

Uwe Schreiner
Dr.sc.hum.

Expression, Detektion und Reindarstellung rekombinanter Enzyme mittels Metallchelat- und Antikörper-Affinitätschromatografie

Geboren am 13.01.1965 in Mannheim
Reifeprüfung am 29.05.1984 in Mannheim
Studiengang der Fachrichtung Chemie vom WS 1985/86 bis SS 1993
Vordiplom am 14.12.1988 an der Universität Heidelberg
Diplom am 30.08.1993 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. K.-W. Knopf

In der vorliegenden Arbeit gelang die Expression und Reinigung eines mit sechs Histidinen C-terminal verlängerten UL5-Proteins, einer Untereinheit des Helikase/Primase-Komplexes des Herpes simplex-Virus Typ 1 Stamm Angelotti, in Insektenzellen mit rekombinanten Baculoviren. Hierzu wurde eine artifizielle His-Tag-Sequenz mittels PCR amplifiziert und nach mehreren Subklonierungsschritten in den Baculovirus-Transfervektor pVLUL5His transferiert. Auf dem Wege homologer Rekombination wurde das His-Tag modifizierte UL5-Gen (UL5His) in das Genom des Baculovirus BacUL5His integriert, wo es unter Kontrolle des starken baculoviralen Polyhedrin-Promotors stand. Die Expression des UL5His-Proteins in Sf9-Zellen wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse überprüft und zeigte, daß die Rekombinante das 99,7 kDa-große UL5His-Protein exprimiert. Expressionskinetiken, in denen Sf9-Zellen sowohl mit BacUL5His wie BacUL52 infiziert wurden, zeigten, daß die beiden Untereinheiten UL5His und UL52 des Helikase/Primase-Komplexes bereits 24 h p.i. induziert wurden und je nach Dauer der Virusin-okulation 48 – 50 h p.i. in optimaler Konzentration vorhanden waren. Zur Reinigung des Helikase/Primase-Komplexes wurden Zellextrakte 50 h p.i. verwendet. Die UL5His/UL52-Zellextrakte wurden zuerst konventionell nach dem „QIAexpressionist“-Verfahren (Qiagen, Hilden) gereinigt. Da aber Pufferbestandteile, wie Phosphationen die ATPase-Aktivität des Enzyms störten, und Imidazol die Bindung an die Ni-NTA-Säule inhibierte, wurde der His-Tag-modifizierte HSV-1-Komplex mittels mehrerer unterschiedlich modifizierter Ni-NTA-Affinitätschromatografie-Methoden aufgereinigt. Durch den Einsatz von Histidin-Tetrameren als Imidazolersatz wurde die größte Reinheit des Enzymkomplexes erreicht, was in den anschließenden Funktionstests bestätigt wurde. Der mit Histidin-Tetrameren gereinigte Helikase/Primase-Komplex zeigte die höchste spezifische ATPase-Aktivität. Ferner zeigte der Enzymkomplex auch in der gleichen Größenordnung, wie das für den nativen Enzymkomplex bekannt ist, Helikase- und Primaseaktivitäten. Der Enzymkomplex war frei von meßbaren DNasen und wies somit einen Reinheitsgrad auf, der in dieser Weise nur durch aufwendige Reinigungsverfahren zu erreichen ist.

Als erfolgreiche Alternative zur Nickel-NTA-Affinitätschromatografie wurde eine Antikörper-säule für die Affinitätsreinigung der Dihydrofolatreduktase (DHFR) erprobt. Als Antikörper diente der monoklonale Antikörper 1051c (Knopf, DKFZ, Heidelberg und Bayer, Wuppertal) und als Epitop die HSV-1 DNA-Polymerasesequenz von Aminosäure 675 - 686 zuzüglich einer C-terminalen Faktor Xa-Sequenz (HPOL-Kassette). Für die Subklonierung des Epitops wurde eine HPOL-Kassette konstruiert, die C-terminal in den Expressionsvektor pQE42 eingesetzt wurde. In Bakterien wurde DHFR exprimiert, die N-terminal einen His-Tag und C-terminal ein HPOL-Tag besaß. In vergleichenden Western-Blot-Analysen wurde gezeigt, daß die DHFR mit

dem monoklonalen Antikörper 1051c 15-fach besser immungefärbt wurde als mit dem RGS-His6-Antikörper von Qiagen. Die HPOL-Tag-modifizierte DHFR konnte in nahezu homogener Form sowohl über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographiesäule als auch über eine Antikörpersäule gereinigt werden. Der Vektor pQE42PE ermöglicht die Expression von rekombinanten Proteinen mit zwei unterschiedlichen Protein-Tags in prokaryontischen Zellen und die anschließende effiziente Reinigung des Proteins mit der Kombination von Ni-NTA- und Immun-Affinitätschromatografie.