

Fei Falkenstern- Ge

Dr. med.

Expression und Aufreinigung von rekombinantem Pex 11p. Gewinnung und Charakterisierung eines korrespondierenden Antikörpers

Geboren am 02.06.1978 in Shen Yang V.R. China

Staatsexamen am 11.04.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Alfred Völkl

Pex11 Proteine sind integrale Proteine der Peroxisomenmembran. Sie gehören zur Gruppe der Peroxine, d.h. zu Proteinen, die in die Biogenese der Peroxisomen involviert sind. Beim Menschen sind mit PEX11- α und PEX11- β zwei unterschiedliche PEX-Gene identifiziert, wobei letzteres unmittelbar in die Regulation der Peroxisomenzahl einer Zelle eingebunden zu sein scheint. Im Hinblick auf weitergehende biochemische und morphologische Untersuchungen zur physiologischen Rolle von Pex11- β , die immer noch nicht genau verstanden ist, war es das Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit, einen polyklonalen Antikörper gegen dieses Protein herzustellen. Da Pex11- β als integrales Membranprotein sehr schwierig aufzureinigen und für eine Immunisierung in ausreichenden Mengen zu gewinnen ist, wurde die Expression von rekombinantem Pex11- β als Alternative in Betracht gezogen.

Aus der modifizierten humanen Leberzelllinie HepG2 wurde zu diesem Zweck zunächst Gesamt-RNA extrahiert, und die Pex11- β mRNA mittels RT-PCR und geeigneter Primer in die korrespondierende cDNA umgeschrieben. Letztere wurde in den Expressionsvektor PCR[®]T7/NT-TOPO[®]TA inkloniert, und das erhaltene Plasmid danach in *E.coli* DH5-Bakterien transformiert und amplifiziert. Für die Expression des rekombinanten Pex11- β Proteins erwies sich nach Vorversuchen der *E.coli*-Stamm BL21 (DE3) am geeignetsten.

Nachdem das rekombinante Protein Pex11- β ungeachtet seines His-Tags von den Bakterien nicht als lösliches Protein exprimiert wurde, sondern eingeschlossen in unlösliche inclusion bodies anfiel, war es erforderlich, eine Reihe verschiedener Methoden zu seiner Extraktion auszutesten. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Fusionsproteins, sehr wahrscheinlich bedingt durch seinen hydrophoben Charakter, verblieb dabei das Verfahren der Elektroelution nach präparativer SDS-PAGE als einzig brauchbare Alternative.

Das elektroeluierte Fusionsprotein wurde sodann ohne vorherige Abspaltung des His-Tags für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt, und das anfallende Antiserum zur Anreicherung der Gesamt-IgG-Fraktion mit Ammonsulfat aufbereitet.

Die nachfolgende Charakterisierung des polyklonalen anti-Pex11- β Antikörpers erfolgte mittels Western Blotting. Dazu wurden neben dem elektroeluierten Fusionsprotein als Antigen, inclusion bodies als zugehörigem Ausgangsmaterial auch hochreine Gesamtperoxisomenfraktionen aus Rattenleber und HepG2-Zellen, sowie nicht zuletzt entsprechende integrale Peroxisomenmembran-Präparationen vergleichend eingesetzt.

Bei dieser Vergleichsstudie stellte sich heraus, dass der Anti-Pex11- β Antikörper sein Antigen (rekombinantes Pex11 β) im Elektroeluat und in den Inclusion bodies eindeutig identifizieren kann. Peroxisomales Pex11 β in der Rattenleber bzw. in HepG2-Zellen konnte dagegen nur dann detektiert werden, wenn das Protein in einer integralen Membranpräparation konzentriert vorlag.

Die Expression des offensichtlich schwer löslichen Membranproteins Pex11- β bleibt weiterhin eine schwierige Aufgabe. Der *E.coli* Stamm BL21 (DE3) kann das Protein nur bedingt exprimieren. Um eine optimale Expression und Aufreinigung zu erreichen, sollte für weitere Experimente zunächst ein Screening mit unterschiedlich getaggen Pex11- β Fusionsproteinen in *E.coli* durchgeführt werden. Weiterhin wären Hefe, schnell proliferierende Eukaryoten, oder das Baculovirussystem mit seinen hohen Proteinsyntheseraten als Expressionssysteme alternativ zu erproben. Die Verwendung von Säugertierzelllinien kommt wohl nur als letzte Alternative in Betracht, da in diesen nur schwache Promotoren mit geringen Expressionsraten verwendet werden können um die Toxizität des rekombinanten Proteins zu minimieren. Dies dürfte den Aufreinigungsprozess für ein schwer lösliches Membranprotein nicht unerheblich komplizieren.