko, K. I. und Myllyharju, J. (1998). "Prolyl 4-hydroxylases and their protein disulfide isomerase subunit." *Matrix Biol.*, **16**, 357-368.
- Kivirikko, K. I. und Myllylä, R. (1982). "Posttranslational enzymes in the biosynthesis of collagen: intracellular enzymes." *Methods Enzymol.*, **82**, 245-304.
- Korpimäki, T., Kurittu, J. und Karp, M. (2003). "Surprisingly fast disappearance of beta-lactam selection pressure in cultivation as detected with novel biosensing approaches." *J Microbiol Methods.*, **53**, 37-42.
- Koski, M. K., Anantharajan, J., Kursula, P., Dhavala, P., Murthy, A. V., Bergmann, U., Myllyharju, J. und Wierenga, R. K. (2017). "Assembly of the elongated collagen prolyl 4-hydroxylase $\alpha 2 \beta 2$ heterotetramer around a central $\alpha 2$ dimer." *Biochem J.*, **474**, 751-769.
- Kröger, K. und Jöster, M. (2018). "Prevalence of Chronic Wounds in Different Modalities of Care in Germany." *EWMA J.*, **19**, 45-49.
- Kukkola, L., Hieta, R., Kivirikko, K. I. und Myllyharju, J. (2003). "Identification and characterization of a third human, rat, and mouse collagen prolyl 4-hydroxylase isoenzyme" *J Biol Chem.*, **278**, 47685-93.
- Kumar, J., Chauhan, A. S., Shah, R. L., Gupta, J. A. und Rathore, A. S. (2020). "Amino acid supplementation for enhancing recombinant protein production in *E. coli*." *Biotechnol Bioeng.*, **117**, 2420-2433.
- Kutish, G. F., Li, Y., Lu, Z., Furuta, M., Rock, D. L. und Etten, J. L. V. (1996). "Analysis of 76 kb of the chlorella virus PBCV-1 330-kb genome: map positions 182 to 258." *Virology*, **223**, 303-317.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680-685.
- Langley, G. W., Abboud, M. I., Lohans, C. T. und Schofield, C. J. (2019). "Inhibition of a viral prolyl hydroxylase." *Bioorg Med Chem.*, **27**, 2405-2412.
- Li, Y., Lu, Z., Burbank, D. E., Kutish, G. F., Rock, D. L. und Etten, J. L. V. (1995). "Analysis of 43 kb of the Chlorella virus PBCV-1 330-kb genome: map positions 45 to 88." *Virology*, **212**, 134-150.
- Li, Y., Lu, Z., Sun, L., Ropp, S., Kutish, G. F., Rock, D. L. und Etten, J. L. V. (1997). "Analysis of 74 kb of DNA located at the right end of the 330-kb chlorella virus PBCV-1 genome." *Virology*, **237**, 360-377.
- Longbotham, J. E., Levy, C., Johannissen, L. O., Tarhonskaya, H., Jiang, S., Loenarz, C., Flashman, E., Hay, S., Schofield, C. J. und Scrutton, N. S. (2015). "Structure and Mechanism of a Viral Collagen Prolyl Hydroxylase." *Biochemistry*, **54**, 6093-6105.
- Lu, Z., Li, Y., Que, Q., Kutish, G. F., Rock, D. L. und Etten, J. L. V. (1996). "Analysis of 94 kb of the chlorella virus PBCV-1 330-kb genome: map positions 88 to 182." *Virology*, **216**, 102-123.
- Lu, Z., Li, Y., Zhang, Y., Kutish, G. F., Rock, D. L. und Etten, J. L. V. (1995). "Analysis of 45 kb of DNA located at the left end of the chlorella virus PBCV-1 genome." *Virology*, **206**, 339-352.
- Markova, A. und Mostow, E. N. (2012). "US skin disease assessment: ulcer and wound care." *Dermatol Clin.*, **30**, 107-111.
- Martens, M. A., Wilson, S. J. und Reutens, D. C. (2008). "Research Review: Williams syndrome: a critical review of the cognitive, behavioral, and neuroanatomical phenotype." *J Child Psychol Psychiatry.*, **49**, 576-608.
- Martin, S. L., Vrhovski, B. und Weiss, A. S. (1995). "Total synthesis and expression in Escherichia coli of a gene encoding human tropoelastin." *Gene*, **154**, 159-166.
- McLean, S. E., Mecham, B. H., Kelleher, C. M., Mariani, T. J. und Mecham, R. P. (2005). "Extracellular matrix gene expression in the developing mouse aorta." *Adv Dev Biol*, **15**, 81-128.
- Mecham, R. P. (2008). "Methods in elastic tissue biology: elastin isolation and purification." *Methods.*, **45**, 32-41.
- Mecham, R. P., Levy, B. D., Morris, S. L., Madaras, J. G. und Wrenn, D. S. (1985). "Increased cyclic GMP levels lead to a stimulation of elastin production in ligament fibroblasts that is reversed by cyclic AMP." *J. Biol. Chem.*, **260**, 3255-3258.
- Micale, L., Turturo, M. G., Augello, B., Jurado, L. A., Izzi, C., Digilio, M. C., Milani, D., Lapi, E., Zelante, L. und Merla, G. (2009). "Identification and characterization of seven novel mutations of elastin gene in a cohort of patients affected by supravalvular aortic stenosis." *Eur J Hum Genet.*, **18**, 317-323.
- Mikawa, Y., Hamagami, H., Shikata, J. und Yamamuro, T. (1986). "Elastin in the human intervertebral disk. A histological and biochemical study comparing it with elastin in the human yellow ligament." *Arch Orthop Trauma Surg.*, **105**, 343-349.
- Miranda-Nieves, D. und Chaikof, E. (2017). "Collagen and Elastin Biomaterials for the Fabrication of Engineered Living Tissues." *ACS Biomater Sci Eng.*, **3**, 694-711.
- Mithieux, S. M., Aghaei-Ghareh-Bolagh, B., Yan, L., Kuppan, K. V., Wang, Y., Garces-Suarez, F., Li, Z., Maitz, P. K., Carter, E. A., Limantoro, C., Chrzanowski, W., Cookson, D., Riboldi-Tunnicliffe, A., Baldock, C., Ohgo, K., Kumashiro, K. K., Edwards, G. und Weiss, A. S. (2018). "Tropoelastin Implants That Accelerate Wound Repair." *Adv Healthc Mater.*, **7**, 1-12.
- Mithieux, S. M., Rasko, J. E. J. und Weiss, A. S. (2004). "Synthetic elastin hydrogels derived from massive elastic assemblies of self-organized human protein monomers." *Biomaterials*, **25**, 4921-4927.
- Mithieux, S. M. und Weiss, A. S. (2005). "Elastin." *Adv in Protein Chem.*, **70**, 437-461.
- Mithieux, S. M., Wise, S. G., Raftery, M. J., Starcher, B. und Weiss, A. S. (2005). "A model two-component system for studying the architecture of elastin assembly in vitro." *J Struct Biol.*, **149**, 282-289.

- Morris, C. A. und Mervis, C. B. (2000). "Williams syndrome and related disorders" *Annu Rev Genomics Hum Genet.*, **1**, 461-484.
- Muiznieks, L. D. und Weiss, A. S. (2007). "Flexibility in the solution structure of human tropoelastin." *Biochemistry*, **46**, 8196-8205.
- Myllyharju, J. (2003). "Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis." *Matrix Biol.*, **22**, 15-24.
- Myllyharju, J. und Kivirikko, K. I. (1997). "Characterization of the iron- and 2-oxoglutaratebinding sites of human prolyl 4-hydroxylase." *EMBO J.*, **16**, 1173-80.
- Myllylä, R., Majamaa, K., Günzler, V., Hanauske-Abel, H. M. und Kivirikko, K. I. (1984). "Ascorbate is consumed stoichiometrically in the uncoupled reactions catalyzed by prolyl 4-hydroxylase and lysyl hydroxylase." *J Biol Chem.*, 5403-5405.
- Narayanan, A. S., Sandberg, L. B., Ross, R. und Layman, D. L. (1976). "The smooth muscle cell. III. Elastin synthesis in arterial smooth muscle cell culture." *J. Cell Biol.*, **68**, 411-419.
- Neubauer, A., Neubauer, P. und Myllyharju, J. (2005). "High-level production of human collagen prolyl 4-hydroxylase in *Escherichia coli*." *Matrix Biol.*, **24**, 59-68.
- Nietfeld, J. J. und Kemp, A. (1980). "Properties of prolyl 4-hydroxylase containing firmly-bound iron." *Biochim Biophys Acta.*, **613**, 349-358.
- Nissi, R., Autio-Harminen, H., Marttila, P., Sormunen, R. und Kivirikko, K. I. (2001). "Prolyl 4-hydroxylase isoenzymes I and II have different expression patterns in several human tissues." *J. Histochem Cytochem.*, **49**, 1143-53.
- Partridge, S. M., Davis, H. F. und Adair, G. S. (1955). "The chemistry of connective tissues." *Biochem. J.*, **61**, 11-21.
- Patient, M. E. und Summers, D. K. (1993). "ColE1 multimer formation triggers inhibition of *Escherichia coli* cell division." *Mol Microbiol.*, **9**, 1089-1095.
- Peubez, I., Chaudet, N., Mignon, C., Hild, G., Husson, S., Courtois, V., De Luca, K., Speck, D. und Sodoyer, R. (2010). "Antibiotic-free selection in *E. coli*: new considerations for optimal design and improved production." *Microb Cell Fact.*, **9**, 1-10.
- Poersch, M. (2018). "Spezielle Wundversorgung wächst." *MTD-Verlag GmbH*, **9/2018**, 62-63.
- Privitera, S., Prody, C. A., Callahan, J. W. und Hinek, A. (1998). "The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein." *J Biol Chem.*, **273**, 6319-6326.
- Prockop, D. J. und Juva, K. (1965). "Hydroxylation of proline in particulate fractions from cartilage." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 54-59.
- Reichheld, S. E., Muiznieks, L. D., Lu, R., Sharpe, S. und Keeley, F. W. (2019). "Sequence variants of human tropoelastin affecting assembly, structural characteristics and functional properties of polymeric elastin in health and disease." *Matrix Biol.*, **84**, 68-80.
- Rnjak-Kovacina, J., Wise, S. G., Li, Z., Maitz, P. K. M., Young, C. J., Wang, Y. und Weiss, A. S. (2011). "Tailoring the porosity and pore size of electrospun synthetic human elastin scaffolds for dermal tissue engineering." *Biomaterials*, **32**, 6729-6736.
- Rutschmann, C., Baumann, S., Cabalzar, J., Luther, K. B. und Hennet, T. (2014). "Recombinant expression of hydroxylated human collagen in *Escherichia coli*." *Appl Microbiol Biotechnol.*, **98**, 4445-4455.
- Sage, H. (1982). "Structure-function relationship in the evolution of elastin." *J Invest Dermatol.*, **79**, 146-153.
- Schmelzer, C. E. H. und Duca, L. (2021). "Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease." *FEBS J.*, 1-27.
- Schmelzer, C. E. H., Jung, M. C., Wohlrab, J., Neubert, R. H. H. und Heinz, A. (2012). "Does human leukocyte elastase degrade intact skin elastin? ." *FEBS J.*, **279**, 4191-200.
- Schmelzer, C. E. H., Nagel, M. B. M., Dziomba, S., Merker, Y., Sivan, S. S. und Heinz, A. (2016). "Prolyl hydroxylation in elastin is not random." *Biochim Biophys Acta.*, **1860**, 2169-2177.
- Shapiro, S. D., Endicott, S. K., Province, M. A., Pierce, J. A. und Campbell, E. J. (1991). "Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence

- of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon " *J. Clin Invest.*, **87**, 1828-1834.
- Shi, J., Ma, X., Gao, Y., Fan, D., Zhu, C., Mi, Y. und Xue, W. (2017). "Hydroxylation of Human Type III Collagen Alpha Chain by Recombinant Coexpression with a Viral Prolyl 4-Hydroxylase in *Escherichia coli*." *Protein J.*, **36**, 322-331.
- Shoulders, M. D. und Raines, R. T. (2009). "Collagen structure and stability." *Annu Rev Biochem.*, **78**, 929-958.
- Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J. und Li, Q. (2009). "Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*." *Protein Sci.*, **18**, 936-948.
- Studier, F. W. (2018). "T7 expression systems for inducible production of proteins from cloned genes in *E. coli*." *Curr Protoc Mol Biol.*, **124**.
- Sturm, R. M., Dowell, J. A. und Li, L. (2010). "Rat Brain Neuropeptidomics: Tissue Collection, Protease Inhibition, Neuropeptide Extraction, and Mass Spectrometric Analysis." *Methods Mol Biol.*, **615**, 217-226.
- Summers, D. K., Beton, C. W. H. und Withers, H. L. (1993). "Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis." *Mol Microbiol.*, **8**, 1031-1038.
- Summers, D. K. und Sherratt, D. J. (1988). "Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site." *EMBO J.*, **7**, 851-858.
- Szabo, Z., Levi-Minzi, S. A., Christiano, A. M., Struminger, C., Stoneking, M., Batzer, M. A. und Boyd, C. D. (1999). "Sequential loss of two neighboring exons of the tropoelastin gene during primate evolution." *J Mol Evol.*, **49**, 664-671.
- Tamburro, A. M., Pepe, A. und Bochicchio, B. (2006). "Localizing alpha-helices in human tropoelastin: assembly of the elastin "puzzle"." *Biochemistry*, **45**, 9518-9530.
- Tarakanova, A., Yeo, G. C., Baldock, C., Weiss, A. und Buehler, M. J. (2019). "Tropoelastin is a Flexible Molecule that Retains its Canonical Shape " *Macromol Biosci.*, **19**, 1-7.
- Tarakanova, A., Yeo, G. C., Baldock, C., Weiss, A. S. und Buehler, M. J. (2018). "Molecular model of human tropoelastin and implications of associated mutations." *PNAS*, **115**, 7338-7343.
- Toonkool, P., Jensen, S. A., Maxwell, A. L. und Weiss, A. S. (2001). "Hydrophobic domains of human tropoelastin interact in a context-dependent manner." *J Biol Chem.*, **276**, 44575-44580.
- Tu, Y., Wise, S. G. und Weiss, A. S. (2010). "Stages in tropoelastin coalescence during synthetic elastin hydrogel formation." *Micron*, **41**, 268-272.
- Tuderman, L., Kuutti, E. R. und Kivirikko, K. I. (1975). "An affinity-column procedure using poly(L-proline) for the purification of prolyl hydroxylase. Purification of the enzyme from chick embryos " *Eur J Biochem.*, **52**, 9-16.
- Uitto, J. (1979a). "Biochemistry of the elastic fibers in normal connective tissues and its alterations in diseases." *J Invest Dermatol.*, **72**, 1-10.
- Uitto, J. (1979b). "Collagen polymorphism: isolation and partial characterization of alpha 1(I)-trimer molecules in normal human skin." *Arch Biochem Biophys.*, **192**, 371-379.
- Urry, D. W., Sugano, H., Prasad, K. U., Long, M. M. und Bhatnagar, R. S. (1979). "Prolyl hydroxylation of the polypentapeptide model of elastin impairs fiber formation." *Biochem Biophys Res Commun.*, **90**, 194-198.
- Vasta, J. D. und Raines, R. T. (2016). "Human collagen prolyl 4-hydroxylase is activated by ligands for its iron center." *Biochemistry*, **55**, 3224-3233.
- Vasta, J. D. und Raines, R. T. (2018). "Collagen Prolyl 4-Hydroxylase as a Therapeutic Target." *J. Med Chem.*, **61**, 10403-10411.
- Vrhovski, B., Jensen, S. und Weiss, A. S. (1997). "Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin." *Eur. J. Biochem.*, **250**, 92-98.
- Vrhovski, B. und Weiss, A. S. (1998). "Biochemistry of tropoelastin." *Eur. J. Biochem.*, **258**, 1-18.
- Vuori, K., Pihlajaniemi, T., Marttila, M. und Kivirikko, K. I. (1992a). "Characterization of the human prolyl 4-hydroxylase tetramer and its multifunctional protein disulfide-isomerase

- subunit synthesized in a baculovirus expression system." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7467-7470.
- Vuori, K., Pihlajaniemi, T., Myllylä, R. und Kivirikko, K. I. (1992b). "Site-directed mutagenesis of human protein disulphide isomerase: effect on the assembly, activity and endoplasmic reticulum retention of human prolyl 4-hydroxylase in *Spodoptera frugiperda* insect cells." *EMBO J.*, **11**, 4213-7.
- Vyas, V. V., Gupta, S. und Sharma, P. (1994). "Stability of a recombinant shuttle plasmid in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*." *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 240-246.
- Wagner, O., Bauer, K., Irion, E., Rauenbusch, E., Kaufmann, W. und Arens, A. (1969). "Polyethylene glycol for fractionation and crystallization of L-asparaginase." *Angew. Chem. internat. Edit.*, **8**, 885-886.
- Weinstein, G. D. und Boucek, R. J. (1960). "Collagen and elastin of human dermis." *J Invest Dermatol.*, **35**, 227-9.
- Wise, S. G. und Weiss, A. S. (2009). "Tropoelastin." *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 494-7.
- Wright, G. D. und Thompson, P. R. (1999). "Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism." *Front Biosci.*, **4**, 9-21.
- Yeo, G. C., Aghaei-Ghareh-Bolagh, B., Brackenreg, E. P., Hiob, M. A., Lee, P. und Weiss, A. S. (2015). "Fabricated Elastin." *Adv Healthc Mater.*, **4**, 2530-2556.
- Yeo, G. C., Keeley, F. W. und Weiss, A. S. (2011). "Coacervation of tropoelastin." *Adv Colloid Interface Sci.*, **167**, 94-103.

8 Anhang

AATGGTGCATGCC**CCGGAAATACAGGAACGCACGCTGGATGGCCCTTCGCTGGGATGGTGAACCATGA**
AAAATGGCAGCTTCAGTGGATTAAGTGGGGGTAATGTGGCCTGTACCCTCTGTTGCATAGGTATTCA
TACGGTTAAAATTTATCAGGCGGATCGCGGCAGTTTTTTCGGGTGGTTTTGTTGCCATTTTTACCTGTC
TGCTGCCGTGATCGCGCTGAACGCGTTTTTAGCGGTGCGTACAATTAAGGGATTATGGTAAATCCACTT
ACTGCTGCCCTCGTAGCCATCGAGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCC
 TGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATCGG
 TGATGTGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGTATGCCGGCCACGATGCGTCCG
 GCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGAT
 AACAATCCCCTCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATAACCATGGGTGGTGTCCGG
GTGCGATTCCGGGCGGTGTGCCGGTGGTGTTTTTTATCCGGGTGCGGGTCTGGGTGCGCTGGGTGGT
GGTGCCTGGGTCCGGGTGGTAAACCGCTGAAACCGGTTCCGGGTGGTCTGGCGGTGCAGGCCTGGG
CGCAGTCTGGGTGCATTTCCGGCGGTTACCTTCCGGGTGCGCTGGTGCCGGGTGGCGTTGCGGATG
CGGCGGCAGCGTATAAAGCGGCGAAAGCAGGCGGGTCTGGGCGCGTTCGGGTGTTGGTGGTCTG
GGTGTAGCGCGGGTGCAGTTGTTCCGCGAGCCGGTGCAGGTGTTAAACCGGGTAAAGTCCGGGCGT
TGGTCTGCCGGGTGTTTACCCGGGTGGTGTGCTGCCGGGTGCACGTTTTCCGGGTGTGGGCGTTCTGC
CGGGCGTTCCGACCGGTGCGGGTGTAAACCGAAAGCGCCGGTGTGGCGGCGCATTTGCGGGTATT
CCGGGCGTGGGTCCGTTTGGTGGTCCGCAACCGGGTGTCCGCTGGGTATCCGATTAAAGCGCCGAA
ACTGCCGGGTGGTTATGGTCTGCCGTATAACCACCGGTAAACTGCCGTATGGCTATGGCCCGGTGGCG
TGGCAGGTGCAGCGGGTAAAGCGGGTATCCGACCGGCACCGGTGTTGGTCCGCAGGCGGCAGCGGCA
GCGGCGGCAAAGCGGCAGCGAAAATTTGGCGCAGGTGCGGCAGGTGTCTGCCGGGCGTGGGCGGTG
GGGCGTGCCGGGTGTCCGGGTGCAATCCGGGTATTGGTGGTATTGCGGGTGTGGCACCCGGCAG
CAGCGGCAGCTGCAGCAGCAGCCGCGAAAGCGGCAAATATGGCGCGCAGCGGGTCTGGTTCCGGGC
GGTCCGGTTTTTGGTCCGGGTGTGGTGGGTGTCCGGGCGCAGGTGTGCCGGGCGTTGGCGTCCCGG
TGCCGGTATTCCGGTTGTGCCGGGTGCGGGCATTCGGGTGCAGCAGTTCCGGGTGTGCTTAGCCCGG
AAGCGGCAGCAAAGCAGCGCAAAGCCGCGAAATACGGCGCACCCCGGTGTGGGTGTGGGTGGT
ATTCGACCTATGGTGTGGTGCAGGTGGTTTTTCCGGGCTTTGGTGTGGCGTTGGCGGCATCCCGGG
TGTTGCAGGTGTTCCGTCTGTTGGTGGCGTTCCGGGCGTCCGCGGCGTCCCGGCGTGGGTATTTCTC
CGAAAGCGCAGGCGGCTGCTGCAGCCAAAGCAGCTAAATATGGCGTTGGTACGCCGGCTGCGGCAGCA
GCGAAAGCTGCGGCGAAAGCGGCCAGTTTTGGTCTGGTTCCAGGTGTTGGCGTTGCGCCAGGTGTGGG
TGTTGCACCGGGCGTGGGCGTTGCACCTGGTGTGGCTGGCACCGGGTGTAGGTGTGGCGCCTGGCG
TTGGTGTGGCCCCAGGTGTTGGTGTAGCTCCGGTATTGGCCAGGTGGTGTGCAGCAGCGGCGAAA
TCTGCAGCAAAGTGGCGGCCAAAGCGCAGCTGCGTGCGGCGGCAGGCCTGGGTGCGGGTATCCCGGG
TCTGGGTGTTGGTGTGGTGTGCCGGCCCTGGGTGTGGGTGCAGGCGTTCCGGTCTGGGCGTGGGCG
CTGGTGTCCCGGGCTTCGGTGCAGTGCCGGGTGCCCTGGCAGCAGCAAAGCGGCGAAATATGGCGCT
GCTGTCCGGGCGTGCTGGGTGGTCTGGGCGCCCTGGGCGGTGTTGGTATTCCGGGTGGCGTCTGTTG
TGCGGGTCCGGCGGCAGCAGCTGCGGCTGCGAAAGCAGCTGCCAAAGCAGCGCAATTTGGCCTGGTTG
GTGCGGCTGGTCTGGGCGGTCTGGGTGTGCGCGCCTGGGCGTCCCGGTGTGGGCGGCTGGGTGGC
ATTCGCCCGGCAGCCGAGCGCAAAGCAGCCAAATACGGCGCTGCAGGTCTGGGCGGTGTTCTGGGCGG
TGCAGGTCAGTTTCCGCTGGGCGGTGTGGCGGCACGTCCGGTTTTCGGTCTGAGCCCGATTTTTCCGG
GTGGTGCCTGTCTGGGTAAAGCGTGTGGCCGTAAACGCAAATAATGATGAGGATCC

Abb. 8-1 Ausschnitt aus der Sequenz von pET28a(+)_{cer}_TE (alias pBS35_TE) (5' → 3'). Markiert sind die *cer*-Sequenz (**fett**) sowie die DNA-Sequenz (unterstrichen) für humanes Tropoelastin (Isoform 2, GenBank Eintrag: AAC98394, AS 27-724) inklusive zwei zusätzlicher Stop-Codone.

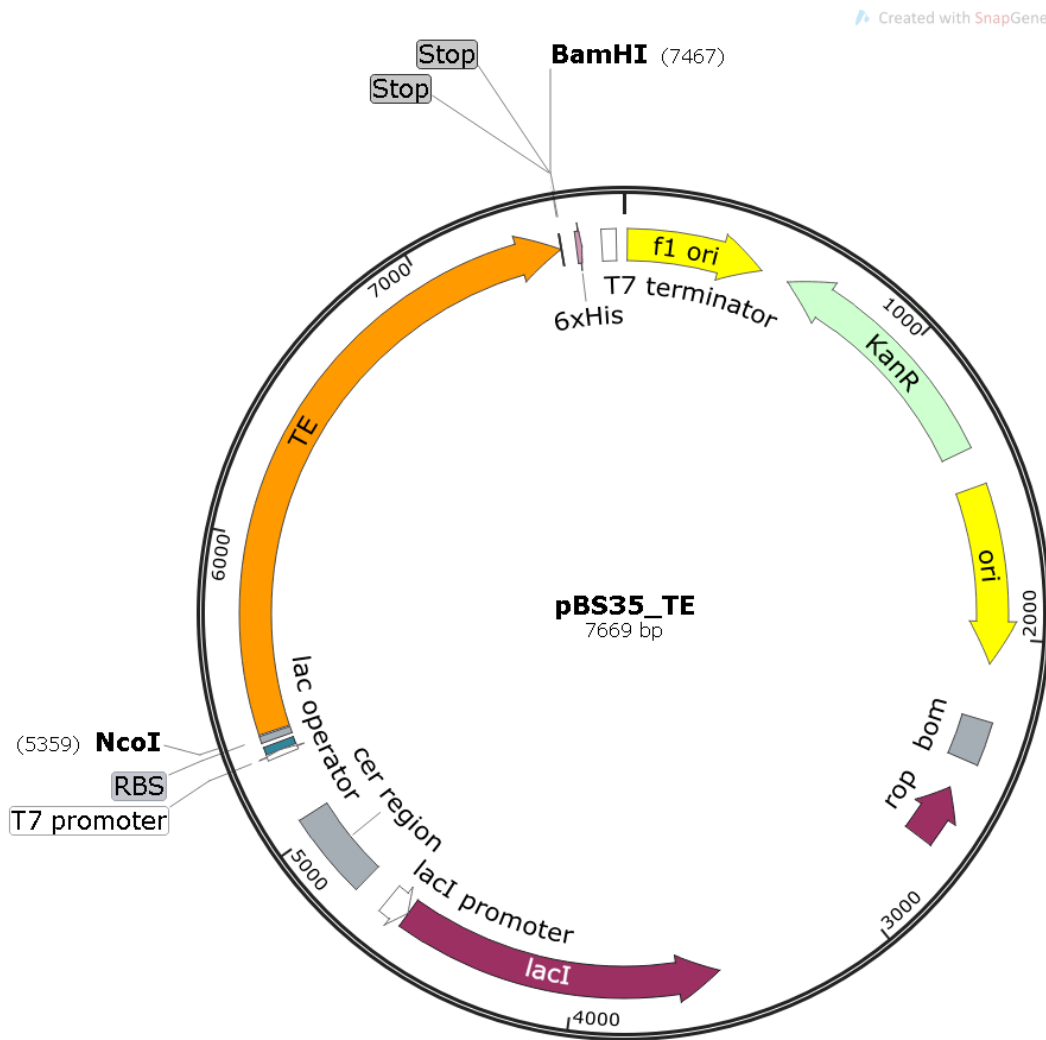


Abb. 8-2 Plasmidkarte pET-28a(+)_cer_TE alias pBS35_TE.

```

      10      20      30      40      50      60
GGVPGAIPGG VPGGVFYPGA GLGALGGGAL GPGGKPLKPV PGLLAGAGLG AGLGAFPAVT
      70      80      90      100     110     120
FPGALVPGGV ADAAAAYKAA KAGAGLGGVP GVGGLGVSAG AVVPQPGAGV KPGKVPGVGL
      130     140     150     160     170     180
PGVYPGGVLP GARFPGVGVL PGVPTGAGVK PKAPGVGGAF AGIPGVGPFV GPQPGVPLGY
      190     200     210     220     230     240
PIKAPKLPGG YGLPYTTGKL PYGYGPGGVA GAAGKAGYPT GTGVGPQAAA AAAAAKAAKF
      250     260     270     280     290     300
GAGAAGVLPV VGGAGVPGVP GAIPGIGGIA GVGTPAAAAA AAAAAKAAKY GAAAGLVPGG
      310     320     330     340     350     360
PGFPGVVGIV PGAGVPGVGV PGAGIPVVPV AGIPGAAVPG VVSPEAAAKA AAKAAKYGAR
      370     380     390     400     410     420
PGVGVGGIPT YGVGAGGFPG FGVGVGGIPV VAGVPSVGGV PGVGGVPGVGV ISPEAQAAAA
      430     440     450     460     470     480
AKAAKYGVGT PAAAAAKAAA KAAQFGLVPG VGVAPGVGVA PGVGVAPGVG LAPGVGVAPG
      490     500     510     520     530     540
VGVAPGVGVA PGIGPGGVAA AAKSAAKVAA KAQLRAAAGL GAGIPGLGVG VGVPLGVGVA
      550     560     570     580     590     600
GVPGLGVGAG VPGFGAVPGA LAAAKAAKYG AAVPVLGGL GALGGVGIPI GVVGAGPAAA
      610     620     630     640     650     660
AAAAKAAKA AQFGLVGAAG LGGLGVGGLG VPGVGLGGI PPAKAAKAAK YGAAGLGGVL
      670     680     690
GGAGQFPLGG VAARPGFGLS PIFPGGACLG KACGRKRK

```

Number of amino acids: 698

Molecular weight: 60016.95

Theoretical pI: 10.37

Amino acid composition:

Ala (A)	157	22.5%
Arg (R)	6	0.9%
Asn (N)	0	0.0%
Asp (D)	1	0.1%
Cys (C)	2	0.3%
Gln (Q)	8	1.1%
Glu (E)	2	0.3%
Gly (G)	208	29.8%
His (H)	0	0.0%
Ile (I)	16	2.3%
Leu (L)	40	5.7%
Lys (K)	35	5.0%
Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	16	2.3%
Pro (P)	86	12.3%
Ser (S)	6	0.9%
Thr (T)	9	1.3%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	15	2.1%
Val (V)	91	13.0%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Extinction coefficients:

Ext. coefficient 22350 M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water
 Abs 0.1% (=1 g/l) 0.372, assuming all Cys residues are reduced

Abb. 8-3 ExPASy ProtParam [Garsteiger et al., 2005] Analyse für humanes Tropoelastin (Isoform 2, GenBank Eintrag: AAC98394, AS 27 – 724, ohne Signalpeptid) ohne posttranslationale Modifikationen.

10	20	30	40	50	60	70	80
MAGL	TAAAPR	PGV	LLLLLSI	LHPSR	PGGV	P	GAI
1		2		3		4	
90	100	110	120	130	140	150	160
AF	PAVT	PGA	LV	PGGV	VADAA	AAY	KAAKAGA
6			7			8	
170	180	190	200	210	220	230	240
PG	VGVLP	PGV	TP	GAGV	KPK	P	GVGGAFAGI
10		11		12		13	
250	260	270	280	290	300	310	320
KAGY	PTGT	GV	GP	QAAAAA	AAAA	KAAAK	FGAGA
15			16			17	
330	340	350	360	370	380	390	400
GLV	PGG	PGFG	PGV	VGV	PGAG	V	PGVGV
18				19			
410	420	430	440	450	460	470	480
AGGF	PGFG	VGV	VGGI	PGVAG	PSV	GGV	PGVGV
20				21		23	
490	500	510	520	530	540	550	560
PG	VGVAP	PGV	VAP	PGVGLAP	PG	VGVAP	PGVGV
24				25			
570	580	590	600	610	620	630	640
GLG	VGAGV	PG	LG	VGAGV	PGF	GAV	PGALAAA
26		27		28		29	
650	660	670	680	690	700	710	720
LVGA	AGLGL	GL	VGLGV	PGV	GGLGGI	PPAA	AKAAKYGAA
30			31			32	
33		36					
RRRK							

Abb. 8-4 Aminosäuresequenz und Domäneneinteilung von humanem Tropoelastin (Isoform 2, GenBank Eintrag: AAC98394, AS 1 – 724) nach [Schmelzer und Duca, 2021]. Markiert sind das Signalpeptid (gelb), hydrophobe Domänen (hellgrau), hydrophile KP- (hellrot) bzw. KA-Quervernetzungsdomänen (dunkelrot), Domäne 36 (grün) sowie nicht-hydroxylierte bzw. nicht detektierte Prolyl-Reste (P) und partiell hydroxylierte Prolyl-Reste (P) nach [Schmelzer et al., 2016]. Bei der Analyse wurden 81 der 86 Prolyl-Reste (ohne Signalpeptid) nachgewiesen.

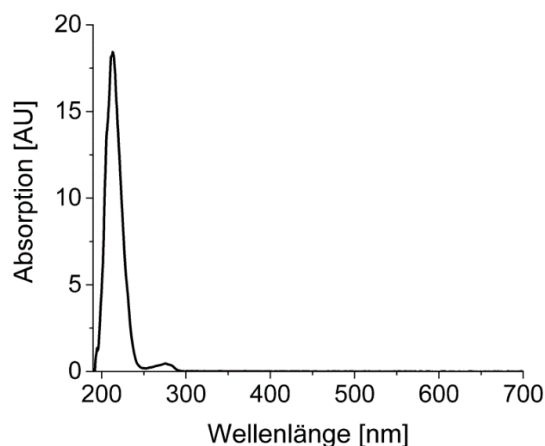


Abb. 8-5 UV-Vis Spektrum von gereinigtem Tropoelastin (Isoform 2, GenBank Eintrag: AAC98394, AS 27 – 724, ohne Signalpeptid) nach Kationenaustauschchromatographie. 1 mg/mL gelöst in dH₂O.

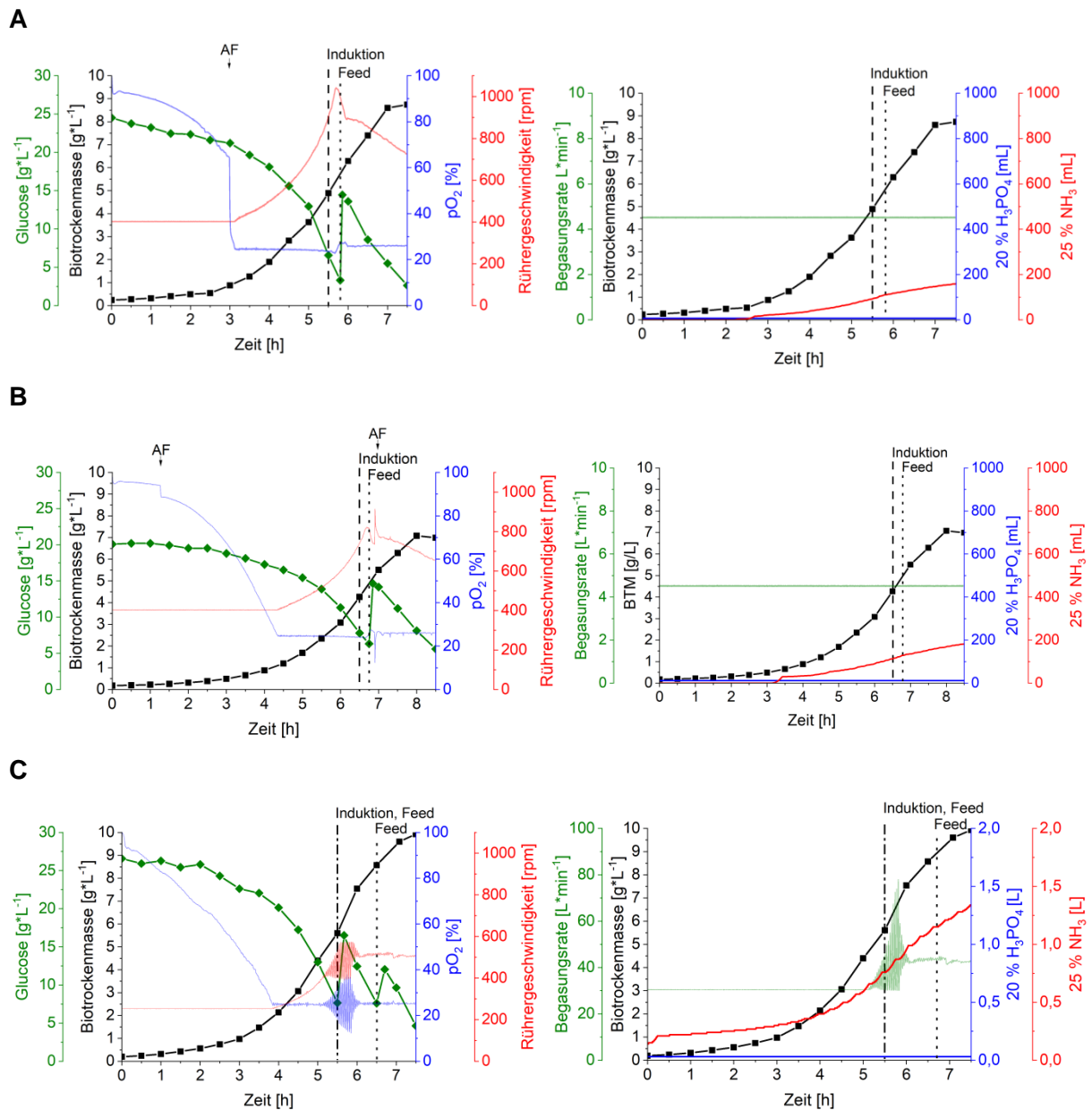


Abb. 8-6 Übersicht der Prozessdaten zur Produktion von rekombinatem, humanem Tropoelastin (Isoform 2, GenBank Eintrag: AAC98394, AS 27 – 724, ohne Signalpeptid) in *E. coli* BL21-Gold(DE3) im Bioreaktormaßstab. (A) & (B) Fermentation 1 & 2 mit 12 L Kulturvolumen im Biostat C 30 L; (C) Fermentation 3 mit 100 L Kulturvolumen in Biostat D 200 L. Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgte nach manueller Messung der optischen Dichte (schwarz). (Links) Manuelle Messung der Glucose-Konzentration (grün) sowie Sauerstoffpartialdruck pO_2 (blau) und Rückgeschwindigkeit (rot). (Rechts) Wert der Begasungsrate (grün) sowie des verbrauchten Volumens an Säure H_3PO_4 (blau) bzw. Base 25 % NH_3 -Lösung (rot). Die Zugabe des Induktors bzw. des Feed-Pulses sind durch Linien markiert. Die manuelle Zugabe von Antischaummittel ist durch Pfeile (AF) markiert. Schwankungen des pO_2 -Wertes im 100 L-Maßstab und in Folge der Rührgeschwindigkeit und der Begasungsrate sind vermutlich auf ein Messproblem der pO_2 -Sonde zurückzuführen.

Tab. 8-1 Übersicht der mittels ESI-QTOF-MS/MS nachgewiesenen Peptide der Proteinidentifikation.

Protein	Peptide	Label	Start	End	Modifiers	Calculated Peptide Mass (Da)	b/y Possible	Control RT (Min)	Control m/z	Control Charge State	Control Mass (Da)	Control Intensity (Counts)	Control ADC Response	Control b/y Found	Control Assigned Intensity (%)	Control b/y %	Control b/y List	Control Mass Error (ppm)	Control % Modified
ELN	GGVPGAIPGGVPGVFPYAGLGGALGGALGGK	1:T001	1	35		2887.5344	68	19.2	963.5217	3	2887.5413	505679	17640500	50	71.9	73.5	b3;b4;b5;b6;b7;b8;b9;b10;b11;b12;b13;b14;b15;b16;b17;b20;b21;b22;b25;b26;b27;b30;b31;b33;b34;y1;y2;y3;y4;y5;y6;y7;y8;y9;y10;y11;y12;y13;y14;y15;y16;y17;y18;y20;y24;y26;y28;y29;y32;y34	2.4	100
ELN	PLKPVGGLAGAGLGGALGAFPAVTFPGALVPGGVADA AAAYK	1:T002-003	37	79		3843.1086	84	20.9	961.7877	4	3843.1191	41982	1977446	13	41.9	15.5	b13;b17;b20;b29;b30;b31;y2;y4;y7;y8;y11;y12;y13	2.7	17.7
ELN	PVPGGLAGAGLGGALGAFPAVTFPGALVPGGVADAAAA YK	1:T003	40	79		3504.8767	78	21.2	877.2299	4	3504.8877	3973	168570	4	0.2	5.1	b2;b6;y4;y26	3.1	100
ELN	AGAGLGGVPGVGGGLGVSAGAVVPPQPGAQVK	1:T005	83	112		2455.3545	58	17.2	819.4595	3	2455.3547	101921	3919362	31	75.7	53.4	b2;b4;b5;b7;b8;b10;b11;b13;b14;b15;b16;b17;b18;b19;b20;b21;b22;b23;b24;b27;y6;y7;y8;y9;y10;y11;y12;y13;y14;y22;y25	0.1	100
ELN	AGAGLGGVPGVGGGLGVSAGAVVPPQPGAQVKPKG	1:T005-006	83	115		2737.5237	64	16.4	913.5177	3	2737.5293	586336	38470220	46	88.2	71.9	b2;b3;b4;b5;b6;b7;b8;b11;b12;b13;b14;b15;b16;b17;b18;b19;b20;b21;b22;b27;b28;b29;y2;y3;y4;y6;y8;y9;y11;y12;y13;y14;y15;y16;y17;y19;y20;y23;y24;y25;y26;y27;y28;y29;y30;y31	2	99.9
ELN	AGAGLGGVPGVGGGLGVSAGAVVPPQPGAQVKPKG	1:T005-006	83	115		2737.5237	64	22.8	913.5165	3	2737.5259	1269	48430	3	17.6	4.7	b8;y11;y25	0.8	0.1
ELN	PGKVPGLPGVYVPGVLPGAR	1:T006-007	113	134		2043.1628	42	16.5	682.0633	3	2043.166	7009	306251	7	25.2	16.7	y5;y7;y8;y9;y10;y13;y18	1.6	100
ELN	VPGVGLPGVPGVLPGAR	1:T007	116	134		1760.9937	36	17.5	881.5057	2	1760.9955	966720	31331510	30	95.1	83.3	b2;b3;b4;b5;b6;b8;b10;b11;b12;b13;b14;b15;b18;y1;y3;y4;y5;y6;y7;y8;y9;y10;y11;y12;y13;y14;y15;y16;y17;y18	1	100
ELN	FPGVGLPGVPTGAGVK	1:T008	135	151		1550.882	32	17.3	776.4484	2	1550.881	98295	3332016	17	93.7	53.1	b2;b3;b4;b5;b6;b7;b10;b16;y5;y7;y10;y11;y12;y13;y14;y15;y16	-0.6	100
ELN	FPGVGLPGVPTGAGVKPK	1:T008-009	135	153		1776.0298	36	16.2	593.0179	3	1776.03	1095811	49942928	29	76.9	80.6	b2;b3;b4;b5;b6;b7;b8;b9;b10;b12;b13;b16;y1;y2;y3;y4;y5;y6;y7;y8;y9;y10;y11;y12;y13;y14;y15;y16;y18	0.1	99.7
ELN	FPGVGLPGVPTGAGVKPK	1:T008-009	135	153		1776.0298	36	18.3	593.0178	3	1776.0295	3659	173231	3	7.2	8.3	b10;y7;y9	-0.2	0.3
ELN	APGVGGAFAGIPGVGPFGGPQPGVPLGYPIK	1:T010	154	184		2830.5168	60	19.8	944.5165	3	2830.5259	989441	34661760	37	82.7	61.7	b3;b4;b6;b7;b8;b9;b10;b11;b14;b15;b17;b18;b19;b20;b21;b23;b24;b26;b28;y1;y2;y3;y4;y5;y7;y9;y10;y12;y13;y14;y15;y16;y17;y20;y22;y23	3.2	99.8
ELN	APGVGGAFAGIPGVGPFGGPQPGVPLGYPIK	1:T010	154	184		2830.5168	60	20.9	944.5154	3	2830.5225	2366	88740	3	1.2	5	b2;y6;y20	2	0.2
ELN	LPGGYLPTTGGK	1:T012	188	200		1322.687	24	14.6	662.3517	2	1322.6875	622845	22499840	21	88.5	87.5	b2;b3;b4;b5;b6;b7;b9;b10;b11;b12;y1;y2;y3;y4;y6;y7;y8;y9;y10;y11;y12	0.4	100
ELN	LPYGYGPGVAGAGK	1:T013	201	216		1433.7302	30	13.3	717.8736	2	1433.7313	695581	24324900	28	91.6	93.3	b2;b3;b4;b5;b6;b8;b9;b10;b11;b12;b13;b14;b15;y1;y2;y3;y4;y5;y6;y7;y8;y9;y10;y11;y12;y13;y14;y15	0.8	99.8
ELN	LPYGYGPGVAGAGK	1:T013	201	216		1433.7302	30	16.4	717.89	2	1433.764	1433	50358	5	1.2	16.7	y2;y8;y11;y13;y15	23.6	0.2
ELN	AGYPTGTGVPQAAAAAA AK	1:T014	217	236		1728.8794	38	12.7	865.4487	2	1728.8815	662896	21728450	36	88	94.7	b3;b4;b5;b6;b7;b8;b9;b10;b11;b12;b13;b14;b15;b16;b17;b18;b19;y1;y2;y3;y4;y5;y6;y7;y8;y9;y10;y11;y12;y13;y14;y15;y16;y17;y18;y19	1.2	100
ELN	FGAAGVLPVGGAGVPGVPGAIPGGALMGVCTPA AAAAAAA	1:T016	241	287		3762.0579	92	20.1	1255.0314	3	3762.0703	911900	33975712	37	73.3	40.2	b2;b4;b5;b6;b7;b8;b9;b12;b14;b15;b16;b17;b18;b19;b20;b21;b24;y28;y29;b31;b33;b34;b35;b37;b46;y7;y8;y10;y11;y12;y13;y14;y15;y23;y27;y29;y30	3.3	99.8

Fortsetzung Tab. 8-1

ELN	FGAGAAGLPGVGGAGVP GVPGAGIGGGIAGVTPA AAAAAAAK	1:T016	241	287	3762.0579	92	21.1	1255.0291	3	3762.0635	1611	52453	3	2.7	3.3	y1,y4,y16	1.5	0.2
ELN	YGAAGLPGGPGFGPGV VGVPGAGVPGVPGVPGAGI PVPVPGAGVPGVPGVPGVSP EAAAK	1:T018	291	350	5075.7598	118	20.7	1269.9519	4	5075.7759	913632	35676232	43	70.1	36.4	b3;b4;b5;b6;b7;b8;b10;b11;b14; b16;b17;b18;b19;b20;b21;b24;b 25;b26;b29;b31;b35;b36;b38;b4 4;b47;b48;b49;b52;b56;b7;b8;y10 ;y11;y12;y16;y18;y19;y21;y22;y 24;y26;y34;y53	3.2	99.9
ELN	YGAAGLPGGPGFGPGV VGVPGAGVPGVPGVPGAGI PVPVPGAGVPGVPGVPGVSP EAAAK	1:T018	291	350	5075.7598	118	22.8	1269.9486	4	5075.7627	1365	53443	6	10.4	5.1	b8;b13;y8;y16;y21;y29	0.6	0.1
ELN	PGVGGGPIPTYGVGAGGFP FGVGVGPGVPGVPGVPGVSP GGVPGVPGVPGVPGVPGVSP QAAAAAK	1:T022	362	423	5262.7827	122	21.1	1316.707	4	5262.7964	1021555	41057032	58	73.1	47.5	b3;b4;b5;b6;b7;b8;b9;b10;b11; b12;b13;b14;b15;b16;b17;b18;b 19;b21;b22;b23;b24;b25;b26;b2 7;b28;b33;b34;b35;b37;b38;b40 ;b44;b46;b52;b59;y2;y3;y5;y6;y 8;y9;y10;y11;y12;y13;y16;y17;y 19;y22;y24;y25;y28;y29;y30;y31 ;y34;y37;y44	2.6	100
ELN	YGVGTAAAAAK	1:T024	427	438	1075.5662	22	10.8	538.7913	2	1075.5668	339410	13603880	20	61.4	90.9	b2;b3;b4;b5;b6;b7;b8;b10;b11;y 1;y2;y3;y4;y5;y6;y7;y8;y9;y10;y 11	0.6	100
ELN	AAQFGLVPGVGVAPGVGV APGVGVAPGVGLAPGVGV APGVGVAPGVGVAPGVGV GGVAAAAAK	1:T026	443	504	5126.876	122	20.6	1282.7275	4	5126.8784	832959	33341410	63	32.3	51.6	b2;b3;b4;b5;b6;b7;b10;b12;b13; b17;b18;b19;b22;b23;b24;b25;b 28;b30;b31;b33;b34;b36;b37;b3 9;b43;b46;b48;b49;b53;b57;b59 ;y1;y2;y3;y4;y5;y9;y10;y11;y13; y14;y16;y18;y19;y20;y21;y23;y2 5;y26;y28;y29;y30;y31;y33;y34; y37;y39;y44;y46;y49;y50;y52;y5 5	0.5	100
ELN	AAAGLGAAGLGGVGV GLGVGAGVPGVGVGAGVP GFGAVPGALAAAK	1:T030	517	566	4057.2839	98	21.2	1015.3315	4	4057.2944	563217	21275860	44	69.6	44.9	b5;b6;b7;b8;b9;b13;b14;b15;b1 6;b17;b20;b21;b23;b24;b25;b26 ;b27;b31;b32;b34;b36;b38;b39; y5;y6;y8;y9;y10;y11;y12;y14;y1 5;y16;y17;y18;y20;y23;y26;y27; y29;y32;y34;y41;y47	2.6	99.5
ELN	AAAGLGAAGLGGVGV GLGVGAGVPGVGVGAGVP GFGAVPGALAAAK	1:T030	517	566	4057.2839	98	22	1015.3333	4	4057.3015	2824	103317	3	30.1	3.1	b9;y8;y23	4.3	0.5
ELN	YGAAPVGLGGALGGV GIPGGVGGAPAAAAAA K	1:T032	570	606	3013.6711	72	20.1	1005.5673	3	3013.678	704272	24441560	36	82.1	50	b2;b3;b4;b5;b6;b7;b8;b9;b15;b 16;b17;b19;b20;b23;b24;b25;b2 6;b27;b28;b35;b36;y1;y2;y9;y10 ;y11;y12;y14;y17;y19;y21;y22;y 23;y28;y29;y32	2.3	100
ELN	AAQFGLVGAAGLGGVGV GLGVGAGVPGVGGVGGVGGV K	1:T034	611	648	3153.7661	74	20.6	1052.2659	3	3153.7737	313880	10296920	30	24.7	40.5	b2;b3;b4;b5;b6;b7;b9;b11;b16; b19;b20;b21;b22;b29;y1;y2;y3;y 4;y5;y7;y8;y9;y10;y13;y16;y17;y 19;y21;y23;y27	2.4	72.1
ELN	AAQFGLVGAAGLGGVGV GLGVGAGVPGVGGVGGVGGV K	1:T034	611	648	3153.7661	74	20.9	1052.2654	3	3153.7725	119815	4554371	17	62.5	23	b5;b7;b8;b9;b13;b20;b21;b22;b 25;y7;y8;y9;y10;y16;y17;y28;y3 1	2	27.5
ELN	AAQFGLVGAAGLGGVGV GLGVGAGVPGVGGVGGVGGV K	1:T034	611	648	3153.7661	74	20.6	631.7652	5	3153.7864	1365	80854	14	2.6	18.9	b2;b3;b4;b5;b11;b16;y1;y2;y3;y 4;y5;y8;y19;y27	6.4	0.3
ELN	YGAAGLGGVGGAGGFL GGVAAR	1:T036	652	675	2115.1226	46	18.6	1058.5691	2	2115.1223	674295	24017130	40	88.8	87	b2;b3;b4;b5;b6;b7;b8;b9;b10;b 12;b13;b14;b15;b16;b17;b18;b1 9;b21;b22;b23;y1;y2;y3;y4;y5;y 6;y7;y8;y9;y10;y11;y12;y13;y14; y15;y16;y17;y18;y20;y22	-0.1	100
ELN	PGFGLSPIPGGACLGK	1:T037*	676	692	1673.86	32	18.5	837.9389	2	1673.8619	451762	14673040	27	93.3	84.4	b5;b3;b4;b5;b6;b7;b8;b9;b10;b 13;b14";b15";b16";y1;y2;y3;y4 ";y5";y7";y8";y9";y10";y11";y1 2";y13";y14";y16"	1.1	100

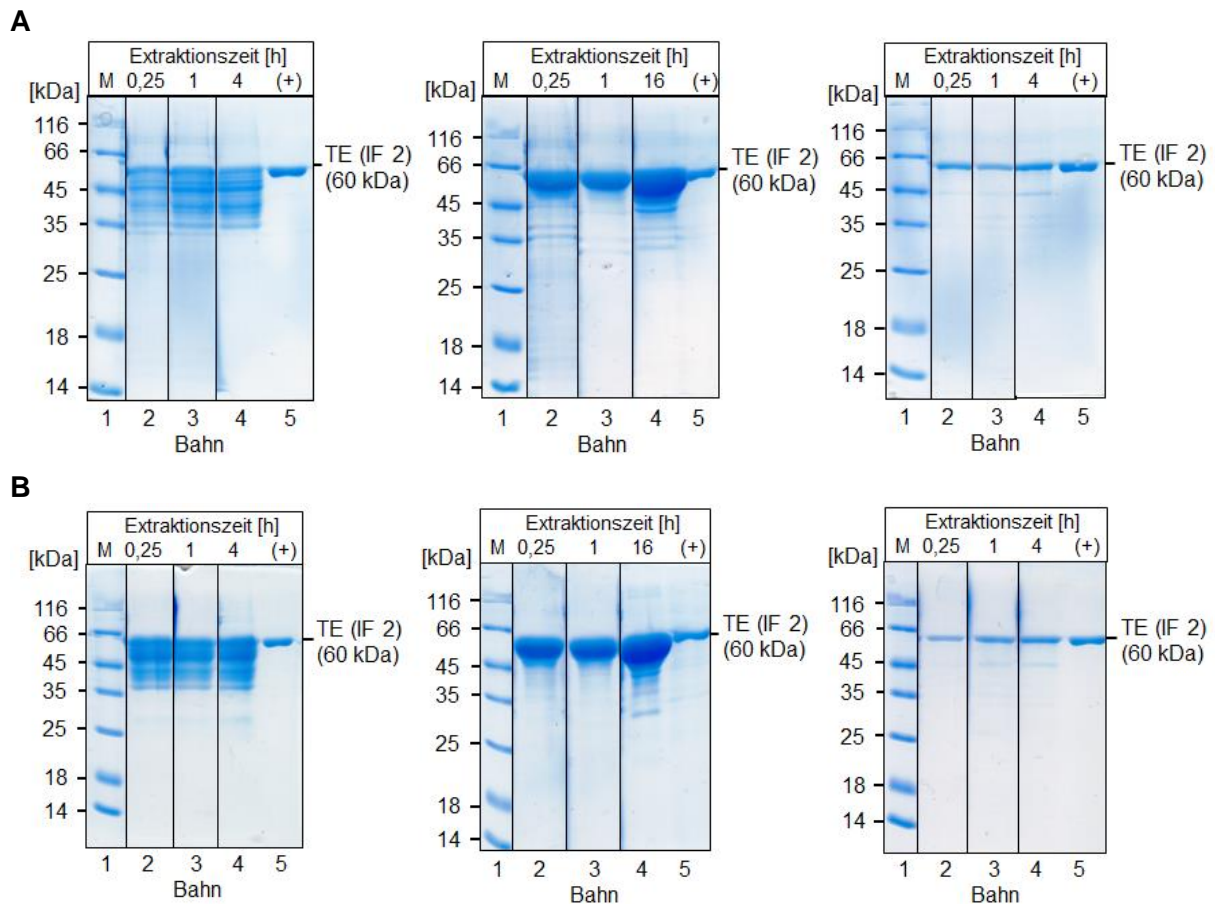


Abb. 8-7 Extraktion von Tropoelastin (Isoform 2) aus *E. coli*-Biofeuchtmasse im zeitlichen Verlauf sowie abhängig von Resuspension der Pellets P_w , P_1 und P_2 mittels (A) Ultraturrax bei 2 800 rpm bzw. (B) durch Vortexen. Nach Zellaufschluss von 100 g Biofeuchtmasse wurde der Ansatz in zwei gleiche Hälften aufgeteilt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 2 mL Probe entnommen, zentrifugiert und der Überstand mittels SDS-PAGE analysiert. Dargestellt sind die Coomassie-gefärbten SDS-PAGE Gele nach dem ersten (links), zweiten (Mitte) und dritten (rechts) Extraktionsschritt. Bahn 1: Marker (5 μ L); Bahn 2 – 4: Extraktionsproben nach 15 min, 1 h, 4 h bzw. 16 h (5 μ L); Bahn 5: gereinigtes TE (IF 2) (2 μ g).

ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCTG
 TCATATGGAGGGGTTTCAAACCAGCGATCGTCCGGGTGTTTGTGATGGAAAATATTACG
 AAAAGATTGATGGATTTTATCTGATATTGAATGTGATGTATTAATCAATGCAGCAATTAA
 GAAAGGGTTAATAAAATCAGAGGTAGGCGGAGCAACTGAAAATGATCCTATAAACTCG
 ATCCGAAGAGTCGTAACTCCGAACAAACATGGTTTATGCCCGGCGAACACGAAGTTATT
 GATAAAATACAGAAAAGACAAGGGAATTTTAAACAGTAAAAAACATTGTATTGACAAAT
 ATAATTTTGAAGATGTTCAAGTAGCTAGGTATAAACCCGGGCAATACTATTATCATCATT
 ACGACGGAGATGACTGCGACGATGCATGCCCGAAGGACCAAGATTAGCTACGTTGAT
 GGTGTATCTTAAAGCTCCTGAAGAAGGTGGTGGTGGTGGAGACTGATTTTCCGACACTCA
 AAACAAAAATAAAACCAAAGAAAGGAACCTCAATCTTTTTTTGGTTGCGGATCCTGTAA
 CGAGGAAATTGTACAAAGAACTTTGCACGCAGGACTTCCCGTGAAAAGTGGAGAAAAA
 ATCATCGCGAACCAATGGATCCGTGCTGTTAAATGA

Abb. 8-8 DNA-Sequenz codierend für die N-terminal verkürzte cvP4H-Variante (GenBank Eintrag: AAC96453, AS E36 – K242, ohne Signalpeptid) mit N-terminalem His₁₀-tag.

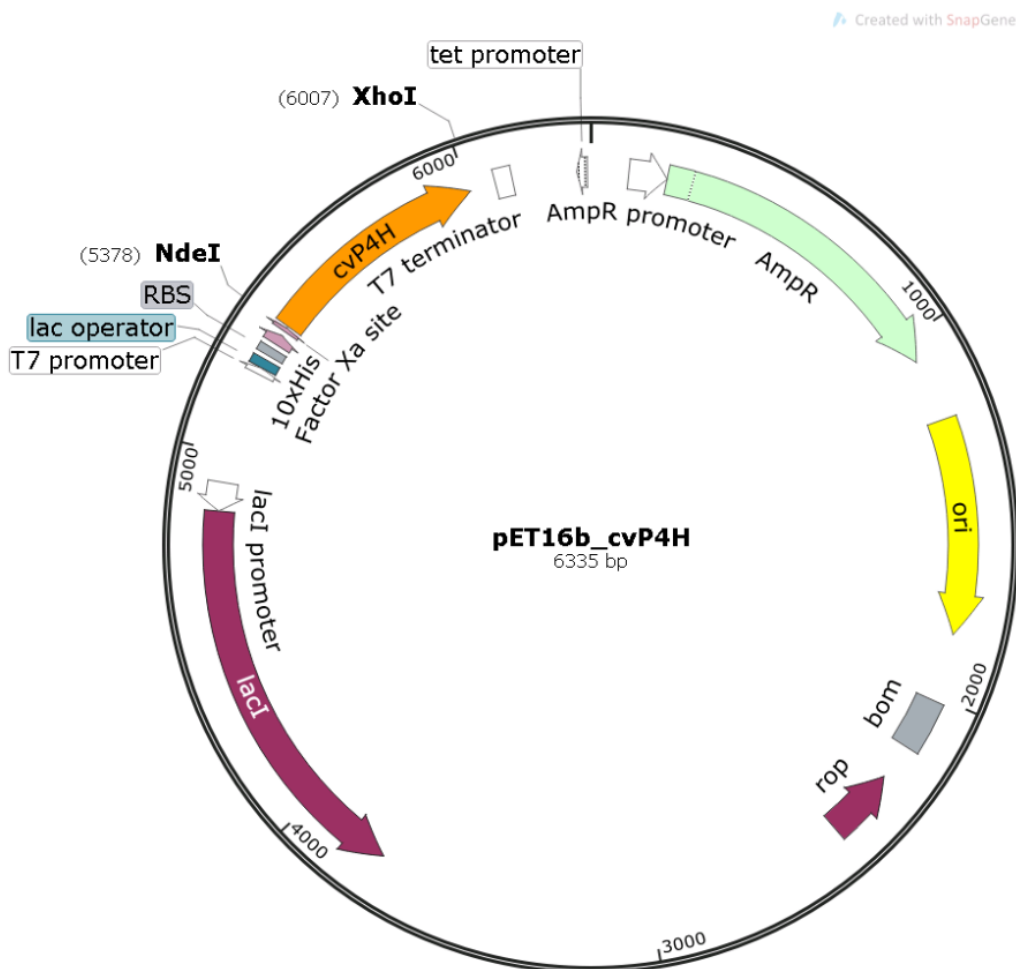


Abb. 8-9 Plasmidkarte pET-16b_His₁₀-cvP4H.

```

      10      20      30      40      50      60
GHHHHHHHHH HSSGHIEGRH MEGFETSDRP GVCDGKYYEK IDGFLSDIEC DVLINAAIKK

      70      80      90      100     110     120
GLIKSEVGGG TENDPIKLPD KSRNSEQTWF MPGEHEVIDK IQKKTREFLN SKKHCIDKYN

      130     140     150     160     170     180
FEDVQVARYK PGQYYYHHYD GDDCDDACPK DQRLATLMVY LKAPEEGGGG ETDFPTLKTK

      190     200     210     220
IKPKKGTSIF FWVADPVTRK LYKETLHAGL PVKSGEKIIA NQWIRAVK

```

Number of amino acids: 228

Molecular weight: 26048.38

Theoretical pI: 7.06

Amino acid composition:

Ala (A)	11	4.8%
Arg (R)	8	3.5%
Asn (N)	6	2.6%
Asp (D)	18	7.9%
Cys (C)	5	2.2%
Gln (Q)	6	2.6%
Glu (E)	17	7.5%
Gly (G)	20	8.8%
His (H)	17	7.5%
Ile (I)	15	6.6%
Leu (L)	12	5.3%
Lys (K)	26	11.4%
Met (M)	3	1.3%
Phe (F)	8	3.5%
Pro (P)	11	4.8%
Ser (S)	10	4.4%
Thr (T)	11	4.8%
Trp (W)	3	1.3%
Tyr (Y)	10	4.4%
Val (V)	11	4.8%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

Extinction coefficients:

Ext. coefficient 31400 M⁻¹ cm⁻¹, at 280 nm measured in water

Abs 0.1% (=1 g/l) 1.205, assuming all Cys residues are reduced

Abb. 8-10 ExPASy ProtParam [Garsteiger et al., 2005] Analyse der cvP4H (GenBank Eintrag: AAC96453, AS E36 – K242, ohne Signalpeptid) mit N-terminalem His₁₀-tag.

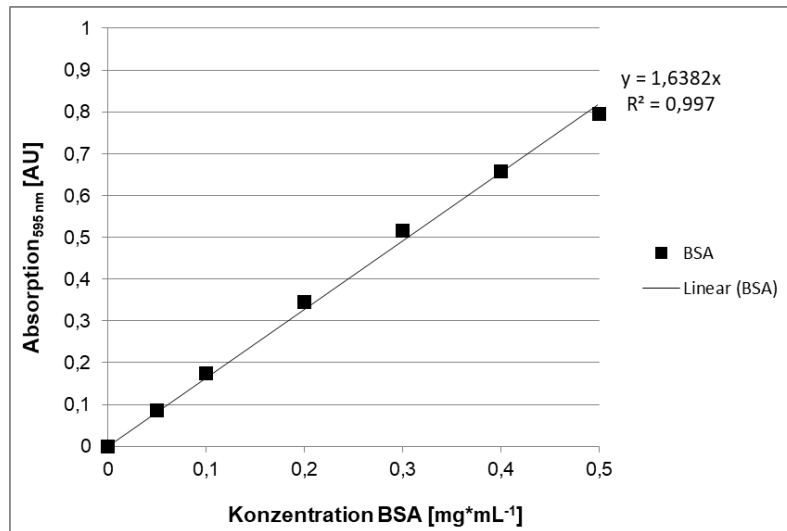


Abb. 8-11 Kalibriergerade zur Proteinkonzentrationsbestimmung der gereinigten His₁₀-cvP4H mittels Bradford-Assay. BSA gelöst in Lagerpuffer (20 mM Tris/HCl (pH 7,9), 100 mM NaCl).

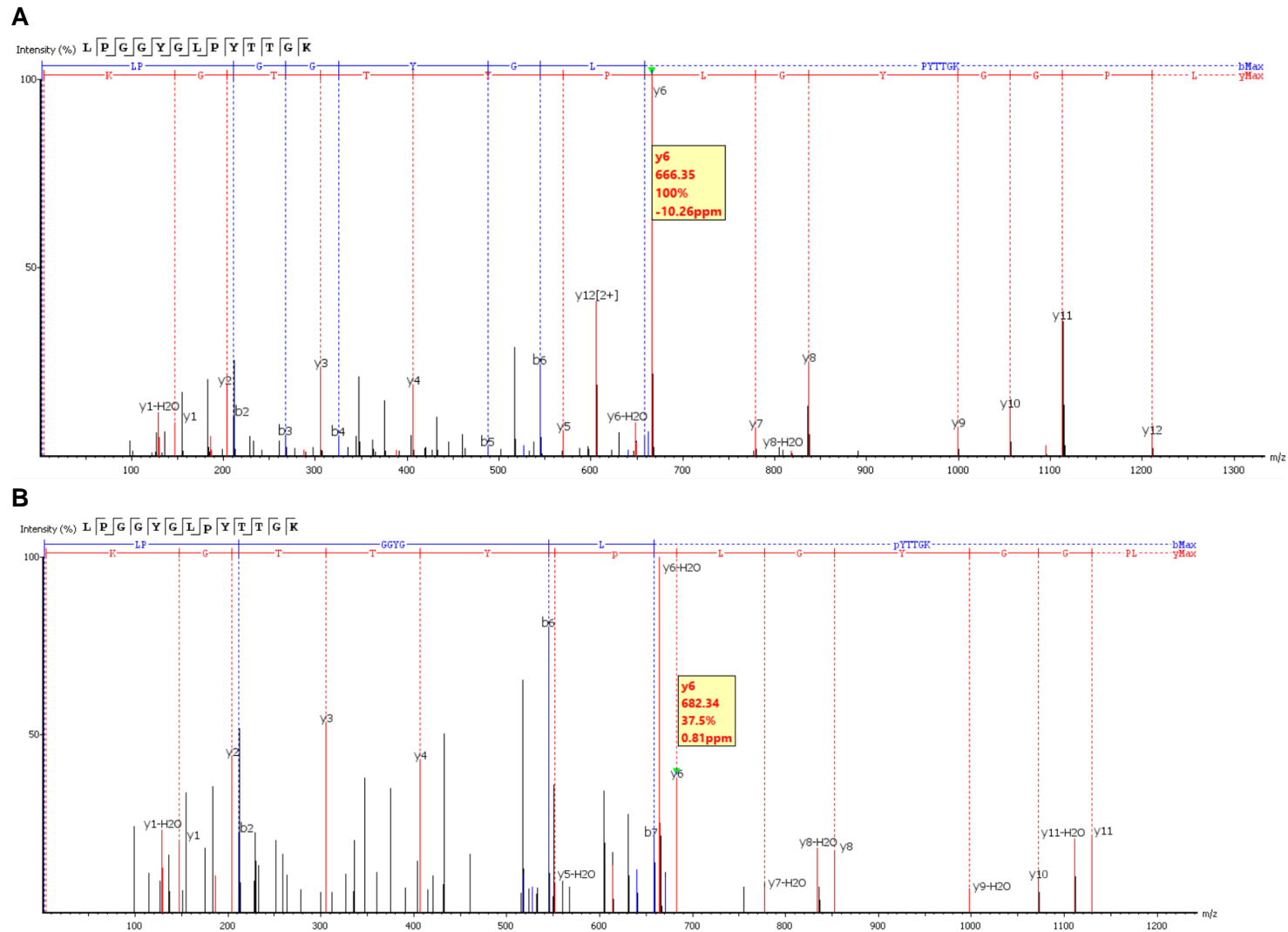


Abb. 8-12 Beispiel für Spektren der massenspektrometrischen Analyse zur Identifikation von HyP nach *in vitro* Hydroxylierung von rekombinatem, humanem Tropoelastin (Isoform 2) mit His₁₀-cvP4H. (A) Peptid ohne Hydroxylierung des Prolyl-Restes („P“) bzw. (B) gleiches Peptid mit Hydroxylierung des Prolyl-Restes („p“). Für das Fragmentation y₆ wurde ein Unterschied im *m/z*-Verhältnis nachgewiesen (+15,99), welcher den Einbau eines O-Atoms in den Prolyl-Rest belegt.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1-1 Exon- und Domänenstruktur des humanen Tropoelastins ohne Domäne 26A.	10
Abb. 1-2 Schematische Darstellung der Elastogenese nach Biosynthese und Prolyl-4-Hydroxylierung des Tropoelastins.....	12
Abb. 1-3 Atomistisches Modell der Tertiärstruktur von rekombinantem, humanem TE (IF 2).	13
Abb. 1-4 Mutmaßlicher Reaktionsmechanismus der Fe(II)- und 2-OG-abhängigen Dioxygenasen.....	19
Abb. 1-5 (A) <i>Paramecium bursaria</i> mit endosymbiontischer Alge <i>Chlorella variabilis</i> (oben) bzw. PBCV-1 an Zellwand der Alge (unten).	22
Abb. 2-1 Prozessschema der Extraktion von TE (IF 2) aus 100 g <i>E. coli</i> Biofeuchtmasse	42
Abb. 2-2 Prozessschema Aufarbeitung TE (IF 2) aus acetonhaltigen Überständen	44
Abb. 3-1 (A) Wachstumskurve <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE, (B) zeitlicher Verlauf der Überproduktion von TE (IF 2).....	54
Abb. 3-2 Aminosäuresequenz von TE (IF 2) ohne Signalpeptid mit möglichem C-terminalen tag nach Insertion von zwei zusätzlichen Stopcodonen durch Mutagenese-PCR.	55
Abb. 3-3 (A) Wachstumskurve <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE, (B) zeitlicher Verlauf der Überproduktion von TE (IF 2) in Abhängigkeit von Kanamycin-Zugabe zur Kultur.	56
Abb. 3-4 (A) Wachstumskurve und Glucose-Konzentration während Fermentation zur Produktion von TE (IF 2) in <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE, (B) zeitlicher Verlauf der Überproduktion von TE (IF 2).	58
Abb. 3-5 (A) Wachstumskurve und Glucose-Konzentration während Fermentation im 100 L-Maßstab zur Produktion von TE (IF 2) in <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE, (B) zeitlicher Verlauf der Überproduktion von TE (IF 2) im 100 L-Maßstab.....	59
Abb. 3-6 (A) 12,5 %ige SDS-PAGE Fraktionen einer Extraktion von TE (IF 2) aus <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) + pBS35_TE.	60
Abb. 3-7 (A) 12,5 %ige SDS-PAGE zur Analyse des Präzipitats der TE-Aufarbeitung, (B) Lyophilisat nach Aufarbeitung der acetonhaltigen Überstände S1 – S3.....	62
Abb. 3-8 12,5 %ige SDS-PAGE zur Analyse der Proteinreinheit des Lyophilisats nach Produktion im 12 L-Bioreaktormaßstab (Fermentation 1).	64
Abb. 3-9 Lichtstreuung der TE-Lösung abhängig von der NaCl-Konzentration bei 25 °C.	66
Abb. 3-10 (A) Chromatogramm der cIEX von TE (IF 2) mit Elution von 0 – 150 mM NaCl, (B) Chromatogramm CIP nach cIEX, (C) 12,5 %ige SDS-PAGE der Fraktionen der cIEX, (D) 12,5 %ige SDS-PAGE des Eluats nach CIP.	67
Abb. 3-11 Einfluss von NaCl und 2 M Harnstoff auf das Koazervationsverhalten von TE (IF 2) bei zunehmender Temperatur.....	68
Abb. 3-12 Einfluss von NaCl und 1 M Harnstoff auf das Koazervationsverhalten von TE (IF 2) bei steigender Temperatur.	69
Abb. 3-13 (A) Chromatogramm der cIEX von TE (IF 2) mit Elution von 0 – 300 mM NaCl unter Einfluss von 1 M Harnstoff, (B) Chromatogramm CIP nach cIEX, (C) 12,5 %ige SDS-PAGE der Fraktionen aus cIEX und CIP.	71

Abb. 3-14 12,5 %ige SDS-PAGE des lyophilisierten TEs vor bzw. nach Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie.	72
Abb. 3-15 (A) Chromatogramm der cLEX von TE (IF 2) mit reduzierter Beladungsmenge, (B) Chromatogramm CIP nach cLEX, (C) 12,5 %ige SDS-PAGE der Fraktionen aus cLEX und CIP.	73
Abb. 3-16 LC-Chromatogramm der Trennung der Proteine von TE (IF 2) vor bzw. nach Reinigung mittels Kationenaustauschchromatographie.	75
Abb. 3-17 Alignment der resultierenden Peptide nach Verdau der mittels LC abgetrennten Nebenprodukte einer TE-Probe vor der Kationenaustauschchromatographie.	76
Abb. 3-18 (A) Wachstumskurve <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) + pET-16b_cvP4H, (B) zeitlicher Verlauf der Überproduktion von His ₁₀ -cvP4H.	78
Abb. 3-19 (A) Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie zur Reinigung der His ₁₀ -cvP4H, (B) Chromatogramm CIP, (C) 12,5 %ige SDS-PAGE zur Analyse der Fraktionen, (D) NCM des Immunoblots nach SDS-PAGE der Fraktionen.	79
Abb. 3-20 Relative O ₂ -Konzentration während der <i>in vitro</i> Hydroxylierung mit His ₁₀ -cvP4H bei 37 °C.	81
Abb. 3-21 Relative O ₂ -Konzentration während der <i>in vitro</i> Hydroxylierung mit His ₁₀ -cvP4H bei 37 °C mit Harnstoff.	82
Abb. 3-22 Übersicht der Prolyl-Reste in humanem TE (IF 2, ohne Signalpeptid) mit umgebenden Aminosäuren X ₁ – X ₄ bzw. X ₁ ' – X ₄ ' sowie der HyP-Reste nach <i>in vitro</i> Hydroxylierung mit His ₁₀ -cvP4H bei 37 °C ohne bzw. mit Harnstoffbehandlung des TEs vor der Reaktion.	88
Abb. 8-1 Ausschnitt aus der Sequenz von pET28a(+)_cer_TE (alias pBS35_TE) (5' → 3').	113
Abb. 8-2 Plasmidkarte pET-28a(+)_cer_TE alias pBS35_TE.	114
Abb. 8-3 ExPASy ProtParam [Garsteiger et al., 2005] Analyse für humanes Tropoelastin (Isoform 2, GenBank Eintrag: AAC98394, AS 27 – 724, ohne Signalpeptid) ohne posttranslationale Modifikationen.	115
Abb. 8-4 Aminosäuresequenz und Domäneneinteilung von humanem Tropoelastin (Isoform 2, GenBank Eintrag: AAC98394, AS 1 – 724) nach [Schmelzer und Duca, 2021].	116
Abb. 8-5 UV-Vis Spektrum von gereinigtem Tropoelastin (Isoform 2, GenBank Eintrag: AAC98394, AS 27 – 724, ohne Signalpeptid) nach Kationenaustauschchromatographie.	116
Abb. 8-6 Übersicht der Prozessdaten zur Produktion von rekombinantem, humanem Tropoelastin (Isoform 2, GenBank Eintrag: AAC98394, AS 27 – 724, ohne Signalpeptid) in <i>E. coli</i> BL21-Gold(DE3) im Bioreaktormaßstab.	117
Abb. 8-7 Extraktion von Tropoelastin (Isoform 2) aus <i>E. coli</i> -Biofeuchtmasse im zeitlichen Verlauf sowie abhängig von Resuspension der Pellets P _w , P1 und P2 mittels (A) Ultraturrax bei 2 800 rpm bzw. (B) durch Vortexen.	120
Abb. 8-8 DNA-Sequenz codierend für die N-terminal verkürzte cvP4H-Variante (GenBank Eintrag: AAC96453, AS E36 – K242, ohne Signalpeptid) mit N-terminalem His ₁₀ -tag.	121
Abb. 8-9 Plasmidkarte pET-16b_His ₁₀ -cvP4H.	121

Abb. 8-10 ExPASy ProtParam [Garsteiger et al., 2005] Analyse der cvP4H (GenBank Eintrag: AAC96453, AS E36 – K242, ohne Signalpeptid) mit N-terminalem His ₁₀ -tag.	122
Abb. 8-11 Kalibriergerade zur Proteinkonzentrationsbestimmung der gereinigten His ₁₀ -cvP4H mittels Bradford-Assay.	123
Abb. 8-12 Beispiel für Spektren der massenspektrometrischen Analyse zur Identifikation von HyP nach <i>in vitro</i> Hydroxylierung von rekombinatem, humanem Tropoelastin (Isoform 2) mit His ₁₀ -cvP4H.	124
Tab. 2-1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien.	25
Tab. 2-2 Übersicht über die verwendeten Geräte.	28
Tab. 2-3 Übersicht über die verwendeten Puffer.	31
Tab. 2-4 Übersicht über die verwendeten Organismen.	32
Tab. 2-5 Übersicht der verwendeten Primer.	33
Tab. 2-6 Reaktionsansatz K-PCR.	34
Tab. 2-7 Programm K-PCR.	34
Tab. 2-8 Reaktionsansatz Mutagenese-PCR.	35
Tab. 2-9 Programm Mutagenese-PCR.	35
Tab. 2-10 Zusammensetzung der Medien und Zusätze zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	36
Tab. 2-11 Komponenten der Trenn- bzw. Sammelgele (Dicke: 1 mm).	39
Tab. 2-12 Reagenzien für Coomassie-Färbung.	40
Tab. 2-13 Protokoll der Silberfärbung.	40
Tab. 2-14 Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur <i>in vitro</i> Hydroxylierung.	48
Tab. 3-1 Vergleich der TE-Produktion im 12 L (Fermentation 1 und 2) und 100 L-Bioreaktormaßstab (Fermentation 3).	63
Tab. 3-2 Übersichtstabelle zu O ₂ -Verbrauch, Reaktionsgeschwindigkeit und spezifischer Enzymaktivität bei der <i>in vitro</i> Hydroxylierung.	83
Tab. 3-3 Anzahl der in Konsensus-Motiven angeordneten HyP-Reste in isoliertem, humanem TE (IF 2) lt. [Schmelzer et al., 2016] bzw. nach <i>in vitro</i> Hydroxylierung von rekombinatem, humanem TE (IF 2) mittels His ₁₀ -cvP4H.	88
Tab. 4-1 Vergleich der Ausbeute an rekombinatem TE (IF 2) nach Produktion in <i>E. coli</i> und dessen chromatographischer Reinigung.	93
Tab. 5-1: Übersicht der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse.	102
Tab. 8-1 Übersicht der mittels ESI-QTOF-MS/MS nachgewiesenen Peptide der Proteinidentifikation.	118

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Mathias Mende
 Geburtsdatum: 24.09.1991
 Geburtsort: Halle (Saale)
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Akademischer Grad: Master of Science in Biologie

Schulischer und beruflicher Werdegang

- 10.2019 – 12.2022 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Prof. Pietzsch
- 11.2016 – 09.2019 **Biologe**, Institut für angewandte Dermatopharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg IADP e.V.
- 11.2016 – 03.2022 **Arbeiten zum Promotionsstudium**
 Thema: „Produktion von rekombinantem, humanem Tropoelastin (Isoform 2) und *in vitro* Hydroxylierung mittels viraler Prolyl-4-Hydroxylase“, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Institut für Pharmazie, Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Prof. Pietzsch
- 04.2016 – 10.2016 **Wissenschaftliche Hilfskraft**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Prof. Pietzsch
- 10.2013 – 03.2016 **Studium** der Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Master of Science
 Thema: „Untersuchungen zur Überexpression der Glykosyltransferase Alg5 aus *Saccharomyces cerevisiae*“
 Institut für Pharmazie, Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Prof. Pietzsch
- 10.2010 – 10.2013 **Studium** der Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Bachelor of Science
 Thema: „Analyse von N- und C-terminal verkürzten Varianten des Formiattransporters FocA aus *Escherichia coli*“
 Institut für Biologie, Allgemeine Mikrobiologie, Prof. Sawers
- 09.2002 – 06.2010 **Allgemeine Hochschulreife**
 Elisabeth-Gymnasium, Halle (Saale)